

表 1 延胡索止痛滴丸中延胡索乙素的测定结果 ($n=3$)Table 1 Determination of tetrahydropalmatine in Yanhusuo Zhitong Dropping Pills ($n=3$)

批 号	延胡索乙素/ (mg·丸 ⁻¹)	批 号	延胡索乙素/ (mg·丸 ⁻¹)
050421	0.078	050426	0.074
050422	0.077	050427	0.076
050423	0.074	050428	0.075
050424	0.076	050429	0.079
050425	0.073	050430	0.078

RP-HPLC 法测定延胡索及其制剂元胡止痛片中延胡索乙素

李惠芬, 刘 芳, 朱丽丽

(天津医科大学药学院, 天津 300070)

延胡索是罂粟科紫堇属延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的块茎, 含有多种生物碱成分, 其中延胡索乙素(四氢巴马汀)是其生物碱中的代表性成分。延胡索乙素具有镇痛、镇静、麻醉、降压、促肾上腺分泌、抗菌、抗溃疡的功效, 广泛应用于临床。以延胡索、白芷为主要原料的元胡止痛片, 具有理气、活血、止痛等功效, 主要用于气滞血瘀的胃痛、肋痛、头痛及痛经等。本实验建立了高效液相色谱测定延胡索乙素, 为该药质量标准提供了参考。

1 仪器与试药

美国 Waters 高效液相系统, 2487 双波长紫外检测器, 515 双泵, 柱温箱, Millennium³² 色谱管理系统; 日本岛津 UV-240 型紫外-可见分光光度计; AS5150 超声波清洗器。延胡索乙素(中国药品生物制品检定所, 批号 0726-200407); 元胡止痛片(天津同仁堂股份有限公司); 延胡索(天津中药饮片厂, 经天津中医学院第一附属医院尚英合主任药师鉴定); 缺延胡索元胡止痛片阴性样品(实验室自制); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Prodigy ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 流动相为乙腈-0.05% 磷酸 (45:55, 三乙胺调 pH8.6), 测定波长为 280 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取经减压干燥的

3 讨论

3.1 样品提取方法的考察: 分别考察了 60% 甲醇浸泡 24 h、60% 甲醇超声提取 15 min、氨水碱化后甲醇超声提取 15 min, 甲醇超声 0.5、1、2 h, 结果以甲醇超声 2 h 提取最完全。

3.2 流动相的选择: 曾选用乙腈-KH₂PO₄、甲醇-三乙胺、甲醇-不同 pH 值磷酸盐缓冲溶液等作为流动相, 但均未达到理想的分离效果, 本实验采用的流动相取得了良好的分离效果。

延胡索乙素对照品 10.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.2 药材供试品溶液的制备: 取已干燥的延胡索适量, 粉碎过 50 目筛, 精密称取 4.000 g 置于 100 mL 碘量瓶, 加甲醇 50 mL, 放置过夜, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 0.1% 稀盐酸 10 mL 溶解, 用浓氨水调 pH 9~10, 用乙醚萃取 3 次, 每次 10 mL, 至水层检识反应为阴性, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 作为药材供试品溶液。

2.2.3 片剂供试品溶液的制备: 取已干燥的元胡止痛片 100 片, 去包衣干燥, 研细, 精密称取粉末 4.000 g, 置 100 mL 碘量瓶后, 其他操作同 2.2.2 项。

2.2.4 阴性对照溶液的制备: 依元胡止痛片处方组成除去延胡索后, 根据样品制备工艺制备阴性对照, 同 2.2.2 项制得阴性对照溶液。

2.3 阴性干扰试验: 按上述色谱条件, 吸取阴性对照溶液、对照品溶液、片剂及药材供试品溶液各 10 μ L 进样, 记录色谱图。结果药材和片剂供试品色谱图中, 与对照品色谱峰相应位置上各有一相同保留时间的色谱峰, 而阴性对照溶液在此保留峰位无干扰峰。见图 1。

2.4 标准曲线及线性范围: 上述色谱条件下, 分别精密吸取延胡索乙素对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μ L 进样, 得回归方程为 $Y=8.97 \times 10^5 X+9.68 \times 10^4$, $r=0.9999$ 。表明延胡索乙素在 0.776~7.760

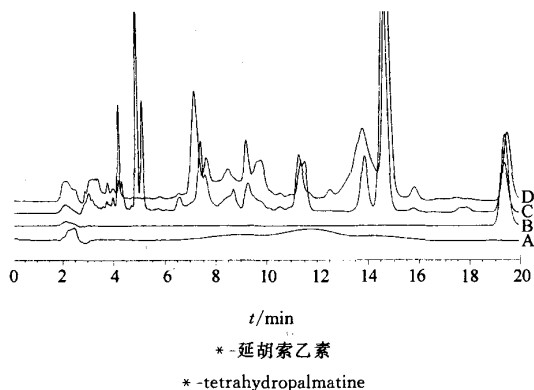


图 1 阴性对照(A)、延胡索乙素对照品(B)、元胡止痛片(C)和延胡索药材(D)HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of negative sample (A), tetrahydropalmatine reference substance (B), Yuanhu Zhitong Tablets (C), and Yanhusuo (D)

μg 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取同批片剂供试品溶液,连续进样 5 次,每次 $10\ \mu\text{L}$,测定延胡索乙素峰面积积分值,计算得其 RSD 为 0.14%。

2.6 重现性试验:精密称取片剂供试品粉末 4.000 g,制备供试品溶液,在相同条件下每次进样 $10\ \mu\text{L}$,测定同一批号样品 5 份,得各峰面积积分值,计算样品中延胡索乙素的质量分数,结果 RSD 为 1.29%。

2.7 稳定性试验:精密吸取片剂供试品溶液,在上述色谱条件分别于 0、1、4、8、12 h 进样,每次 $10\ \mu\text{L}$,测定延胡索乙素峰面积积分值,计算得 RSD 为 0.52%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验:精密称取同批片剂粉末 2.000 g,5 份,定量加入延胡索乙素对照品溶液 2 mL,制备供试品溶液,同上述色谱条件进样,每次 $10\ \mu\text{L}$,结果平均加样回收率为 97.97%,RSD 为 1.01%。

2.9 样品测定:分别制备延胡索药材及其制剂元胡止痛片供试品溶液每批各 5 份,同一色谱条件下进样 $10\ \mu\text{L}$,测定延胡索乙素的峰面积,采用外标法计算样品中延胡索乙素的质量分数,结果见表 1。

3 讨论

3.1 提取方法的选择:本实验选用超声提取法,操作简便,提取率高,并可有效地避免了高热对延胡索乙素氧化的影响。由于延胡索乙素受光受热易氧化成巴马汀,而巴马汀无明显镇痛作用。本法保证延胡索中有有效成分有效提取。

3.2 提取溶剂的选择:延胡索的有效成分主要为原小檗碱型生物碱,选择甲醇作为提取溶剂,既可相对减少药材中黏液质、淀粉、蛋白质等杂质的提出,又

表 1 延胡索药材及其制剂元胡止痛片中延胡索乙素的测定结果($n=5$)

Table 1 Determination of tetrahydropalmatine in *C. yanhusuo* and Yuanhu Zhitong Tablets ($n=5$)

批 号	药 材		元胡止痛片	
	延胡索乙素/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %	延胡索乙素/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %
1	0.30	1.21	0.37	2.21
2	0.31	1.27	0.39	1.48
3	0.32	1.12	0.40	1.29

因甲醇沸点较低,易于浓缩且可防止由高热引起的延胡索乙素氧化发生。

3.3 HPLC 法检测波长的选择:用延胡索乙素对照品溶液,以紫外分光光度法在 200~400 nm 扫描,结果在 281 nm 处有最大吸收峰,与文献中选定的最大吸收波长 280 nm^[1~3]相近,为使检测波长在使用时达到统一,故选用 280 nm。

3.4 流动相的选择:季铵生物碱具有极性大、碱性强的特点,在中性醇水条件下,分离效果差,峰拖尾现象严重,本实验所选用的流动相中加入稀磷酸用以改善分离效果,并用三乙胺调节其 pH 值,即达到离子抑制色谱法的目的又起到减尾剂的功效。

实验中采用甲醇-0.05%磷酸(三乙胺调 pH 值),单味药材中延胡索乙素能达到较好分离,但片剂中延胡索乙素的分离效果不佳,发现未知组分对延胡索乙素有干扰。为使延胡索乙素达到良好分离,选择了 65:35、62:38、60:40、59:41、56:5:43.5、55:45 比例条件。其中 65:35 比例条件下,延胡索乙素与未知组分发生重叠,没有达到良好分离,与文献报道有区别^[3]。当配比为 55:45 时,延胡索乙素与未知组分达到良好分离,保留时间分别为 57.896、63.556 min,但峰形展宽,扩散现象加强,此分离条件也不利于试验。当改用乙腈-0.05%磷酸(45:55,三乙胺调 pH 值)后,无论对单味药还是片剂中延胡索乙素均达到良好的效果,可见,流动相组成直接影响分离效果。

3.5 流动相中磷酸盐浓度和柱温的选择:相同条件下,选择了 1%、0.05%磷酸盐,在相同分离效果情况下,选用 0.05%磷酸盐,既可缩短保留时间,又延长柱寿命。在温度选择方面分别进行了 35、40℃两种不同柱温试验,发现 40℃时分离效果更好,保留时间较短,故选用 40℃。

3.6 流动相 pH 值条件的选择:关于 pH 值的选定,分别进行了 pH 8.0、8.2、8.5、8.6、8.7、8.8、9.0 试

验, pH 8.6 时, 峰形对称, 分离度高, 保留时间 20 min 左右, 故选用 pH 8.6。

References:

- [1] Yuan Y F, Li X L, Liu Z L, et al. Determination of tetrahydropalmatine in *Corydalis Rhizoma* by SFE and HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31(4): 282-286.

- [2] Yang T Z. Determination of tetrahydropalmatine in Weidekang Powders by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(1): 31.
- [3] Liu J H, Wei J F, Wang H Z, et al. The extraction and separation of alkaloids in *Corydalis Rhizoma* with macroporous resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 37-38.

当归的炮制对当归补血汤中活性成分的影响

赵奎君¹, 钟 萌¹, 杨思来¹, 董婷霞², 詹华强²

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 香港科技大学 生物系 香港)

当归补血汤为金元四大家之一的李东垣所创, 至今已有近 800 年的历史, 由当归与黄芪两味中药按照质量比 1:5 组成, 具有补气生血的功效。主治血虚发热或妇女经期、产后血虚发热头痛之症。原方中当归要用酒制(酒洗)才可入药。然而现代研究中, 不论是当归补血汤方剂还是由此衍生的成药, 如当归补血丸、当归补血胶囊、当归补血口服液中, 当归都没有要求炮制使用。当归所含阿魏酸、藁本内酯、当归多糖, 黄芪中所含黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、黄芪多糖为当归补血汤中补血的有效成分^[1,2]。为探讨酒制当归对该方剂的影响, 本实验对当归炮制前后当归补血汤中阿魏酸、藁本内酯、黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮 5 种活性成分和总多糖进行了测定, 以探讨古方中当归酒制的合理性。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪, 包括 LC-10Avp 泵、DAD SPD-M10Avp 紫外-可见光检测器, C-R6A 数据处理机。722G 型分光光度计(上海光学仪器厂)。

黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所), 阿魏酸对照品(Sigma 公司), 芒柄花素、毛蕊异黄酮、藁本内酯对照品由北京大学药学院屠鹏飞教授提供。右旋糖苷(相对分子质量 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$, Sigma 公司)。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

黄芪采自山西, 当归采自甘肃岷县, 分别经过笔者鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao 和当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 酒制当归的制备: 取生当归饮片 200 g, 加黄酒 20 mL, 拌匀, 文火炒干, 得酒制当归 180 g, 得率为 90%。

2.2 生品当归与酒制当归入药的当归补血汤的制备: 将黄芪、生当归和酒制当归粉碎成粗粉, 分别按照质量比 1:5 混合, 总量约 30 g。加水 240 mL, 加热, 沸腾后保持 40 min。煎煮 2 次, 滤过, 滤液离心, 合并 2 次上清液, 冰冻干燥, 即得生当归和酒制当归制备的当归补血汤样品。另取生当归、酒制当归和黄芪粗粉同法制备生当归、酒当归、黄芪单味药提取物。

2.3 色谱条件: NOVA-PAK C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 4 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱。黄芪甲苷测定: 0~15 min, 8%~30% 乙腈; 15~45 min, 30%~75% 乙腈。芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藁本内酯测定: 0~20 min, 0~6% 乙腈; 20~30 min, 6%~20% 乙腈; 30~50 min, 20%~98% 乙腈; 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 黄芪甲苷为 203 nm, 芒柄花素、阿魏酸、藁本内酯为 280 nm, 毛蕊异黄酮为 256 nm; 柱温: 室温。在选定条件下, 上述 5 种成分与样品中其他组分色谱峰可达基线分离, 相邻色谱峰分离度大于 1.5, 当归与黄芪相互无干扰。色谱图见图 1。

2.4 对照品溶液的制备及对照品质量分数检查: 精密称取五氧化二磷减压干燥 36 h 的黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藁本内酯对照品适量, 分别加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液。将芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藁本内酯对照品溶液稀释 10 倍, 备用。分别吸取黄芪甲苷对照品溶液及后 4 种对照品

收稿日期: 2006-08-08

作者简介: 赵奎君(1959—), 男, 满族, 辽宁省抚顺市人, 教授, 硕士研究生导师, 长期从事生药学教学及科研工作, 在该领域发表论文 40 余篇, 出版专著 3 部, 获省部级以上奖 6 项。 Tel: (010)63138520 E-mail: zhao1959@hotmail.com