

于岗松油的主成分分析和确认。

References:

- [1] Ji X D, Zhao G L, Pu Q L, *et al.* Analysis of the essential oil from *Baeckea frutescens* L. by GC-MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1980, 15 (12): 766.
- [2] Shen M Y, He Z H, Liu H. Studies on chemical constituents of the essential oil from *Baeckea frutescens* L. [J]. *Guangxi*

Forest Sci Tech (广西林业科技), 1993, 22(4): 157.

- [3] Liu B M, Lai M X, Liang K N, *et al.* Study on the quality analysis of essential oil from *Baeckea frutescens* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29 (6): 539-542.
- [4] Zhou Y X. *Studies on the Technics of the Fingerprint of Chinese Materia Medica* (中药指纹图谱研究技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.

HPLC 法测定夏天无注射液中原阿片碱

朱才庆^{1,2}, 范其坤¹, 熊胜泉¹, 姚 闯¹, 余 华^{1*}, 魏东芝²

(1. 江西省药物研究所 天然药物研究室, 江西 南昌 330029; 2. 华东理工大学
生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎或全草, 又名一粒金丹、野延胡、伏地延胡索, 具有降压镇痉、活血通络、祛瘀、行气止痛等功效, 临床上用于脑梗死、周围神经损害性瘫痪、腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、高血压等疾病及中小学生假性近视的治疗^[1]。药理研究表明, 夏天无可明显拮抗东莨菪碱或 D-半乳糖引起的动物(小鼠或大鼠)记忆获得障碍, 并能显著降低动物脑内乙酰胆碱酯酶的活性, 具有显著的促智作用及增强动物学习记忆的功能^[2,3]。夏天无中有效部位为生物碱, 原阿片碱为其中的主要活性成分。夏天无及其制剂中原阿片碱的测定方法有比色法、薄层扫描法^[4,5]和高效液相色谱法^[6]。本实验采用 HPLC 测定夏天无注射液中原阿片碱的方法简便快速、结果准确且重现性好, 可作为夏天无注射液的质量控制方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司), 包括 P200 II 型高压恒流泵, UV200 II 紫外可变波长检测仪, Rheodyne 7725i 高压六通进样阀, 20 μ L 定量环; HW 色谱工作站(南京千谱软件有限公司); M3 型百万分之一电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

夏天无注射液(江西余江制药厂); 原阿片碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110853-200201); 甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 1% 三乙胺-甲醇(40:60), 使用前用孔径为 0.45 μ m 有机滤膜减压滤过, 超声 20 min; 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长: 286 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L。

2.2 可行性试验: 精密称取经 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的原阿片碱对照品 0.658 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 1% 盐酸溶液溶解, 定容, 混合均匀, 制成 26.32 μ g/mL 对照品溶液。另取夏天无注射液, 制备成供试品溶液, 分别进样, 结果原阿片碱峰保留时间为 7.681 min, 分离具有很好的效果, 见图 1。

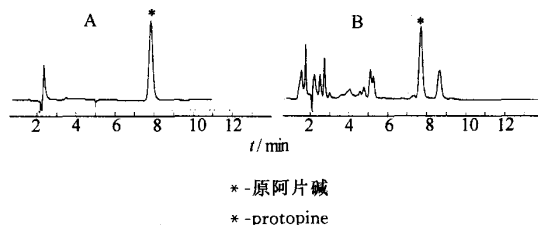


图 1 原阿片碱对照品(A)和夏天无注射液(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of protopine reference substance (A) and Xiatianwu Injection (B)

2.3 线性关系考察: 精密称取经 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的原阿片碱对照品 1.291 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 1% 盐酸溶液溶解并加至刻度, 摇匀, 制成 51.64 μ g/mL 储备溶液。分别取上述储备液 1、2、3、4、5、6 mL, 用 1% 盐酸定容至 10 mL。精密吸取上述对照

收稿日期: 2004-09-14

基金项目: 江西省重大科技攻关项目(赣科发计字[2002]64号)

作者简介: 朱才庆(1973—), 男, 江西信丰人, 工学博士, 现为华东理工大学、江西省药物研究所联合培养博士后, 研究方向为天然药物有效成分的分离纯化。E-mail: zhucqing@sohu.com

* 通讯作者 Tel: (0791) 8106317 Fax: (0791) 8101739 E-mail: jxyuhua@sina.com.cn

品溶液 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。结果原阿片碱 $5.164 \times 10^{-3} \sim 3.098 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$ 与峰面积具有良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 2 \times 10^7 X + 615.88$, $r = 0.9999$, 检测限为 $9.4 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}$ 。

2.4 精密度试验: 精密吸取原阿片碱对照品溶液 ($7.2 \mu\text{g/mL}$) 20 μL 重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算得其 RSD 为 1.309%。

2.5 稳定性试验: 取同一夏天无注射液供试品溶液 (保存于室温条件下), 于 0、2、4、6、8、12、24、48 h 进样 20 μL , 测定原阿片碱峰面积, 计算得其 RSD 为 0.346%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.6 重现性试验: 取同一批号夏天无注射液, 分别平行制备 5 份供试品溶液, 进样测定, 结果原阿片碱的质量浓度的 RSD 为 1.171%。

2.7 加样回收试验: 精密量取含原阿片碱 $40.03 \mu\text{g/mL}$ 样品 1.0 mL, 分别精密加入 $40.23 \mu\text{g/mL}$ 原阿片碱对照品溶液 1.0 mL, 稀释至 10 mL, 进样测定, 计算得平均回收率为 101.1%, RSD 为 1.857% ($n=5$)。

2.8 样品的测定: 取夏天无注射液 1 mL, 定容到 25 mL, 摇匀, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径的有机滤膜, 收集滤液, 作为供试品溶液。精密吸取供试品溶液各 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 计算夏天无注射液中原阿片碱的质量浓度, 结果见表 1。

表 1 夏天无注射液中原阿片碱的测定结果

Table 1 Protopine in Xiatianwu Injection

批 号	原阿片碱/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
040620-1	0.478 8	1.60
040620-2	0.356 5	1.78
040620-3	0.438 0	0.09
040620-4	0.403 9	1.43
040620-5	0.440 6	0.595
040620-6	0.365 4	1.10

3 讨论

夏天无及其制剂中有效成分原阿片碱的测定先后报道了一些不同方法。利用紫外分光光度法测定其中原阿片碱, 实际上是总生物碱, 而夏天无中含有除原阿片碱之外的多种生物碱类成分, 因此, 该方法的专属性不强, 另外在生产和检验中发现该方法操作较为繁琐, 存在一定的误差。《中华人民共和国药典》2000 年版采用薄层-紫外扫描法, 虽然在一定程度上提高了专属性, 但是在测定过程中溶液要多次

转移, 二次展开, 操作仍然繁琐, 要求高, 也很容易产生误差。

本实验进行 HPLC 法测定夏天无注射液中的原阿片碱的方法学研究。利用原阿片碱溶液在紫外光范围内扫描, 发现原阿片碱在 286 nm 处有最大吸收, 因此选择检测波长为 286 nm。在选择流动相时, 采用甲醇-乙酸钠/冰醋酸缓冲溶液 (75:25, pH 5.0) 为流动相^[7], 但峰拖尾严重, 分离效果差; 改用 1% 三乙胺-甲醇 (30:70) 为流动相^[8]时, 出峰时间为 5.700 min, 时间太短, 理论塔板数仅有 2 420, 分离效果仍不理想。经过摸索, 发现采用 1% 三乙胺-甲醇 (40:60) 为流动相, 目标物原阿片碱出峰时间为 7.681 min, 理论塔板数大大增加, 高达 7 657, 目标物分离效果非常好且专属性很强。与报道的 HPLC 法相比^[6], 本法采用样品稀释后直接进样, 流动相不必使用乙腈, 不需三乙胺调解流动相的 pH 值, 操作安全性增加, 且更为简化, 在不影响分离效果的情况下原阿片碱出峰时间缩短, 提高了工作效率, 降低了质量控制成本。

References:

- [1] Chen R, Yang S H, Tang X L. Advances in the studies on *Corydalis decumbentis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (2): 948-949.
- [2] Sheng R, Gu Z L, Jiang H, et al. Effects of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* on ability and brain acetylcholinesterase learning and memory activity in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (6): 543-545.
- [3] Deng X P, Gu Z L, Xie M L. Effects of total alkaloids from *Rhizoma Corydalis Decumbentis* on scopolamine and D-galactose-induced learning and memory impairment in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (4): 350-352.
- [4] Zhu P Q. Primary investigation of determination of total alkaloids from *Rhizoma Corydalis Decumbentis* by extraction colorimetry [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996, 18 (1): 18-19.
- [5] Luo Y H, Xiong W, Xu Y, et al. Determination of protopine in *Corydalis decumbentis* by TLCS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (9): 669-670.
- [6] Gu X H, Tang P, Jin Z Y. Determination of protopine in *Rhizoma Corydalis Decumbentis* by RP-HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13 (10): 608-609.
- [7] Liu X M, Liu Y, Liao H W. Determination of protopine and tetrahydropalmatine in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24 (3): 209-232.
- [8] Zhang X F, Wang H. Determination of the content of chelidonine and protopine in Ruitong Injection by HPLC [J]. *Qinghai Med J* (青海医药杂志), 2001, 31 (2): 36-37.