

· 化学与分析 ·

## 毛细管电泳法测定延胡索中 2 种生物碱含量 电泳条件优化研究

邹薇<sup>1</sup>, 张鹤<sup>2</sup>, 孟宪生<sup>1\*</sup>, 包永睿<sup>1</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽阳市食品药品检验所, 辽宁 辽阳 111000)

**[摘要]** 目的: 优化毛细管电泳同时测定延胡索中延胡索乙素和原阿片碱含量的电泳条件, 建立其含量测定方法。方法: 采用单因素法, 对影响缓冲溶液的组成、浓度、pH, 分离电压, 进样时间进行多水平优选。利用优化后的电泳条件同时测定延胡索中延胡索乙素和原阿片碱。结果: 以 60 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠 (磷酸调 pH 6.0)-甲醇 (5% THF) (体积比为 65:35) 为运行缓冲液, 运行电压为 17 kV, 进样电压为 40 kPa, 进样时间为 3 s, 温度为 20 ℃, 检测波长为 283 nm 的电泳条件为最佳优化条件, 在 20 min 内达到完全分离。结论: 确定了毛细管电泳法测定延胡索中两种生物碱含量电泳条件, 该法简便、准确、可靠, 为毛细管电泳法测定药材含量提供了一定的方法学依据, 为延胡索药材的质量控制提供参考。

**[关键词]** 毛细管电泳; 电泳条件; 延胡索; 延胡索乙素; 原阿片碱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0059-04

## Research Based on Capillary Electrophoresis Method to Determine the Content of Two Alkaloids in Corydalis Rhizoma

ZOU Wei<sup>1</sup>, ZHANG He<sup>2</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1\*</sup>, BAO Yong-rui<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;  
2. Liaoyang Institute for Food and Drug Control, Liaoyang 111000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the electrophoresis condition of determining the content of tetrahydropalmatine and protopine in Corydalis Rhizoma simultaneously by the method of capillary electrophoresis, and to establish the determination method. **Method:** Single factor method was used to optimize the composition, concentration, pH value, separation voltage and injection time that can influence the buffer solution. And the optimized electrophoresis condition was used to detect the contents of tetrahydropalmatine and protopine simultaneously. **Result:** The buffer solution was 60 mmol·L<sup>-1</sup> of sodium dihydrogen phosphate (pH 7)-methanol (5% THF) (65:35). The running voltage was set at 17 kV and the voltage of sample injection was at 40 kPa. The time of sample injection was 3 s with temperature of 20 ℃ and detection wavelength of 283 nm. With the optimized condition the complete separation can adopte within 20 min. **Conclusion:** The electrophoresis condition of determining the two content in Corydalis Rhizoma was established, that is a simple, accurate and reliable method, which provides the basis of determining content with capillary electrophoresis method and also provides a reference for the quality control of Corydalis Rhizoma.

**[Key words]** capillary electrophoresis; electrophoresis condition; Corydalis Rhizoma; tetrahydropalmatine; protopine

**[收稿日期]** 20110423(003)

**[基金项目]** 国家“十一五”重大新药创制科技重大项目(20102x09401-304-201)

**[第一作者]** 邹薇, 硕士研究生, Tel:0411-87406496, 15140394048, E-mail:664789708@qq.com

**[通讯作者]** \* 孟宪生, 博士后, 教授, 从事中药组分配伍、代射组学及药品质量分析研究, Tel:0411-87406496, E-mail:mxsvvv@126.com

延胡索为罂粟科植物延胡索的干燥块茎。其味辛、苦、温。归肝、脾经。具有活血、利气、止痛之功效,用于胸胁、腕腹疼痛、经闭通经、产后瘀阻、跌扑肿痛等。延胡索中主要成分为生物碱,主要为叔胺、季胺类生物碱。叔胺类生物碱在原药材中的量约为 0.65%,季胺类生物碱(如延胡索甲素、乙素)约为 0.3%<sup>[1]</sup>。目前,人们已建立了多种分析生物碱的方法,主要有高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)等<sup>[2-4]</sup>,但这些方法都很耗时并且操作比较复杂。有文献报道使用离子液体-毛细管电泳法测定延胡索中延胡索乙素<sup>[5]</sup>,本文建立了毛细管电泳方法测定延胡索中 2 种生物碱的含量,可为延胡索的药材制定质量标准提供参考。

### 1 材料

美国 Agilent 3D 毛细管电泳仪, DAD 检测器, Agilent 化学工作站。涂层石英毛细管柱(50 μm × 75 cm,有效长度 60 cm)(郑州英诺高科有限公司), ACCULAB ALC-11C.4 型电子天平(德国赛多利斯集团), RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), SHZ-D III 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司), HSS 型电子恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为市售分析纯。所用试剂均通过 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

延胡索药材(由辽宁省本溪三药有限公司提供),经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为罂粟科植物 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥根。

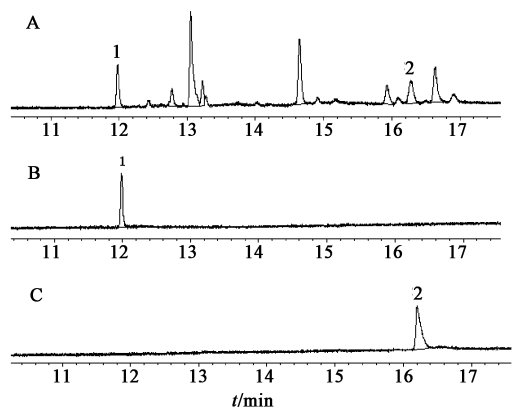
### 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取延胡索乙素和原阿片碱对照品适量,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成 0.104, 0.094 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 取延胡索药材粉末(过三号筛)约 25 g,加 6 倍量 70% 乙醇,85 °C,提取 3 次,每次提取 2 h,过滤,合并滤液,减压浓缩,定容至 100 mL 量瓶中,所得样品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品溶液。

**2.3 电泳条件** 经磷酸调 pH 6.0 的 60 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠-甲醇(5% THF)(体积比为 65:35)溶液作为缓冲液,运行电压 17 kV,进样电压为 40 kPa,进样时间 3 s,温度 20 °C,检测波长 283 nm。进样前用 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液与水冲洗 5 min,运行缓冲液平衡 8 min,静止平衡 2 min,见图 1。

### 2.4 方法学考查



1. 原阿片碱;2. 延胡索乙素

图 1 延胡索电泳图

**2.4.1 线性范围** 分别吸取 2.1 项下延胡索乙素和原阿片碱对照品储备液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后按上述毛细管电泳条件分别进样测定,分别以延胡索乙素、原阿片碱的峰面积  $Y$  为纵坐标,浓度  $X$  ( $g \cdot mL^{-1}$ ) 为横坐标进行线性回归。延胡索乙素和原阿片碱分别在 0.020 8 ~ 0.104 mg, 0.018 8 ~ 0.094 mg 呈良好的线性关系。回归方程分别为  $Y_{延胡索乙素} = 1216.3X - 0.25$  ( $r = 0.9996$ );  $Y_{原阿片碱} = 776.6X + 0.06$  ( $r = 0.9996$ )。

**2.4.2 精密度** 分别吸取 2.1 项下延胡索乙素、原阿片碱对照品溶液,连续进样 6 次( $n = 6$ ),延胡索乙素和原阿片碱的峰面积 RSD 分别为 2.1%, 1.8%,仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性** 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 5 份,进样分析,延胡索乙素和原阿片碱的峰面积 RSD 分别为 1.3%, 1.7%,该方法重复性良好。

**2.4.4 稳定性** 取新制备供试品溶液,在 0, 2, 4, 8, 10, 24 h 进样分析,延胡索乙素和原阿片碱的峰面积 RSD 分别为 0.9%, 1.6%,样品在 24 h 内稳定。

**2.4.5 加样回收率** 采用加入回收法,在已知含量的延胡索醇提液中加入一定量的延胡索乙素和原阿片碱对照品,按上述毛细管电泳条件测定。结果见表 1。延胡索乙素的平均回收率为 95.5% ~ 104.0% (RSD 1.8% ~ 2.3%),原阿片碱的平均回收率为 92.1% ~ 103.0% (RSD 1.7% ~ 3.7%)。

**2.4.6 样品测定** 取延胡索药材 3 份,每份 5 g,精确称定,按 2.2 项下方法制备,计算延胡索中延胡索乙素和原阿片碱的含量,结果见表 2。

### 3 讨论与结论

**3.1 缓冲溶液体系的选择** 考察了磷酸氢二钠-甲

表1 延胡索中2种生物碱的加样回收率( $n=3$ )

成分	加入量	测得量	回收率	RSD
	/mg	/mg	/%	/%
延胡索乙素	2.10	2.02	96.0	1.9
	2.03	1.94	95.5	2.3
	1.89	1.96	104.0	1.8
原阿片碱	0.61	0.59	96.2	1.7
	0.56	0.52	92.1	3.7
	0.53	0.55	103.0	1.9

 表2 延胡索中2种生物碱的含量测定( $n=3$ )  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 

样品重/g	延胡索乙素	原阿片碱
5.0813	0.899	1.596
5.1325	0.901	1.608
5.0178	0.874	1.557
X/%	0.891	1.587
RSD/%	1.302	1.260

醇、磷酸氢二钠-乙腈、磷酸氢二钠几种缓冲体系对分析结果的影响。取对照品和供试品溶液,分别进样,在磷酸氢二钠-甲醇体系中,基线平稳,噪音低,能完全分离。磷酸氢二钠-乙腈、磷酸氢二钠体系在分离中出现基线漂移,峰未完全分开。结果表明磷酸氢二钠-甲醇是较理想的缓冲体系。

**3.2 缓冲液浓度的选择** 在毛细管电泳中,缓冲液的浓度是一个重要指标。在缓冲溶液体系确定后,本实验分别考察了磷酸氢二钠从  $30\sim 80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度,取对照品和供试品溶液,分别进样,结果表明在  $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,分离效果明显。

**3.3 缓冲液 pH 的选择** 缓冲液 pH 是影响分离效果的关键因素之一。本文用  $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠-甲醇作为电解质,用磷酸调 pH,考察了 pH 在  $4.0\sim 8.0$  对延胡索中各个峰迁移行为的影响。取对照品和供试品溶液,分别进样,结果表明,当 pH 为 6.0 时,延胡索中各个峰分离效果较好。

**3.4 分离电压的选择** 分离电压是影响分析时间的直接因素。当其他条件恒定时,分离电压越大则分析时间越短<sup>[9-11]</sup>。本文在  $12\sim 20\text{ kV}$  考察了分离电压对分离效果的影响。取对照品和供试品溶液,分别进样,由预实验结果可知,当分离电压为  $17\text{ kV}$  时,分析时间短且分离效果较好,故本文选择  $17\text{ kV}$  作为分离电压。

**3.5 进样时间的选择** 本实验采用真空进样,在其他条件恒定下,考察进样时间  $2\sim 20\text{ s}$ ,取对照品和供试品溶液,分别进样,在进样时间为  $3\text{ s}$  时,获得较好的分离效果、尖锐对称的峰形,故本文选择  $3\text{ s}$  为最佳分离时间。

毛细管电泳法其分析时间通常不超过  $30\text{ min}$ ,比高效液相色谱法分析速度快;毛细管电泳法所需样品量低,一般为 nL 级,最低可达  $270\text{ fL}$ ,流动相用量也只需几毫升,毛细管电泳法则可有效改善高效液相色谱法中出现的问题,峰形达到对称, $20\text{ min}$  即可达到完全分离。

本文分别对缓冲溶液体系,缓冲液浓度,缓冲液 pH,分离电压,进样时间进行了考察,发现增加缓冲液浓度,离子强度增大,明显改变溶液的缓冲容量,减少溶质和管壁之间被分离的粒子和粒子之间的相互作用,从而改善分离。但浓度过大,将产生大量的焦耳热,致使峰形变差,基线不漂移<sup>[5-8]</sup>。因此需要选择合适的缓冲溶液浓度以获得较高的灵敏度和分离度。pH 亦是主要的影响因素,采用磷酸缓冲液 pH 6.0 分离获得较好的分离效果、峰形尖锐对称、灵敏度较高、迁移时间较短。当  $\text{pH} > 7$  时,不成盐的生物碱被游离出来,在水溶液中不溶解无法进行测定;而  $\text{pH} > 7$  时,虽然生物碱成盐且溶解较好,但由于 pH 的降低,使迁移时间延长,使峰形变宽,分离不理想。进样时间决定了进样量的大小,进样量太小,达不到检测器的灵敏度,进样量太大,引起区带增宽,分离效率和分离度都变差<sup>[12-14]</sup>。

本文应用毛细管电泳法测定延胡索中 2 种生物碱的含量,对延胡索中原阿片碱和延胡索乙素的含量进行了测定,并对方法的精密度、回收率、稳定性、重复性进行了测定。选用本实验确定的实验方法进行分析可得到良好的分离效果;精密度,加样回收率,稳定性,重现性都较好,体现了毛细管电泳在中药成分分析中的优势,可短时间内出峰完全,并达到良好的分离效果。

#### [参考文献]

- [1] 张晓丽,曲扬,侯家鸣,等.延胡索的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2008,25(7):537.
- [2] 黄建明,郭济贤,段更利. RP-HPLC 法测定千金藤属植物中 7 种生物活性生物碱[J].药学学报,1998,33(7):528.
- [3] 范华均,栾伟,李攻科.微波辅助提取/HPLC 分析石蒜中的生物碱[J].分析测试学报,2006,25(3):27.
- [4] 邹萍,王绍艳,张志强,等.二维高效液相色谱技术用于分析中药制剂中的麻黄类生物碱[J].分析测试学报,2007,26(1):120.
- [5] 胡晓黎,崔书亚,陈兴国,等.元胡中延胡索乙素的离子液体毛细管电泳法测定[J].分析测试学报,2009,28(2):220.

# HPLC 测定不同采收期葶草中葶草素、异葶草素的含量

窦妍, 翟延君\*, 佟苗苗, 张慧

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 建立高效液相色谱法同时测定不同采收期葶草中葶草素、异葶草素含量的方法。方法: 色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 检测波长 350 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 葶草素在 0.068 2~0.682 μg ( $r = 0.999 7$ ) 线性关系良好, 平均回收率为 99.94%, RSD 1.08%; 异葶草素在 0.386~3.860 μg ( $r = 0.999 3$ ) 线性关系良好, 平均回收率为 99.67%, RSD 1.09%。结论: 方法简便、快捷、准确的特点, 可用于葶草药材的质量控制。

**[关键词]** 葶草; 葶草素; 异葶草素; 含量测定; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0062-03

## Determination of Orientin and Isoorientin in Different Harvest Times of *Polygonum orientale* by HPLC

DOU Yan, ZHAI Yan-jun\*, TONG Miao-miao, ZHANG Hui

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of orientin and isoorientin in different harvest times of *Polygonum orientale*. **Method:** Orientin and isoorientin were separated on Agilent C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column and detected at 350 nm. The mobile phase was acetonitrile-0.3% phosphoric with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** Orientin and isoorientin were linear within the range of 0.068 2-0.682 μg ( $r = 0.999 7$ ), 0.386-3.860 μg ( $r = 0.999 3$ ) respectively. The average recovery was 99.94% (1.08%), 99.67% (1.09%). **Conclusion:** The method is simple, rapid, and it can be

**[收稿日期]** 20110731(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873437)

**[第一作者]** 窦妍, 在读硕士生, 从事中药鉴定与质量评价研究, Tel: 15909869060, E-mail: lei520\_yan@sohu.com

**[通讯作者]** \* 翟延君, 教授, 从事中药鉴定与质量评价研究, Tel: 13019499386, E-mail: lnzyzyj@sohu.com

- [6] 王实强, 首弟武. 高效毛细管电泳法测定罂粟壳中生物碱的含量[J]. 1997, 15(5): 438.
- [7] 陈亚飞, 田颂九, 孙曾培. 复方石韦片中生物碱的分离测定[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 94.
- [8] 张国华, 王延琮, 张永友, 等. 高效毛细管电泳测定黄连及成药中小檗碱型生物碱的含量[J]. 色谱, 1995, 13(4): 247.
- [9] 陈军辉, 赵厘强, 李文龙, 等. 高效毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱联用分析黄连中的生物碱[J]. 化学学报, 2007, 65(23): 2743.
- [10] 徐芳, 陈波, 姚守拙. 胶束电动毛细管电泳法分离 6 种生物碱基[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 678.
- [11] 吴江明, 栾连军, 程翼宇. 胶束毛细管电泳法同时测定黄连——吴茱萸药对中 5 种生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(3): 325.
- [12] 林梅, 张正行, 安登魁, 等. 萜类生物碱毛细管电泳分析[J]. 分析化学, 1998, 26(4): 457.
- [13] 柳仁民, 何风云, 孙爱玲, 毛细管电泳-电喷雾-质谱-质谱分离鉴定粉防己生物碱[J]. 药学学报, 2004, 39(5): 363.
- [14] 任小娜, 马永钧, 周敏, 等. 毛细管电泳-电致化学发光检测法分离测定中药马尿泡中的托烷类生物碱成分[J]. 色谱, 2008, 26(2): 223.

[责任编辑 蔡仲德]