

## 深入研究

3.3 根据实验结果,为提高君药青风藤中主要有效成分青藤碱提取率,在制定本复方提取工艺路线时,拟以青风藤与雷公藤共提,其他药味另行处置为好。

## References

- [1] Editorial Board of China Herbal. State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Vol 5. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1999.
- [2] Guo D A, Zhang Z G, Ye G Q, *et al.* Studies on liposoluble constituents from the aerial parts of *Siegesbeckia orientalis* L. [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1997, 32(4): 282-285.

## HPLC法测定藤茶中双氢杨梅黄素和杨梅黄素的含量

李瑛琦<sup>1</sup>, 于治国<sup>1</sup>, 陆文超<sup>2\*</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016 2. 沈阳药科大学制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016)

藤茶系葡萄科蛇葡萄属显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand. -Mazz.) W. T. Wang 的嫩茎叶经传统加工揉制, 干燥而成<sup>[1]</sup>。该植物主要分布于湖南、湖北、广西、广东、云南、贵州、江西、福建等省区<sup>[2]</sup>。其主要成分为双氢杨梅黄素 (DIH) 和杨梅黄素 (MYR)<sup>[3]</sup>。DIH 具有明显拮抗去甲肾上腺素和高 K<sup>+</sup> 所致的兔胸主动脉条收缩反应及钙拮抗作用, 且毒性很低<sup>[4,5]</sup>, 并有祛痰止咳、降血脂和保肝等作用<sup>[6]</sup>。MYR 有抗菌、抗癌、止咳、祛痰、利尿等作用<sup>[7]</sup>。目前已报道的该药材中黄酮醇类化合物含量测定方法有薄层扫描法<sup>[8]</sup>和分光光度法<sup>[9]</sup>。本实验建立了一种同时测定药材中 DIH 和 MYR 的 HPLC 方法, 并对不同产地的药材进行了含量测定, 为今后对藤茶的进一步研究及充分开发利用奠定了基础。

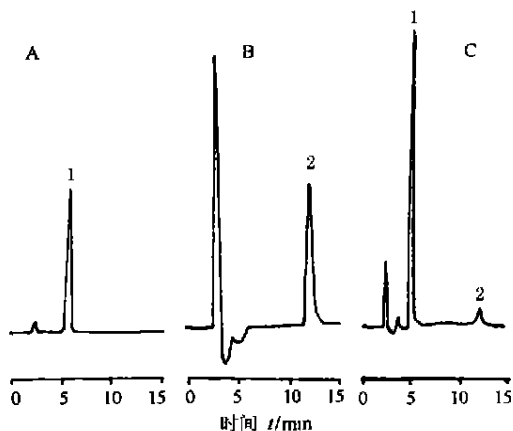
## 1 仪器、试剂与材料

岛津 LG-10ATvp 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-10Avp 紫外检测器, ANASTAR 色谱工作站, DT-100 光电天平。DIH 和 MYR 对照品自制, 经 HPLC 归一化法检查纯度高于 99.0%; 藤茶药材经沈阳药科大学生药学教研室孙启时教授鉴定。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为二次重蒸水, 其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-2% 冰醋酸 (23:77); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 275 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。在此色谱条件下, 对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备: 精密称取 DIH 50 mg 和



1-双氢杨梅黄素 2-杨梅黄素

1-dihydromyricetin 2-myricetin

图 1 双氢杨梅黄素 (A)、杨梅黄素 (B) 和藤茶 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of dihydromyricetin (A), myricetin (B), and *A. grossedentata* (C)

MYR 5 mg, 分别置于 25 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到 2 mg/mL DIH 储备液和 0.2 mg/mL MYR 储备液。

精密称取 DIH 500 mg 和 MYR 50 mg, 分别置于 25 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到 20 mg/mL DIH 储备液和 2 mg/mL MYR 储备液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取 60℃ 干燥 4 h 的藤茶粉末 0.5 g, 加水 25 mL 煎煮 2 h, 趁热抽滤, 滤渣加 95% 乙醇 25 mL 回流提取 2 h, 趁热抽滤, 合并二次提取液, 加 95% 乙醇 50 mL 放置过夜, 抽滤, 减压回收溶剂, 残渣用甲醇 25 mL 溶解并稀释至刻

\* 收稿日期: 2003-02-25

作者简介: 李瑛琦 (1977-), 女, 吉林省吉林市人, 沈阳药科大学英语药学专业毕业, 现攻读药物分析专业硕士学位。

Tel (024) 23843711-3366 E-mail 2000liyingqi@sina.com.cn

度,精密吸取上清液 0.5 mL,置于 10 mL棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

2.4 线性范围考察: 分别精密吸取 2 mg/mL DIH 储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL和 0.2 mg/mL MYR储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL用甲醇定量稀释至 10 mL,得到系列浓度的对照品溶液,分别进样 20 μL 以对照品溶液浓度为横坐标,对照品色谱峰面积为纵坐标进行线性回归, DIH和 MYR的回归方程分别为:  $Y=23\,435X+13\,351$  ( $r=0.999\,9$ )和  $Y=27\,425X-55\,542$  ( $r=0.999\,7$ ) DIH在 50~500 μg/mL, MYR在 5~50 μg/mL与峰面积呈良好线性关系

2.5 精密度试验: 取同一供试品溶液(产地江西),

按上述色谱条件重复进样 6次, DIH和 MYR浓度的 RSD分别为 1.3% ( $n=6$ )和 2.0% ( $n=6$ )。

2.6 重现性考察: 平行制备 6份供试品溶液(产地江西),测定含量, DIH和 MYR的平均含量(按生药计)分别为 253.5 mg/g (RSD= 2.3%)和 17.0 mg/g (RSD= 3.0%)

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h进样 20 μL,结果表明 12 h内溶液基本稳定,峰面积 RSD= 5.4%。

2.8 回收率试验: 精密称取已知含量的藤茶样品(产地江西),分别加入 20 mg/mL DIH和 2 mg/mL MYR储备液适量,按供试品溶液的制备项下方法操作,取 20 μL进样,结果见表 1

2.9 样品测定结果: 制备供试品溶液,精密吸取 20

表 1 DIH和 MYR的回收率  
Table 1 Recoveries of DIH and MYR

| 序号 | DIH     |         |        |          |       | MYR     |         |        |          |       |
|----|---------|---------|--------|----------|-------|---------|---------|--------|----------|-------|
|    | 加入量 /mg | 测得值 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD/% | 加入量 /mg | 测得值 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD/% |
| 1  | 60      | 56.2    | 93.6   | 97.83%   | 3.0%  | 4       | 3.7     | 92.5   | 95.83%   | 2.7%  |
| 2  | 60      | 60.0    | 99.9   |          |       | 4       | 3.9     | 97.5   |          |       |
| 3  | 80      | 79.6    | 99.5   |          |       | 5       | 4.8     | 96.0   |          |       |
| 4  | 80      | 81.2    | 101.5  |          |       | 5       | 4.7     | 94.0   |          |       |
| 5  | 100     | 96.3    | 96.3   |          |       | 6       | 5.7     | 95.0   |          |       |
| 6  | 100     | 96.2    | 96.2   |          |       | 6       | 6.0     | 100.0  |          |       |

μL注入高效液相色谱仪,记录色谱峰面积,采用平行工作曲线计算不同产地藤茶中 DIH和 MYR的含量,结果见表 2

表 2 不同产地藤茶中 DIH和 MYR含量 ( $n=6$ )

Table 2 Contents of DIH and MYR  
in *A. grossedentata* ( $n=6$ )

|    | DIH/(mg·g <sup>-1</sup> ) | MYR/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|----|---------------------------|---------------------------|
| 江西 | 255.8                     | 16.7                      |
| 广西 | 269.8                     | 29.1                      |
| 福建 | 288.5                     | 26.2                      |
| 湖南 | 243.8                     | 25.5                      |

3 讨论

3.1 色谱条件的选择: 分别用甲醇-水,甲醇-水-冰醋酸,甲醇-水-冰醋酸-四氢呋喃,乙腈-水,乙腈-水-冰醋酸以不同比例进行考察,结果表明乙腈-水-冰醋酸系统不仅使色谱峰峰形好,柱效高,达到理想的分离度,而且使柱压很低; DIH的 λ<sub>max</sub>为 292 nm, MYR的 λ<sub>max</sub>为 254 nm和 375 nm 由于在 375 nm处 DIH几乎无吸收,而在 292 nm处 MYR吸收较小,经考察,用 275 nm作为检测波长,二者均有较好并且相近的检测灵敏度,且峰形好。

3.2 提取条件的确定: 水煎煮 MYR提取较完全, 95%乙醇热回流提取 DIH收率最高,而超声效果不

佳,提取的 DIH较热回流少,并且基本检测不到 MYR 认为单纯用水或醇,以及用不同比例的醇作为提取溶媒均不能使藤茶中的黄酮醇类化合物提取完全,因此,水煎煮 2 h,然后用 95%乙醇热回流提取 2 h,保证两种活性成分均被充分提取出来

References

[1] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997.

[2] Guangxi Health Department. *Names of Guangxi Medicinal Plants* (广西药用植物名录) [M]. Nanning: Guangxi National Publishing House, 1993.

[3] Qin J P, Xue X J, Li J J. Study on chemical constituents from *Ampelopsis grossedentata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1997, 9(4): 41-43.

[4] Zhou X X, Zhou T D. Effects of dihyricetin on contraction of rabbit aortic smooth muscle [J]. *J Mod Apple Pharm* (现代应用药学), 1997, 14(2): 8-11.

[5] Jiang M X. *Pharmacology* (药理学) [M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1992.

[6] Zhou T D, Zhou X X. Isolation, structure determination and pharmacological activity of flavonol from *Ampelopsis grossedentata* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1996, 31(8): 458-461.

[7] Information Center of Chinese Herbal Medicines. State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Components in Phytomedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Bei-

jing People's Medical Publishing House, 1986.

- [8] He G X, Pei G, Feng Y B, *et al.* Determination of dihydromyricetin in *Ampelopsis grossedentata* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2000, 23(4): 210-212.

- [9] He G X, Pei G, Zhou T D, *et al.* Determination of total flavonoids and dihydromyricetin in *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(7): 423-425.

## 苦地丁提取物中原阿片碱和延胡索乙素的 HPLC 分析

张经硕, 周巧霞, 徐丽华, 顾振纶\*

(苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

苦地丁为罂粟科植物紫堇 *Corydalis bungeana* Turcz. 的干燥全草, 含有多生物碱, 其中原阿片碱和延胡索乙素是主要有效成分<sup>[1]</sup>, 具有抑制血小板聚集, 松弛平滑肌, 抗心律失常, 解痉止痛等药理作用<sup>[2]</sup>。原阿片碱和延胡索乙素的测定方法, 文献报道有薄层扫描法<sup>[3]</sup>。本实验建立了苦地丁提取物中原阿片碱和延胡索乙素的 RP-HPLC 法, 结果较为满意。

### 1 仪器与试剂

Waters 501 高效液相色谱仪 (WDL-95 色谱工作站, Waters 484 紫外检测器, Waters 7725 进样阀); Sartorius BS110S 电子天平 (万分之一); JHN-2A 型超声清洗器 (上海杰恩普超声设备有限公司); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂)。

重蒸水, 冰醋酸, 三乙胺, 氨水均为分析纯, 甲醇为色谱纯。苦地丁药材购于安徽亳州药材市场 (产地为江西), 经本所鉴定; 原阿片碱对照品和延胡索乙素对照品为本所自制 (已经四谱鉴定, 且纯度 > 98%); 苦地丁提取物为本所自行提取。

### 2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备: 精密称取原阿片碱和延胡索乙素对照品各约 5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 2% 醋酸使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液制备: 精密称取苦地丁提取物约 12.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 2% 醋酸使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

#### 2.3 色谱条件的选择

2.3.1 pH 的影响: 分别配制 pH 值为 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 % 氨水-甲醇 (50: 50, 冰醋酸调 pH 值) 作为流动相, 分析供试品溶液。结果表明: pH 在 6.0~6.5 时原阿

片碱和延胡索乙素的峰形和分离度较好; pH 降低, 峰形变窄, 保留时间缩短, 但原阿片碱和延胡索乙素两峰部分重叠; pH 升高, 峰形变宽, 保留时间延长。故选择 pH 为 6.30 左右。

2.3.2 氨水浓度的影响: 分别配制含氨水 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% 的流动相, 分析供试品溶液。结果表明: 氨水由 0.2% 增加到 0.4% 时, 峰形变窄, 分离度变好; 由 0.4% 增加到 0.6%、0.8% 时, 峰形和分离度无明显变化。故选用氨水浓度为 0.4%。

2.3.3 三乙胺浓度的影响: 分别配制含三乙胺 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% 的流动相, 分析供试品溶液。结果表明: 加入三乙胺后, 峰形变窄, 分离度变大, 保留时间缩短; 三乙胺由 0.2% 增加到 0.8% 时, 峰形、分离度和保留时间持续改善; 由 0.8% 增加到 1.0% 时, 峰形、分离度和保留时间无明显变化。故选择三乙胺为 0.8%。

2.3.4 甲醇浓度的影响: 分别配制甲醇-水不同比例的流动相, 分析供试品溶液。结果表明: 甲醇比例增加, 分离度变差, 故选择甲醇-水 (50: 50)。

2.4 色谱条件: 色谱柱: Waters C<sub>18</sub> 柱 (填料:  $\mu$  Bandapak<sup>TM</sup>; 粒径: 10  $\mu$  m; 规格: 300 mm  $\times$  3.9 mm); 流动相: 甲醇-水-三乙胺-氨水 (50: 50: 0.8: 0.4, 冰醋酸调 pH 6.30 左右); 检测波长: 285 nm; 流速: 0.9 mL/min; 灵敏度: 0.100 AUFS; 柱温: 室温 (25  $^{\circ}$ C)。

2.5 标准曲线的制作: 精密吸取不同浓度的原阿片碱对照品溶液 (0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 mg/mL) 和延胡索乙素对照品溶液 (0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 mg/mL) 5  $\mu$  L 分别注入高效液相色谱仪测定峰面积。以峰面积对浓度作图, 求得标准曲线回归方程。原阿片碱:  $Y = 2.876 \times 10^6 X - 5416.559$  ( $r = 0.9999$ ); 延胡索乙素:  $Y = 1.319 \times$