

延胡索乙素解离常数的测定及其对分离检测影响的考察^{*}

★ 方海红^{1**} 朱圣生¹ 张洁¹ 吴有根¹ 魏慧珍^{2***} 胡俊兴³ (1. 江西中医学院 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程中心 南昌 330006; 3. 江西中医药高等专科学校 抚州 344000)

摘要:目的:测定延胡索乙素的解离常数(pKa),考察流动相 pH 对其保留行为、柱效影响与 pKa 值的相关性,为延胡索乙素的分离检测提供指导。方法:以对硝基酚为指示剂,用分光光度指示剂法测定延胡索乙素的解离常数;采用高效液相色谱法,考察流动相 pH 对延胡索乙素保留行为、柱效的影响,优化延胡索中延胡索乙素分离条件。结果:延胡索乙素的值为(6.49 ± 0.07)(25 ± 0.5)℃;流动相 pH 对延胡索乙素保留行为的影响与其 pKa 值有明显的相关性,流动相为乙腈-0.1%磷酸(三乙胺调 pH 6)(45:55)可较好的分离检测延胡索中的延胡索乙素。结论:酸碱性药物解离常数的测定,对其分离条件的选择有重要的指导意义。

关键词:延胡索乙素;解离常数;分光光度指示剂法;保留行为;柱效

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

Determine the dissociation constants of tetrahydropalmatine and investigate the effect of its separation in medicine

FANG Hai-hong¹, ZHU Sheng-sheng¹, ZHANG Jie¹, WU You-gen¹, WEI Hui-zhen², HU Jun-xing³

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

2. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006

3. Jiangxi College of Chinese Traditional Medicine

Abstract: Objective: Determine the dissociation constants of tetrahydropalmatine, investigate the correlation pKa with the effect of retention behavior and column efficiency by pH of mobile phase, and it can offer direction to separate tetrahydropalmatine in medicine. Method: 4-nitrophenol as an indicator, the dissociation constant of tetrahydropalmatine was determined by the spectrophotometric indicator method. Investigate the effect of retention behavior and column efficiency by pH of mobile phase by HPLC. Optimize the separation and detection of tetrahydropalmatine in Rhizoma Corydalis. Result: of tetrahydropalmatine was (6.49 ± 0.07 at) (25 ± 0.5)℃. And pKa obviously correlate with the effect of retention behavior by pH of mobile phase. When mobile phase pH was 6.0, tetrahydropalmatine in Rhizoma Corydalis can be separated and detected very well. Conclusion The determination of dissociation constants of medicine was significance to guide the optimization condition of separation and detection.

Key words: Tetrahydropalmatine; dissociation constants; spectrophotometric indicator method; column efficiency; effect of retention behavior

延胡索乙素(tetrahydropalmatine)是从延胡索中提取的生物碱成分之一,具有较强的镇痛作用^[1]。解离常数是酸性药物的一个重要参数,对药物的提取分离、分析检测、制备工艺筛选等具有重要的指导意义。一般测定解离常数的方法有电位滴定法^[2]、分光光度法^[3~6]、毛细管电泳法^[7]等。本文以对硝基酚为指示剂,采用分光光度指示剂法测定延胡

索乙素的解离常数,并考察 pKa 值对其分离检测的影响,为延胡索药材及其制剂中延胡索乙素的分离分析提供指导。

1 仪器与材料

UV-2 550 紫外分光光度计,LC-10ATvp 高效液相色谱仪,Kromasil C₁₈ 色谱柱,Sartorius PB-10 酸度计,AUW220D 分析天平,MilliQ 超纯水仪;延胡索乙素由中国药品生物制

* 基金项目:国家十一五科技支撑计划资助项目(2006BAI08B03-05)

** 作者简介:方海红(1979-),女,硕士研究生,主要从事中药质量控制研究工作

*** 通讯作者:魏慧珍,Tel: (0791)7119651; E-mail: weihezhen-101@126.com.

品检定所提供,延胡索药材为市售;乙腈为色谱纯,对硝基酚、磷酸二氢钠、氢氧化钠、盐酸、碳酸氢钠、磷酸等均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 延胡索乙素解离常数的测定

2.1.1 分析波长的选择 分别用浓度为 0.01 mol/L 的氢氧化钠、盐酸、碳酸氢钠溶液配制浓度为 5×10^{-5} mol/L 对硝基酚溶液,并配制 1×10^{-3} mol/L 的延胡索乙素溶液,分别在紫外分光光度计上扫描并记录吸收光谱。在 400 nm 处,对硝基酚分子型和离子型的吸收度差值很大;而延胡索乙素的最大吸收波长在 280 nm 处,其分子型和离子型的吸收度没有变化,故选定 400 nm 为分析波长。

2.1.2 复测对硝基酚的值 分别用浓度为 0.01 mol/L 氢氧化钠、盐溶液和 pH 为 7.0、7.2、7.4 的磷酸盐缓冲液配制浓度为 5×10^{-5} mol/L 的对硝基酚溶液,在 400 nm 处测定上述对硝基酚溶液的吸收度(A),并精确测量后 3 种溶液的 pH 值,以复测对硝基酚的 pK_a^T 值,结果见表 1。根据公式 $pK_a^T(\text{Ind}) = \text{pH} - \lg(A_2 - A)/(A - A_1) - \lg \gamma$,其中, A_1 100% 对硝基酚的吸收度, A_2 为 100% 对硝基酚阴离子的吸收度,采用 Debye-Huckel 公式($\lg \gamma = 0.5115Z^2 \sqrt{I} / (1 + 1.5 \sqrt{I})$)计算一价离子的活度系数(γ), I 为溶液离子强度,测得指示剂对硝基酚的 pK_a^T 值为 7.20,与文献^[7]7.14 基本一致,说明本方法准确可靠。

表 1 对硝基酚 pK_a^T 值

pH	A	$pK_a^T(\text{Ind})$
7.0	0.364	7.19
7.2	0.452	7.20
7.4	0.562	7.21

($A_1 = 0.002, A_2 = 0.891, \lambda = 400 \text{ nm}, t = (25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$)

2.1.3 延胡索乙素 pK_a^T 值的测定 配制 5 种含不同浓度的延胡索乙素(B)和它的盐酸盐(HB^+)溶液,加入对硝基酚使其浓度为 5×10^{-5} mol/L 的对硝基酚溶液,于 400 nm 处,以空白试剂作参比,测定吸收度,测定结果见表 2。按 $pK_a^T = pK_a^T(\text{Ind}) - \lg[B]/[\text{HB}^+] + \lg(A - A_1)/(A_2 - A) + 2 \lg \gamma$,计算延胡索乙素的 pK_a^T 为 6.49 ± 0.07 。

表 2 分光光度指示剂法测定的延胡索乙素 pK_a^T 值

$[B] \times 10^{-3}$	$[\text{HB}^+] \times 10^{-3}$	$[B]/[\text{HB}^+]$	A	pK_a^T
0.2645	0.5000	0.529	0.075	6.49
0.4035	0.5000	0.807	0.121	6.54
0.5425	0.5000	1.085	0.153	6.54
0.6120	0.5000	1.224	0.153	6.48
0.8205	0.5000	1.641	0.172	6.42

2.2 延胡索乙素的 pK_a^T 值对其分离检测影响的考察

2.2.1 流动相 pH 对延胡索乙素保留行为影响的考察 以 C_{18} 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 磷酸加三乙胺调节 pH(45:55),检测波长 280 nm 等色谱条件,考察不同 pH(2、4、5、6、7)流动相对延胡索乙素保留行为的影响。以流动相 pH 对保留时间(t)作图,见图 1。

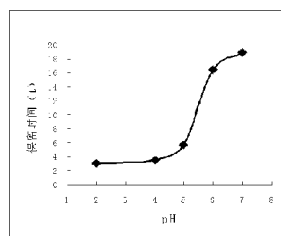


图 1 液相色谱流动相 pH 与延胡索乙素保留时间(t)关系图

2.2.2 流动相 pH 对延胡索乙素柱效影响的考察 色谱条件同“2.2.1”,考察不同 pH(2、4、5、6、7)流动相对延胡索乙素柱效(理论塔板数)的影响。以流动相 pH 对理论塔板数(n)作图,见图 2。

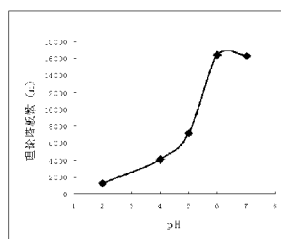


图 2 液相色谱流动相 pH 与延胡索乙素理论塔板数(n)关系图

2.2.3 延胡索药材中延胡索乙素分离条件的确定 通过考察流动相 pH 对延胡索乙素保留行为和柱效影响,确定延胡索药材中延胡索乙素分离的色谱条件为:Kromasil C_{18} 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 磷酸(三乙胺调节 pH 6)(45:55),检测波长 280 nm,进样量 10 μL ,柱温:25 $^\circ\text{C}$,流速:1.0 mL/min。对照品和样品色谱图,见图 3。

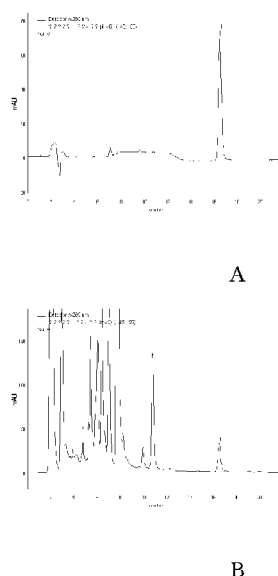


图 3 延胡索乙素对照品(A)、延胡索药材供试品(B)色谱图

HPLC 法测定江西省境内粗叶木药材中虎刺醇和虎刺醇-11-甲醚的含量*

★ 万慧芳** 李斌 赖学文 刘庆华 黄小英 朱英 (江西中医学院 南昌 330006)

关键词:粗叶木;虎刺醇;虎刺醇-11-甲醚;含量测定

中图分类号:R 282.5 文献标识码:A

长尾粗叶木是茜草科粗叶木属植物 *Lasianthus cuminatissimus*, 分布于我国南方各省。其根俗称“铁骨人参”, 民间多用于治疗风湿性关节痛, 腰肌劳损, 跌打损伤等。《全国中草药汇编》记载其功效为“行气活血, 祛湿强筋, 止痛。主治跌打损伤, 风湿关节痛, 腰肌劳损”^[1], 前文^[2]我们已对长尾粗叶木进行了系统的化学成分研究, 结果表明虎刺醇和虎刺醇-11-甲醚(图 1)2 个萜醌类成分是长尾粗叶木中含量较高的指标性成分。本文采用反相高效液相色谱法, 对江西境内 3 种主要粗叶木药材, 长尾粗叶木、污毛粗叶木 *Lasianthus hartii* 和榄绿粗叶木 *Lasianthus japonicas* 的根和茎中虎刺醇和虎刺醇-

11-甲醚的含量进行了研究, 为有效控制药材质量及合理利用药用植物资源提供了理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Agilent1200 高效液相色谱仪, 大连依利特 Hypersil shim-pack-ODS-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 虎刺醇和虎刺醇-11-甲醚对照品(长尾粗叶木根中分离得到, 经面积归一化法测定纯度均大于 98%); 分析甲醇及色谱甲醇, 超纯水。

1.2 药材 长尾粗叶木 *Lasianthus acuminatissimus* 药材 2005 年 12 月采于江西省上饶县, 污毛粗叶木 *Lasianthus hartii* 2006 年 1 月采于江西省宜

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(20262003, 20662006)

** 通讯作者:李斌, 教授, Tel:86-791-7118992, E-mail:lily7077@tom.com

3 讨论

(1) 采用分光光度法测定药物的解离常数, 测定方法操作简便, 结果准确可靠。

(2) 从图 1 可看出, 流动相 pH 对延胡索乙素保留值的影响与其 pKa 值有明显的相关性, 即当流动相 pH 低于 pKa-1.5 时, 延胡索乙素主要以离子化状态存在, 保留值较小; 当 pH 到达 pKa±1.5 时, 延胡索乙素由离子化状态逐渐转化为分子化状态, 保留值迅速增加。因此, 由测定成分保留值随流动相 pH 变化关系可推测该成分的酸碱性, 反之, 已知测定成分的 pKa 对其分离条件的选择有重要的指导意义。

(3) 由图 2 可知, 在保留时间较短时, 柱效随保留时间延长而升高, 当保留达到一定程度, 柱效不再升高甚至下降。

(4) 从上述实验可知, 已知药物的解离常数对其分离检测条件选择有重要指导作用, 在延胡索药材中延胡索乙素分离条件的选择过程中, 当流动相 pH 为 6 时, 延胡索乙素大多以分子型存在, 而其他酸性成分(或离子型存在的生物碱)及中

性成分, 较短时间内出柱, 因此, 对延胡索乙素的分离不产生干扰, 故分离效果较好。

参考文献

- [1] 刘芳, 罗跃娥. 延胡索研究概况[J]. 天津中医学院学报, 2005, 24(4): 240-242.
- [2] 高军林, 李通化, 高洪涛. 自动快速地测定药物的电离常数[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(5): 417-418.
- [3] 刘西京, 杨大坚, 罗杰英. 紫外分光光度法测定葛根素的解离常数[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2206-2207.
- [4] 王国清, 杨波, 刘迎春. 分光光度指示剂法测定槐定碱的电离常数[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(6): 424-426.
- [5] 杜松, 邓英杰, 梁伟. 氧化苦参碱的理化常数[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(2): 80-84.
- [6] Robinson R A et al, The ionization constant of hydroxylamine[J]. J Phys Chem, 1961, 65: 1279.
- [7] 张兰, 陈国南, 方禹之. 毛细管电泳-电化学检测法用于生物碱电离常数线性模型的研究[J]. 化学学报, 2004, 62(10): 975-978.

(收稿日期: 2008-01-05)