

反相 HPLC 法测定吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量

邹巧根 宋 茜 周世旺

(中国药科大学分析计算中心,南京 210038)

摘 要 建立了反相高效液相法(RP-HPLC)测定吴茱萸碱及吴茱萸次碱的定量方法,主要色谱条件为:色谱柱 Phenomenex-ODS;流动相为:水-乙腈-冰乙酸-四氢呋喃(100:90:0.2:2)(pH=5.0);流速为 1.0 ml/min;检测波长 254 nm;线性范围 0.04~0.2 ng,吴茱萸碱及吴茱萸次碱浓度与峰面积 具有良好相关性, r 值分别为 0.9998,0.9995,加样回收率分别为 99.25%,99.42%, RSD 值分别为 1.62%,1.61%。

关键词 吴茱萸碱;吴茱萸次碱;反相高效液相色谱

吴茱萸冲剂是根据《伤寒论》的经典方“吴茱萸汤”制成的可溶性冲剂,由吴茱萸碱、人参、大枣、干姜四味药组成,具有温中补虚,降逆止呕及镇痛之功效^[1~4],其中吴茱萸为方中君药,其成分以生物碱为主,本研究把吴茱萸碱及吴茱萸次碱作为定量对象,采用 RP-HPLC 测定其含量,从而为确定吴茱萸冲剂质控指标提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Micromeritics760 HPLC 泵; micromeritics787 紫外检测器;日本岛津 C-R6A 色谱数据处理机。吴茱萸碱 evodiamine、吴茱萸次碱 rutaecarpin(日本松浦药业株式会社,液相色谱证明含量为 99%);吴茱萸冲剂(宁夏中药厂)。乙腈(色谱纯);甲醇、四氢呋喃、冰乙酸、氯仿、氨水(以上皆为 A.R 级)。

1.2 HPLC 条件

色谱柱为 Phenomenex C_{18} 柱(150 mm×4.6 mm, 10 μ m)。流动相为:水-乙腈-冰乙酸-四氢呋喃(100:90:0.2:2)(pH=5.0);流速为 1.0 ml/min;检测波长 254 nm;

检测器灵敏度:0.32。此条件下吴茱萸碱及吴茱萸次碱均分离完全,且峰形稳定,样品分离色谱图如下:

1.3 测定方法的建立

1.3.1 标准曲线的绘制

精密称取吴茱萸碱及吴茱萸次碱对照品各 1.00 mg,混合后置 10 ml 量瓶中,加入甲醇使之溶解,甲醇定容至刻度后吸取标准溶液 20, 40, 60, 80, 100 μ l 分别置 1 ml 量瓶中,甲醇稀释至刻度,依次进样,用进样浓度 C (mg/ml)对峰面积 A 回归得各自回归方程为:吴茱萸碱 $C=8.33 \times 10^{-7} A + 9.51 \times 10^{-5}$ ($r=0.9998$);吴茱萸次碱 $C=8.01 \times 10^{-7} A + 2.66 \times 10^{-5}$ ($r=0.9995$)。

1.3.2 回收率实验 称取样品 3 g 共 10 份,精密称定,以 60 ml 热水溶解加入定量的标准溶液(32~50 μ l),氨水调 pH 至 9,用三

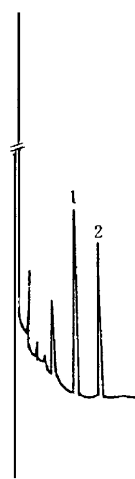


Fig 1. HPLC chromatography
1. evodiamine; 2. rutaecarpin

氯甲烷萃取四次,用甲醇稀释至 2 ml 量瓶中定容至刻度,依次进样,计算回收率,结果:吴茱萸碱的回收率为 99.25%($n=10$), $RSD=1.62\%$;吴茱萸次碱的回收率为 99.42%($n=10$), $RSD=1.61\%$ 。

1.3.3 精密度实验

1.3.1 进样精密度实验 精密称取样品 3.0245 g,用 60 ml 热水溶解,氨水调 pH 至 9,用三氯甲烷萃取 4 次,重复进样 8 次,得吴茱萸碱 RSD 值为 0.88%;吴茱萸次碱 RSD 值为 1.59%。

1.3.2 样品提取精密度实验 取同批样品 3 g 共 9 份,精密称定,以 60 ml 热水溶解,氨水调 pH 至 9,用三氯甲烷 4 次萃取处理,得样品液共 9 份。每份进两针,取平均值计算得吴茱萸碱 RSD 值为 0.91%;吴茱萸次碱 RSD 值为 2.26%。

1.3.4 样品测定 取样品 3 g,精密称定,以 60 ml 热水溶解,氨水调 pH 至 9,用三氯甲烷四次萃取得样品液进样,进样量为 20 μ l,按上述色谱条件,HPLC 进行测定,计算含量,结果见表 2:

Tab 2. The contents of evodiamine and rutaecarpin in sample

Batch	No.	Amount of sample,g	Contents of evodiamine,%	\bar{x}	Contents of rutaecarpin,%	\bar{x}
930812	1	3.0051	1.60	1.64	2.40	2.46
	2	3.0039	1.68		2.53	
931121	1	3.0045	3.09	3.12	4.34	4.48
	2	3.0237	3.16		4.63	
931129	1	3.0371	3.52	3.53	4.18	4.14
	2	3.0031	3.54		4.09	
931201	1	3.0038	1.81	1.88	2.27	2.42
	2	3.0015	1.95		2.58	
931202	1	3.0063	3.50	3.69	4.34	4.68
	2	3.0007	3.88		5.02	
931215	1	3.0033	1.91	1.89	3.32	3.34
	2	3.0026	1.88		3.36	

2 讨 论

1) 吴茱萸来源于芸香科植物吴茱萸的干燥未成熟果实,经炮制后入药,实验表明,不同的炮制方法、不同的炮制条件^[6],其生物碱的含量 均有明显变化,通过对多批干浸膏含量未加控制的成品进行含量测定,结果证实吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量不稳定,因此必须通过控制干浸膏 粉的含量来保证成品的含量,以确保冲剂的药效。

2) 我们选用三种提取方法进行了比较,即氯仿萃取,氯仿索氏提取,甲醇索氏提取,结果表明用氯仿萃取及甲醇索氏提取较完全,从图谱峰 形的分离效果来看,甲醇索氏提取达不到基线分离,而氯仿萃取则达到

基线分离,且萃取 5 次后无吴茱萸碱及吴茱萸次碱色谱峰,所以提取方法 确定为氯仿萃取 4 次。

参 考 文 献

1 许济群. 方剂学. 上海:上海科技出版社,79

2 邱赛红,窦昌贵. 吴茱萸汤温胃止呕作用的实验研究. 中药药理与临床. 1988,4(3):9

3 邱赛红. 吴茱萸汤对小鼠胃肠排空及毒性影响的正交设计实验. 中药药理与临床 1987,3(1):22

4 小菅卓夫. 吴茱萸的化学和药理,国外医学·中医中药分册 1986,8(1):17

5 王易宾,卢袞伟,李 群. 吴茱萸及其炮制品中主要生物碱的高效液相色谱分析. 中药材 1993,16(9):28

6 李 群,王易宾,王 琦. 正交法探讨吴茱萸炮制工艺. 中药材 1991,14(12):124

Assay for Evodiamine and Rutaecarpin by Reverse Phase HPLC

Zhou Qiaogeng, Song Zhe, Zhou Shiwang

Analysis and Computer Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

Abstract The contents of evodiamine and rutaecarpin in sample were measured by reverse phase HPLC. The measurement conditions used were as follows: Phenomenex-ODS column; mobile phase H_2O -MeCN-AcOH-THF (100 : 90 : 02 : 2) (pH=5); flow rate: 1.0 ml/min; wavelength for measurement: 254 nm; the linear range was 0.04 to 0.2 ng and the correlation coefficients were 0.9998 and 0.9995. The recovery rates for Evodiamine and Rutaecarpin were 99.25% and 99.42%, respectively with 1.62% and 1.61% of RSD.

Key words Evodiamine; Rutaecarpin; Reverse phase HPLC

【文摘 075】 盐酸附甲素注射液对实验性心律失常的作用 王秋娟,张陆勇,唐明月,后德辉,刘静涵. 现代应用药学,1996,13(4):7

关附甲素是从关白附子块根中提取的一种新生物碱。实验表明 IGFAH (50 μ g/ml) 对大鼠离体心脏结扎冠脉诱发的室性心律失常有明显的保护作用, IGFAH 3、6、12 mg/kg iv 能显著地提高电刺激麻醉兔心室致颤阈值, IGFAH 13.4、16.8、21.0 mg/kg iv 能明显对抗 $CaCl_2$ -Ach 液诱发小鼠房扑(颤), 其 ED_{50} 为 12.4 ± 1.5 mg/kg。IGFAH 10、25、40 mg/kg iv 对乌头碱诱发的大鼠室心律失常有明显的保护作用。IGFAH 小鼠 iv 的 LD_{50} 为 163.9 mg/kg, 其 96% 可信限为 151.9~176.7 mg/kg。

【文摘 076】 以聚乳酸为聚合物材料制备微粒给药系统 郭健新,王 荣. 药学进展,1996,20(3):135

综述以聚乳酸(PLA)为聚合物材料制备微粒给药系统的方法,包括乳化溶剂挥发法,液中干燥法、喷雾干燥法、空气混悬包衣法和熔融法等。讨论了上述诸法对所制微粒特征的影响因素。

【文摘 078】 拓扑异构酶与抗癌药 李玉艳,李志裕,王 华,尤启东. 药学进展,1996,20(3):138

DNA 拓扑异构酶(topoisomerase)是一种基本核酶,在与 DNA 有关的遗传功能中显示重要作用。

该酶主要包括 Topo I、Topo II 两种类型。以 Topo I、Topo II 为靶分子设计各种酶抑制剂,使其成为抗肿瘤药物,已成为肿瘤化疗研究的新热点。本文阐述了拓扑异构酶的作用机制和特点,介绍了近几年国外对这类药的研究进展及主要化学结构、构效关系、作用方式和各类药物的优缺点。

【文摘 079】 钾通道开放剂的平滑肌作用 王 霆,刘国卿. 药学进展,1996,20(3):143

钾通道开放剂是近年来研究的热点课题。本文综述了钾通道开放剂的作用机制,对血管、呼吸道平滑肌作用和细胞内钙、一氧化氮之间的关系,以及与钙通道拮抗剂的差异。

【文摘 080】 手性药物的开发与前景 丁 慈. 药学进展,1996,20(3):147

外消旋药物临床使用所引起的药效、药物转运、代谢、毒性等一系列问题已越来越受到关注。开发单一对映体(手性)药物,将为药物使用的有效性和安全性提供保证。发达国家正在制订和发布开发手性药物的有关法规、政策报告,其中涉及的技术问题对我国开展这方面工作将提供有益的参考。手性药物的开发具有极高的经济价值,而手性技术的发展与其它高新技术一样将会越来越受到重视。