

2.3 干扰性考察: 分别吸取供试品液、阴性对照溶液、对照品溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪。结果在葛根素峰对应的保留时间处无干扰杂质峰, 见图 1。

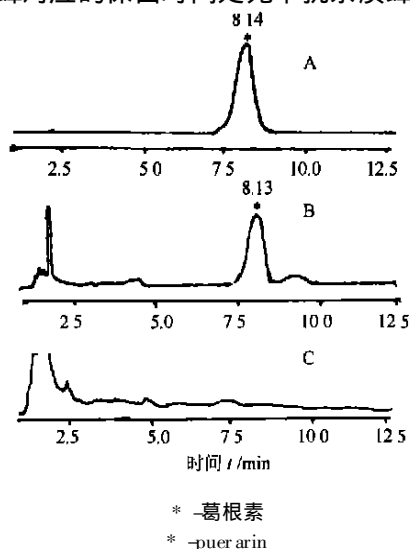


图 1 葛根素对照品(A)、通脉口服液(B)和缺葛根的阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of puerarin reference substance (A), Tongmai Oral Liquid (B), and negative sample without *Radix Puerariae* (C)

2.4 线性关系的考察: 分别精密吸取葛根素对照品溶液 1、2、3、5、8、10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇至刻度, 摇匀, 各进样 20 μL , 测定峰面积值。以葛根素的质量浓度为横坐标, 峰面积值为纵坐标作图得一直线, 其回归方程为 $Y = 94.207 X + 13.642$, $r = 0.9999$ 。表明葛根素在 0.159 ~ 1.597 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取供试品溶液 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 重复 5 次, 测定峰面积, 结果葛根素峰面积的 RSD 为 0.74%。

2.6 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 测定峰面积, 结果葛根素峰面积的 RSD 为 1.10%。结果表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验: 取同一批样品(批号: 030705) 5 份, 制备供试品溶液, 测定, 结果葛根素峰面积的 RSD = 0.65%。

2.8 加样回收试验: 精密吸取样品(批号: 030705) 0.5 mL, 共 6 份, 分别精密加入葛根素对照品溶液适量, 按供试品溶液的制备方法操作。精密吸取 20 μL , 注入色谱仪, 依法测定, 结果平均回收率为 100.26%, RSD 为 0.36% ($n = 6$)。

2.9 样品测定结果: 精密吸取对照品溶液和样品供试液各 20 μL 进样, 记录峰面积, 按外标法计算 10 批样品中葛根素含量, 结果分别为 6.86、7.05、7.43、6.96、7.28、7.14、7.09、6.89、7.24、7.17 mg/mL ($n = 2$)。

3 讨论

供试品溶液的制备中使用正丁醇、甲醇、30% 甲醇、30% 乙醇进行定容, 结果以 30% 乙醇直接定容效果最佳。对流动相甲醇-水(25 : 75)、甲醇-1.8% 醋酸溶液(20 : 80)的考察表明, 甲醇-水(25 : 75)效果好, 使葛根素和相邻成分的分离度为 1.93, 葛根素理论板数为 3 285。

四神丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 HPLC 分析

甄攀, 白雪梅, 王治宝*

(河北北方学院, 河北 张家口 075000)

四神丸由肉豆蔻、补骨脂、五味子、吴茱萸、大枣组成, 具有温肾暖脾、涩肠止泻的功效。用于命门火衰、脾肾虚寒、五更泄泻或便溏腹痛、腰酸肢冷等病症。吴茱萸是其主要组成部分, 具有温胃止吐、温脾止泻、镇痛、升高体温、轻度影响呼吸与血压的作用^[1]。吴茱萸的主要成分为挥发油和生物碱, 生物碱

包括吴茱萸碱(evodiamine)和吴茱萸次碱(rutaecarpine)等。本实验在参考文献^[2~4]的基础上, 利用甲醇提取吴茱萸碱和吴茱萸次碱, 用 HPLC 法检测, 建立了四神丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的分析方法。该方法稳定性高、重现性好、操作简单, 是四神丸质量监控较理想的方法。

* 收稿日期: 2004-01-11

作者简介: 甄攀(1965—), 女, 副教授, 硕士, 主要从事中药及天然植物成分研究。

Tel: (0313) 8041654 E-mail: zhenpan8051226@yahoo.com.cn

1 仪器与试药

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, HP HPLC (3D) 化学工作站。吴茱萸碱(批号: 802-9401)和吴茱萸次碱(批号: 801-9001)对照品由中国药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈为色谱纯试剂, 其他试剂均为分析纯试剂, 水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: YWG-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 10 μm); 流动相: 水-甲醇-乙腈梯度洗脱, 0~15 min, 水-甲醇-乙腈(40 30 30), 15~27 min, 乙腈-水(70 30), 27 min 以后, 水-甲醇-乙腈(40 30 30); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ; 检测波长: 225 nm。

2.2 工作曲线的制备: 精密称取吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品 1.0 mg 和 0.9 mg, 用甲醇溶解并稀释至 1.0 mL, 按 1 10、1 20、1 50、1 100、1 200 稀释得标准系列。定量阀进样, 进样量为 20 μL。以峰面积(Y)对质量浓度(X)作图, 得工作曲线, 拟各回归方程。吴茱萸碱: $Y = 147.37 X + 1186.32$, $r = 0.9999$, 线性范围: 5.0~1000 μg/mL; 吴茱萸次碱: $Y = 101.19 X + 279.81$, $r = 0.9999$, 线性范围: 4.5~900 μg/mL。

2.3 检测限试验: 用吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品溶液逐级稀释后进样。用峰高相当于 3 倍噪音标准差时对照品的质量浓度表示。吴茱萸碱的最低检测质量浓度为 0.10 μg/mL, 吴茱萸次碱的最低检测质量浓度为 0.18 μg/mL。

2.4 精密度试验: 取吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品溶液重复进样 6 次, 每次进样 20 μL, 记录峰面积, 计算得吴茱萸碱和吴茱萸次碱的峰面积 RSD 分别为 0.85% 和 0.63%。

2.5 稳定性试验: 取四神丸供试品溶液于 1、2、8、16、24、48 h 进样分析, 每个时间点进样 3 次, 每次进样 20 μL, 记录峰面积。结果吴茱萸碱峰面积的 RSD 为 1.26%, 吴茱萸次碱峰面积的 RSD 为 1.39%。说明四神丸的甲醇提取液在 48 h 内稳定。

2.6 重现性试验: 四神丸(批号: 20020801) 3 份, 每份约 2 g, 制备供试品溶液, 每次进样 20 μL。结果吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 1.02% 和 0.99%。

2.7 回收率试验: 精密称取四神丸(批号: 20020801) 3 份, 约 0.75 g, 准确加入一定量的吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品, 制备供试品溶液, 测定, 计算回收率, 结果吴茱萸的平均回收率为 99.83%,

RSD = 1.35%; 吴茱萸次碱的平均回收率为 98.72%, RSD = 2.97% ($n = 5$)。

2.8 样品分析: 取各种四神丸适量, 粉碎, 精密称定, 分别用甲醇浸泡 0.5 h, 用索氏提取器提取 2.0 h, 滤过, 均定容至 50 mL。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。定量阀进样, 每次进样 20 μL。残渣经检验, 没有吴茱萸碱和吴茱萸次碱色谱峰。色谱图见图 1, 测定结果见表 1。

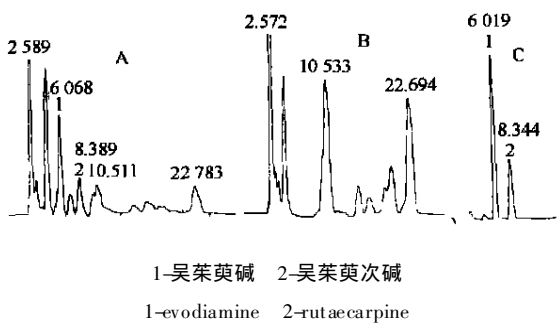


图 1 四神丸(A)、阴性样品(B)和对照品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of Sishen Pill (A), negative sample (B), and reference substances (C)

表 1 四神丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量

Table 1 Evodiamine and rutaecarpine in Sishen Pill

样 品	生产公司	生产批号	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
			$/(mg \cdot g^{-1})$	$/(mg \cdot g^{-1})$
四神丸	邢台市人民药业	20020801	1.716	0.995
		20020602	1.603	0.950
四神丸	唐山天恩药业有限公司		1.640	1.018
肉蔻四神丸	北京中药二厂	1080085	0.346	0.385
		1080116	0.378	0.410

3 讨论

吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品用甲醇溶解后, 在 200~400 nm 扫描, 吴茱萸碱和吴茱萸次碱在 225 nm 波长处都有较大吸收, 因此选定 225 nm 作为检测波长。

比较了水、酸水、碱水、甲醇和乙醇对吴茱萸碱和吴茱萸次碱的提取效率。发现水、酸水、碱水不能提出吴茱萸碱和吴茱萸次碱; 甲醇较乙醇提取效率高, 因此用甲醇作为提取溶剂。

如果采用乙腈-甲醇-水(40 40 30)等梯度洗脱, 样品中各组份已得到了良好的分离, 但最后一个组份洗脱出柱很晚(保留时间约为 40 min), 且在其前面较长一段时间没有色谱峰。因此, 为了节省时间, 在进样 15 min 后设置了梯度洗脱, 将最后一个组份的保留时间提前到 22.78 min, 既加快了分析速度, 又保证了良好的重现性。

致谢:得到了实验中心王德宝、贾天军、罗强等的热情帮助!

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House. 1977.
[2] Hou X H, Yu Z G, Du H L, *et al.* Determination of the rutaecarpine in the rat plasma by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm U-*

niv (沈阳药科大学学报), 2001, 18(5): 335.
[3] Li Q Y, Hong X K, Wang Z H, *et al.* Determination of evodiamine in *Fructus Evodia* by high performance capillary electrophoresis [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(6): 370.
[4] Hou X H, Yu Z G, Xu Z M, *et al.* Determination of the contents of evodiamine and rutaecarpine in 34 species of *Evodia Rutaecarpa* by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(5): 334.

月见草油中 γ -亚麻酸柱色谱分离纯化的正交试验优选

薛 刚^{1,2}, 刘凤霞^{1,2}, 黄开勋¹, 高伟霞², 张立华^{3*}

(1. 华中科技大学, 湖北 武汉 430074; 2. 南阳理工学院 生物与化学工程系, 河南 南阳 473004;
3. 南阳普康药业有限公司, 河南 南阳 473004)

富集月见草油中 γ -亚麻酸的方法主要有有机溶剂萃取法、银离子树脂色谱法、真空精馏法、冷冻结晶法、尿素包合法和超临界 CO₂ 萃取法等^[1]。国内主要采用尿素包合法^[2], 或从月见草油中分离高浓度 γ -亚麻酸甲酯^[3]。低温结晶法得到 γ -亚麻酸只有 30% ~ 50%, 真空分馏法得到的 γ -亚麻酸纯度为 80%。只有纯度大于 90% 的 γ -亚麻酸才可以合成二高 γ -亚麻酸。采用银离子树脂色谱法可以达到要求, 但在分离过程中有银离子, 对制药不利。因此本实验尝试采用硅胶柱色谱法对月见草油中的 γ -亚麻酸进行富集, 为二高 γ -亚麻酸的合成提供原料。

1 仪器和材料

GC—14B 气相色谱仪(日本岛津), 硅胶(青岛海洋化工厂), 月见草油(江西), γ -亚麻酸(尿素包合物, 自制), 尿素(山西天脊化工股份有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 γ -亚麻酸的测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: 300 m 长的毛细管柱, PEG-20 m 极性柱, 温度: 230 , 进样口温度: 250 , 检测器 280 , 压力: N₂ 140 kPa, H₂ 70 kPa, 空气 50 kPa。

2.1.2 测定: 取 γ -亚麻酸 0.1 g 置 10 mL 具塞试管中, 加入 0.5 mol/L KOH 甲醇溶液 2 mL 于 63 水浴上皂化 20 min, 加入 BF₃-乙醚溶液(1 : 1) 0.2 mL, 63 水浴上甲酯化 5 min, 取出冷水冷却, 加 2 mL 石油醚, 振摇, 吸取上层 2 μ L 进样, 按面积归一

法计算。其中 γ -亚麻酸保留时间在 16.6 min 左右。

2.2 柱色谱分离法: 称取硅胶 100 g, 120 活化 1.5 h, 加入等体积的氯仿, 摇匀。取两支色谱柱(40 cm $\times$ 2 cm), 各先加 20 mL 氯仿, 然后加入硅胶, 轻轻敲打装完后垫上一层滤纸, 加适量无水硫酸钠, 打开旋塞, 用氯仿洗柱 1 h, 将尿素包合后得到的 γ -亚麻酸用等体积的氯仿溶解后加入, 收集 30 min 以后的产物, 回收氯仿和甲醇, 得产物。

2.3 正交试验设计及分析: 由于实验的目的是通过柱色谱纯化不同含量 γ -亚麻酸, 因此对 γ -亚麻酸质量分数(A)考虑了 4 个水平, 同时考虑了硅胶的粒度(B)、流动相氯仿-甲醇的配比(C)和色谱分离次数(D), 见表 1, 选用 L₈(4 $\times$ 2⁴) 正交表(表 2), 并进行方差分析(表 3)。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	A	B/目	C	D
1	60	100 ~ 200	90 10	1
2	65	200 ~ 300	100 0	2
3	70			
4	75			

从表 2 可知, 最优组合为 A₄B₁C₁D₂ 即 γ -亚麻酸质量分数为 75%, 硅胶粒度为 100 ~ 200 目, 流动相配比为 90 10, 色谱分离次数为两次。

通过方差分析, 说明 A、B 因素达到了显著水平, 应控制在最优水平, 即 A₄B₁, C 和 D 因素不显著, 可以在任意水平, 为方便操作, C 应在 C₂ 水平, 即用氯仿作为流动相, 为节省成本和省时, D 因素应

* 收稿日期: 2004-02-18
作者简介: 薛 刚(1961—), 副教授, 硕士, 从事生化工程的教学和生物制药的研究工作。