

左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂 吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量比较

张欣¹, 靳凤云^{1*}, 梁光义^{1,2}, 贺祝英¹, 章誉¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002)

摘要 目的: 比较左金丸传统汤剂、复方颗粒剂与配方颗粒剂中吴茱萸碱和次碱的含量差异。方法: 采用 HPLC 测定传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量, 并对含量测定的方法进行了考察。结果: HPLC 测定吴茱萸碱和次碱在传统汤剂中总质量分数为 $0.738\ 0\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 在复方颗粒剂中总质量分数为 $1.379\ 0\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 在配方颗粒剂中总质量分数为 $0.225\ 9\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论: 左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂吴茱萸碱和吴茱萸次碱总质量分数差异较大: 复方颗粒剂 > 传统汤剂 > 配方颗粒剂。

关键词 高效液相色谱; 左金丸; 传统汤剂; 复方颗粒剂; 配方颗粒剂; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)19-0067-05

Comparison the Content of Evodiamine and Rutaecarpine from Compatible Granule, Compound Granule and Traditional Decoction of Zuojin Pills

ZHANG Xin¹, JIN Feng-yun^{1*}, LIANG Guang-yi¹, HE Zhu-ying¹, ZHANG Yu¹

收稿日期 20110422(012)

基金项目 国家自然科学基金项目(30860364)

第一作者 张欣, 硕士, 从事新药研发及质量控制, E-mail: huangbianni@sina.com, Tel: 15285167091

通讯作者 * 靳凤云, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药质量控制与新药开发

含量测定色谱条件, 通过全波长扫描确定了 230 nm 为合适的检测波长, 并考察了不同比例流动相乙腈-水以及柱温的影响, 最后确定了色谱条件; 丹酚酸 B 含量测定色谱条件, 通过全波长扫描确定了检测波长 286 nm, 考察了不同比例流动相甲醇-乙腈-1% 甲酸和甲醇-乙腈-0.5% 甲酸以及柱温的影响, 最后确定色谱条件。在该色谱条件下, 色谱峰不拖尾, 分离度好, 阴性无干扰。

供试品溶液制备中考察了提取溶剂和处理方法, 显示芍药苷采用甲醇提取比无水乙醇和 50% 甲醇提取率高, 超声提取与回流提取无显著差异; 而丹酚酸 B 采用 75% 甲醇提取较甲醇和无水乙醇提取率高, 回流提取显著高于超声提取。因此, 确定测定芍药苷时采用甲醇超声提取; 测定丹酚酸 B 时采用 75% 甲醇回流提取。

参考文献

- [1] Lao L, Fan A Y, Zhang R X, et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of the modified Chinese herbal formula Huoluoxiaolingdan (HLXL) in rats [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2006, 34 (5): 833.
- [2] 林海, 胡黎. 不同产地赤芍芍药苷的含量测定 [J]. 中国医药指南, 2009, 7(16): 91.
- [3] 邓寒霜, 李筱玲, 王凯. 不同产地丹参饮片质量研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3105.
- [4] 王德杭, 黄有带, 景运条, 等. 正交试验法优选金芍胶囊的水提工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (14): 23.
- [5] 刘元, 莫海涛, 宋志钊, 等. HPLC 法测定千斤脑康宁胶囊中丹酚酸 B 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 37.

责任编辑 蔡仲德

(1. Gui Yang College of Trachtional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Key Lab of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the content of evodiamine and rutaecarpine from traditional decoction, compound granules and granule formulation in the Zuojin pills. **Method:** The content of evodiamine and rutaecarpine in the three forms of Zuojin pills was determined and the method to determine content was established by HPLC. **Result:** There is 15.455 3 mg·g⁻¹ evodiamine and rutaecarpine in the traditional decoction, 21.792 4 mg·g⁻¹ in the compound granules, 26.648 3 mg·g⁻¹ in the formulation granules. **Conclusion:** There are significant differences in the three forms of Zuojin pills. The order is formulation granules > compound granules > traditional decoction.

[Key words] HPLC; Zuojin pills; traditional decoction; compound granules; granule formulation; evodiamine; rutaecarpine

由于传统复方汤剂在使用上的不便,近年来为了满足患者对的要求,复方颗粒及配方颗粒剂开始用于临床上。传统汤剂,复方颗粒及配方颗粒剂的药效学,临床疗效方面比较已经有不少报道^[1],但其化学组成相关的报道相对缺乏。左金丸出自元代著名医家朱丹溪的《丹溪心法》,由黄连 30 g,吴茱萸 5 g 组成,主要用于治疗肝火犯胃症。现代研究表明吴茱萸中有效成分具有扩张血管、降压、强心、止泻、收缩子宫、杀虫、抗菌、抗病毒、抗溃疡、抗胆碱酯酶和诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡等作用^[2-4]。本文通过采用 HPLC^[5-8]测定吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量比较传统汤剂,复方颗粒及配方颗粒剂的有效成分差异,为临床应用和制备生产提供科学的依据

1 材料

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪、HS20500D 型超声波清洗机、AB204-S 型天平。吴茱萸碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110802-200504),吴茱萸次碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110801-200505),左金丸传统汤剂、复方干浸膏粉及配方干浸膏粉(自制),乙腈为色谱纯,辛烷磺酸钠为分析纯,水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 左金丸传统汤剂,复方颗粒及配方颗粒剂制备

2.1 左金丸传统汤剂 称取药材黄连 30 g,吴茱萸 5 g,冷浸 20 min,加水煎煮 3 次,每次至药液面面上 3 cm,煮沸 30 min,合并 3 次滤液,得传统汤剂,结果见表 1。

2.2 左金丸复方颗粒 采用左金丸传统汤剂的煎

表 1 左金丸传统汤剂、复方颗粒、配方颗粒剂的制备

样品名称	称样量 /g	药液体积 /mL	浸膏量 /g	相当于原药材 吴茱萸的量 g·mL ⁻¹ 或 g·g ⁻¹
传统汤剂	5.001 7	500	-	0.01
复方颗粒	70.003 1	-	73.898 8	0.947 3
配方颗粒剂	500.027 4	-	61.123 3	1.053 2

煮方法,减压浓缩至相对密度 1.2(25℃),常压 80℃干燥得复方颗粒剂,得浸膏量见表 1。

2.3 配方颗粒剂 称取药材黄连 30 g,吴茱萸 5 g,分开煎煮,分别煎煮 2 次,第 1 次为 8 倍量水,第 2 次加 6 倍量水,保持微沸煎煮 60 min,合并滤液,减压 80℃干燥,分别得单味黄连颗粒和单味吴茱萸颗粒,按比例混合,即得,得浸膏量见表 1。

3 方法与结果

3.1 色谱条件 Diamonisl-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.04% 辛烷磺酸钠溶液(43:57),检测波长 225 nm,流速 1 mL·min,柱温 25℃。

3.2 样品溶液的制备

3.2.1 左金丸传统汤剂供试品溶液的制备 精密量取左金丸传统汤剂 4 mL,置 10 mL 量瓶中,加入乙醇约 5 mL,超声处理(功率 150 W,频率 33 kHz)40 min,放冷,加 52.8% 乙醇置刻度,摇匀,过微孔滤膜,即得。

3.2.2 左金丸复方颗粒剂供试品溶液的制备 精密称取左金丸复方颗粒剂干浸膏粉约 1.087 8 g,置 25 mL 量瓶中,水溶解定容,取 4 mL,置 10 mL 量瓶中,加入乙醇约 5 mL,超声处理(功率 150 W,频率

33 kHz) 40 min,放冷,加 52.8% 乙醇置刻度,摇匀,过微孔滤膜,即得。

3.2.3 左金丸配方颗粒剂供试品溶液的制备 精密称取左金丸配方颗粒剂干浸膏粉约 1.105 2 g,方法同 3.2.2 项下制备。

3.2.4 左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂各阴性对照品溶液的制备 先按各自的制备方法制备不含吴茱萸的左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂,方法同 3.2.2 项下制备。

3.3 线性关系考察

3.3.1 标准溶液的制备 分别精密称取吴茱萸碱对照品 11.10 mg、吴茱萸次碱对照品 10.30 mg,置于 100 mL 量瓶中,用乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得吴茱萸碱和次碱混合对照品储备液。

3.3.2 标准曲线的绘制 精密量取对照品储备液 2.0,6.0,10.0,14.0,18.0 mL,置 100 mL 量瓶中用盐酸-甲醇(1:100)稀释至刻度,摇匀。分别进样 10 μ L,以峰面积(A)为纵坐标,吴茱萸碱和次碱量(X)为横坐标,经计算得吴茱萸碱回归方程 $Y = 7933.6X + 8.255$ ($r = 1.0000$),表明吴茱萸碱在 0.022 2 ~ 0.199 8 μ g 线性关系良好;得吴茱萸次碱回归方程 $Y = 5451.5X - 4.3$ ($r = 0.9999$),结果表明吴茱萸次碱在 0.020 6 ~ 0.185 4 μ g 线性关系良好。

3.4 系统适应性试验 分别精密吸取吴茱萸碱、吴茱萸次碱混合对照品溶液、传统汤剂供试品溶液、复方颗粒剂供试品溶液、配方颗粒剂供试品溶液及缺吴茱萸的传统汤剂供试品溶液、缺吴茱萸的复方颗粒剂供试品溶液、缺吴茱萸的配方颗粒剂供试品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱。吴茱萸碱的保留时间(t)约为 28.6 min,吴茱萸次碱的保留时间约为 35.7 min。阴性样品的图谱在吴茱萸和吴茱萸次碱峰的位置处均无假阳性峰,即本试验条件吴茱萸碱、吴茱萸次碱与其他组分分离完全,分离度 > 1.5,见图 1~8。

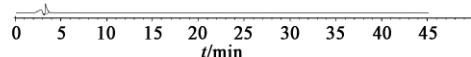
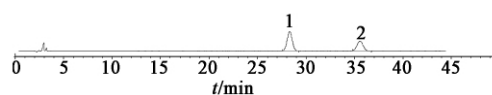


图1 空白溶剂图谱

3.5 精密度试验 精密吸取吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,测定相应峰面积,吴茱萸碱、吴茱萸次碱的 RSD 分别为 0.43%,



1. 吴茱萸碱;2. 吴茱萸次碱(下同)

图2 吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品图

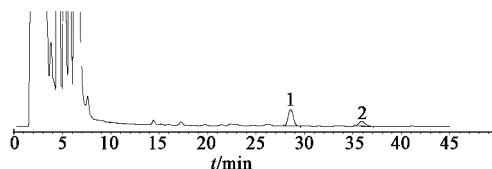


图3 传统汤剂图

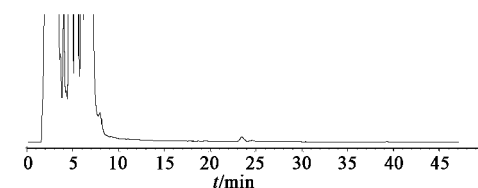


图4 缺吴茱萸传统汤剂阴性

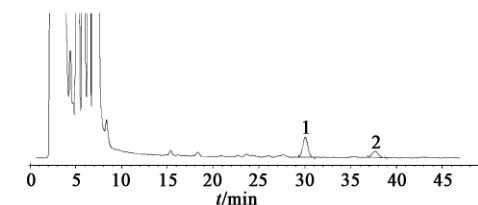


图5 复方颗粒剂图

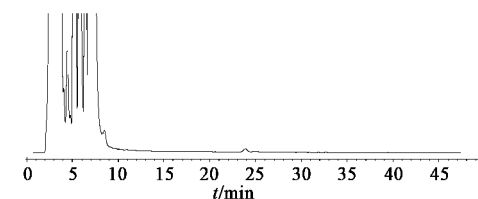


图6 缺吴茱萸复方颗粒剂阴性图

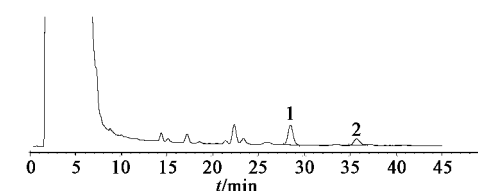


图7 配方颗粒剂图

0.45%,结果表明精密度良好。

3.6 稳定性试验 分别精密吸取左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂供试品溶液 20,10,20 μ L,按照 3.1 项下所述色谱条件,分别于 0,2,4,6,8,

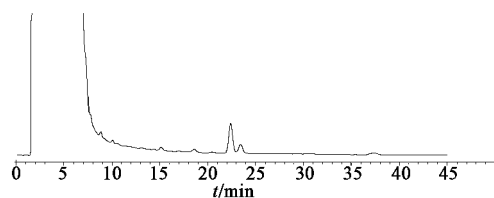


图 8 缺吴茱萸配方颗粒剂阴性图谱

10 h 测定,传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂吴茱萸碱试验结果的 RSD 为 0.82% ,0.81% ,0.73% ;吴茱萸次碱试验结果的 RSD 为 1.84% ,1.64% ,2.00% ,说明各供试品溶液在 10 h 内稳定。

3.7 重复性试验 按照 2.2 项下所述方法平行处理 6 次,分别精密吸取左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂供试品溶液 20,10,20 μL,同法测定吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量。传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂中吴茱萸碱试验结果的 RSD 1.40% ,1.46% ,1.05% ;吴茱萸次碱试验结果的 RSD 分别为 2.98% ,1.20% ,0.85% ,说明各供试品溶液重复性良好。

3.8 回收率试验 精密量取或称取已知含量的传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂各 18 份,平均分两组,分别加入对照品吴茱萸碱和吴茱萸次碱,按照 3.2 项下所述方法处理,测定各成分峰面积,计算回收率,结果见表 2 ~ 7。

表 2 传统汤剂吴茱萸碱加样回收测定

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/mL	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
2.0	8.44	6.75	15.13	99.03		
2.0	8.44	6.75	15.06	98.03		
2.0	8.44	6.75	14.98	96.82		
2.0	8.44	8.44	16.70	97.92		
2.0	8.44	8.44	16.64	97.20	98.39	1.66
2.0	8.44	8.44	16.95	100.81		
2.0	8.44	10.13	18.31	97.44		
2.0	8.44	10.13	18.27	97.04		
2.0	8.44	10.13	18.69	101.25		

3.9 样品含量测定 按照 3.2 项下所述的方法制备各供试品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别精密吸取传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂供试品溶液 15,5,5 μL,进样,按外标法测定含量,结果见表 8。

表 3 复方颗粒吴茱萸碱加样回收测定

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
0.100 4	83.92	66.86	150.94	100.25		
0.100 2	83.75	66.86	150.18	99.35		
0.100 3	83.83	66.86	149.44	98.13		
0.100 1	83.66	83.58	168.85	101.91		
0.100 0	83.58	83.58	170.58	104.09	101.69	1.96
0.100 0	83.58	83.58	169.95	103.33		
0.100 6	84.08	100.30	187.48	103.09		
0.100 4	83.92	100.30	186.85	102.63		
0.100 5	84.00	100.30	186.71	102.41		

表 4 配方颗粒吴茱萸碱加样回收测定

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
0.300 1	50.03	40.01	90.88	102.10		
0.300 2	50.04	40.01	91.46	103.52		
0.300 8	50.01	40.01	92.08	104.81		
0.300 0	50.01	50.01	100.03	100.02		
0.299 9	49.99	50.01	100.55	101.09	102.84	1.96
0.299 8	49.98	50.01	100.11	100.24		
0.300 9	50.06	60.01	113.17	104.99		
0.300 8	50.08	60.01	113.09	104.89		
0.300 5	50.09	60.01	112.44	103.89		

表 5 传统汤剂吴茱萸次碱加样回收测定

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/mL	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
2.0	6.55	5.24	12.01	104.31		
2.0	6.55	5.24	11.90	102.30		
2.0	6.55	5.24	11.85	101.21		
2.0	6.55	6.55	13.36	104.08		
2.0	6.55	6.55	13.27	102.76	101.63	2.39
2.0	6.55	6.55	13.09	99.98		
2.0	6.55	7.86	14.52	101.48		
2.0	6.55	7.86	14.58	102.34		
2.0	6.55	7.86	14.11	96.24		

通过表 8 可知左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂中的吴茱萸碱和吴茱萸次碱的总含量差异较大: 复方颗粒剂 > 传统汤剂 > 配方颗粒剂。

4 讨论

由表 8 可知,采用传统煎煮方法得到的传统汤剂中吴茱萸碱和次碱的总含量高于配方颗粒剂的含量,低于复方颗粒剂的含量。说明不同的制备方法对吴茱萸碱和次碱的含量有较大影响,可能是由于药材一起煎煮过程中多种药材成分共存而产生相互

表6 复方颗粒吴茱萸次碱加样回收测定

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
0.100 1	46.61	37.32	83.02	98.05		
0.100 3	46.70	37.32	82.92	97.64		
0.100 2	46.65	37.32	83.25	98.06		
0.100 0	46.56	46.65	91.91	97.21		
0.100 4	46.75	46.65	92.52	98.12	98.32	2.11
0.100 2	46.65	46.65	91.11	95.28		
0.100 4	46.75	56.10	103.78	101.67		
0.100 1	46.61	56.10	101.42	97.23		
0.100	46.79	56.10	103.64	101.60		

表7 配方颗粒吴茱萸次碱加样回收测定

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/μg	μg	/μg	/%	/%	/%
0.300 0	24.99	20.00	44.38	97.56		
0.300 2	25.00	20.00	44.88	99.38		
0.300 1	25.00	20.00	44.50	97.52		
0.300 0	24.99	25.00	51.08	104.36		
0.300 4	25.02	25.00	50.91	103.55	101.95	2.89
0.300 5	25.03	25.00	51.06	104.13		
0.300 6	25.04	30.00	56.19	104.59		
0.300 4	25.02	30.00	56.14	103.72		
0.300 2	25.00	30.00	55.68	102.72		

表8 左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量比较($n=5$)

样品	取样量	吴茱萸碱 + 吴茱萸次碱的含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$					平均含量	RSD
		1	2	3	4	5	/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	/ %
传统汤剂	4.0 mL	0.74	0.72	0.75	0.74	0.74	0.738	1.48
复方颗粒	0.2 g	1.36	1.37	1.42	1.37	1.37	1.378	1.73
配方颗粒剂	0.6 g	0.23	0.22	0.23	0.23	0.22	0.226	2.42

作用引起的。采用合煎方式制备的传统汤剂和复方颗粒剂更利于吴茱萸碱和次碱的溶出。

本实验比较了左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂中吴茱萸碱和次碱的含量差异,结果显示与配方颗粒剂相比,复方颗粒剂中吴茱萸碱和次碱的总含量与传统汤剂的含量更接近,并且复方颗粒剂的含量高于传统汤剂的含量,可以推测,复方颗粒剂与传统汤剂的临床疗效也更接近,为左金丸的临床应用及生实践提供了实验依据。3种不同剂型的疗效须以中医辨证理论的基础,进一步结合药效学实验研究和临床应用。

参考文献

- [1] 胡长平. 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的药理学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(10): 1084.

- [2] 严春临, 张季, 薛贵平. 中药吴茱萸药理作用研究概况[J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(1): 77.
- [3] 张婷. 吴茱萸汤醇提各组分止呕活性的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 862.
- [4] 左凤. 吴茱萸中的喹诺酮生物碱的抗幽门螺杆菌活性[J]. 国外医学·中医中药分册, 2001, 23(1): 27.
- [5] 梅洁. 吴茱萸对自发性高血压大鼠血压的影响[J]. 国外医学·中医中药分册, 1999, 21(4): 23.
- [6] 黄如栋. 吴茱萸注射液回阳固脱作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 1991, 7(2): 1.
- [7] 殷文光, 李曼玲, 刘淑芝, 等. SPE-HPLC测定复方吴茱萸巴布膏中吴茱萸碱和吴茱萸次碱血药浓度及药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2946.
- [8] 袁萍, 黄艳萍. HPLC法同时测定左金滴丸中5种生物碱的含量[J]. 中医药导报, 2010, 16(1): 65.

责任编辑 蔡仲德