

# HPLC 和 HPCE 法测定罂粟壳中 3 种生物活性生物碱

郝红艳, 郭济贤\*, 顺庆生<sup>1</sup>, 梁杰, 郁韵秋, 车镇涛<sup>2</sup>

(上海医科大学药学院, 上海 200032; <sup>1</sup> 上海职工医学院, 上海 200237; <sup>2</sup> 香港科技大学化学系, 香港)

**摘要** 目的: 建立中药罂粟壳中 3 种生物活性生物碱——吗啡、可待因和罂粟碱的含量测定法, 根据样品测定结果提出其质量评价的建议。方法: HPLC 法和 HPCE。结果: 用 HPLC 及 HPCE 法测定了罂粟壳 12 个样品中 3 种生物碱含量, 并根据两种方法含量测定的结果建议罂粟壳所含 3 种生物碱以吗啡含量不低于 0.04%, 可待因含量不低于 0.02% 以及罂粟碱含量不低于 0.01% 为宜。结论: 本文建立的 HPLC 及 HPCE 含量测定法均具有快速、简便、灵敏、分离度好等特点, 适用于罂粟壳中 3 种生物碱的分离测定。

**关键词** 罂粟壳; 生物碱; 高效液相色谱法; 高效毛细管电泳法; 质量评价

中药罂粟壳 (*Pericarpium Papaveris*) 为罂粟科植物罂粟 *Papaver somniferum* L. 的成熟果壳。有敛肺、涩肠、止痛的功能, 用于久咳、久泻、脱肛、脱腹疼痛<sup>[1]</sup>。罂粟壳所含的主要生物活性成分为吗啡类生物碱, 久服易成瘾。《中国药典》(1995 年版) 一部罂粟壳项下尚未收载其含量测定及质量标志。目前尚无用 HPLC 法对罂粟壳中多种生物碱同时进行含量测定, 有关 HPCE 法的测定虽有报道<sup>[2]</sup>, 但有待改进。

本文建立了 HPLC 及 HPCE 两种方法, 对罂粟壳 12 个样品中的 3 种主要生物活性生物碱——吗啡 (morphine)、可待因 (codeine) 和罂粟碱 (papaverine) 进行含量测定, 并就结果提出了其质量评价的建议, 可供药典委员会和药品检验部门参考。

## 实验部分

### 1 HPLC 法

#### 1.1 仪器与材料

高效液相色谱仪 洗脱液泵: Waters 600E, 进样器: U6K-032135, 检测器: Waters 990, 柱温调节器: Waters TCM, 色谱处理机: PowerMate 2, 软盘操作系统: Waters 991。

试剂 甲醇 (色谱纯, 天津四友生物医学技术开发公司), 三蒸水 (实验室自制), 三乙胺 (分析纯, 上海试剂三厂), 乙酸铵 (分析纯, 上海试剂四厂)。

**对照品** 吗啡、磷酸可待因和盐酸罂粟碱由中国药品生物制品检定所麻醉品实验室提供, 批号: 9201。

**生药样品** 分别由上海市药品检验所季申、重庆市药品检验所李财学、江苏省药品检验所刘舞霞、广东省药品检验所陆惠文、上海市药材公司黄哲夫、安徽省药品检验所薛玉梅以及四川省药品检验所徐愚聪提供, 购自各药材公司。样品均经上海医科大学药学院郭济贤教授鉴定。生药样品经粉碎, 过 40 目筛后, 于烘箱中 55 ~ 60 °C 干燥 30 min, 放冷, 置干燥器中备用。

#### 1.2 分析方法的建立与评价

**色谱条件** 色谱柱: Waters  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 柱 (300 mm × 3.9 mm ID)。流动相: 0.5% 乙酸铵—1% 三乙胺—甲醇 (49: 1: 50)。流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。检测波长 230 nm。灵敏度 0.02 AUFS。柱温 25 °C。

**分离情况** 3 种生物碱对照品 HPLC 色谱图见图 1。各生物碱分离情况良好, 分离度均 > 1.5, 峰形对称, 拖尾因子 T (0.95 < T < 1.05) 和保留时间的天内精密度 (RSD < 2.0%) 均符合分析要求。

**标准曲线及线性范围** 精密称取吗啡和磷酸可待因对照品约 5 mg, 盐酸罂粟碱对照品约 2.5 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容。分别吸取对照品溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0 和 5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 制成 7 个浓度梯度的标准溶液, 依次吸取 10  $\mu$ L 进样, 作 HPLC 分析。以峰面积对进样量进行回归处理。表 1 的数据表明, 在一定的浓度范围内, 3 种生物碱对照品的峰面积与进样量均呈良好的线性关系。

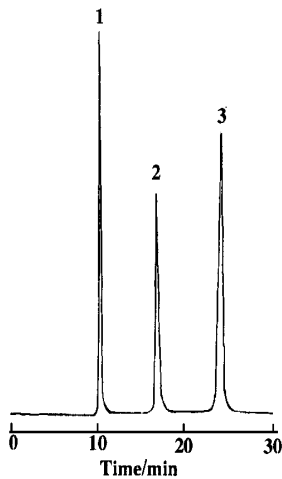


Fig 1 HPLC chromatogram of three alkaloids. 1. Morphine; 2. Codeine phosphate; 3. Papaverine hydrochloride.

Tab 1 HPLC data for calibration graphs

Alkaloid	Regression equation	r	Linearity range / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Morphine	$Y = -9.53 \times 10^{-5} + 0.0204 X$	0.9999	0.08 ~ 1.00
Codeine phosphate	$Y = 9.71 \times 10^{-6} + 0.0136 X$	0.9997	0.08 ~ 1.00
Papaverine hydrochloride	$Y = 1.19 \times 10^{-5} + 0.119 X$	0.9996	0.04 ~ 0.51

**提取条件的优化** 考察了甲醇、无水乙醇和 2.5% 乙酸溶液 3 种溶剂, 3 种生物碱在甲醇的提取率最高, 且用甲醇提取的样品杂质干扰较小。所以, 选择甲醇为溶剂。

为了优化提取的条件, 以 A (样品量)、B (超声时间) 和 C (浸泡时间) 为 3 个因素, 设计  $L_9(3^4)$  正交试验。各因素的 3 水平分别为: A 150 mg, 120 mg, 100 mg; B 45 min, 1.0 h, 1.5 h; C 8 h, 16 h, 24 h。

**样品液的制备:** 精密称取罂粟壳(上海 B) 样品粉末 A, 精密加入甲醇 5.0 mL, 超声 B, 室温浸泡 C, 再超声 30 min, 静置 30 min, 取出上清液, 经微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$  F 膜) 过滤, 弃去初滤液, 取续滤液进行 HPLC 分析。

极差(R) 结果表明, 3 个因素中样品量对提取率影响最大, 其次是样品浸泡时间, 影响最小的是样品超声时间。试验表明, 生药样品量约 120 mg, 超声 1 h 和浸泡 24 h 的条件较为理想, 提取率最高, 故确定为样品的提取方案。

**精密称取罂粟壳(上海 B) 样品粉末,** 按 1.2.4 中提取方案制备样品液, 进行 HPLC 测定。分别考察天内及日间精密称。结果符合中药含量测定方法(RSD < 5%) 的要求。

**加样回收率** 精密称取罂粟壳(上海 B) 样品粉末约 120 mg 6 份, 精密加入一定量甲醇与对照品储备液, 使 5.0 mL 溶剂中分别含有储备液 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 按“提取条件优化”制备样品液, 进行 HPLC 分析。结果回收率(n = 5): 吗啡 101.5% (RSD 0.9%), 可待因 100.2% (RSD 1.9%), 罂粟碱 100.3% (RSD 1.5%)。

**灵敏度** 精密吸取对照品储备液 0.05, 0.1, 0.15 和 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容。待基线平稳后进样 10  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 分析, 取信噪比略大于 3 的量为检测限。吗啡、磷酸可待因和盐酸罂粟碱的检测限分别为 0.02, 0.03, 0.005  $\mu\text{g}$ 。

1.3 样品分析

按照“提取条件优化”平行制备样品液各 3 份, 进行 HPLC 分析, 测定了 12 种不同来源罂粟壳样品中 3 种生物碱的含量, 结果见表 2。样品谱图见图 2。

2 HPLC 法

2.1 仪器与材料

高效毛细管电泳仪: Beckman P/A CE System 5010, 数据处理软件系统: System Gold。

试剂 十二烷基硫酸钠(SDS, 电泳纯, BIO-RAD), 硼砂(分析纯, Riedel-de Haen), 硼酸(分析纯, Nacal Tesque), 甲醇(色谱纯, Mallinckrodt)。

对照品与生药样品均与 HPLC 法相同。

Tab 2 Alkaloid contents in Pericarpium Papaveris determined by HPLC (n = 3)

Source	Morphine		Codeine		Papaverine	
	Content / %	RSD / %	Content / %	RSD / %	Content / %	RSD / %
Anhui	0.10	0.95	0.07	2.31	0.038	0.99
Chongqing	0.06	0.68	0.02	2.59	0.009	1.27
Gansu	0.05	0.74	0.07	1.11	0.009	1.49
Guangdong	0.05	2.96	0.04	1.79	0.009	2.78
Hebei	0.04	1.43	0.04	0.82	0.011	2.71
Hubei	0.08	0.34	0.02	0.96	0.017	2.32
Jiangsu	0.06	1.59	0.04	2.67	0.022	1.48
Shanghai (A)	0.05	0.65	0.05	2.40	0.032	3.32
Shanghai (B)	0.04	0.78	0.06	2.73	0.017	2.12
Shanxi	0.04	1.46	0.06	1.36	0.017	2.68
Sichuan	0.04	0.69	0.03	2.43	0.014	3.79
Yunnan	0.07	0.81	0.04	1.56	0.009	1.84

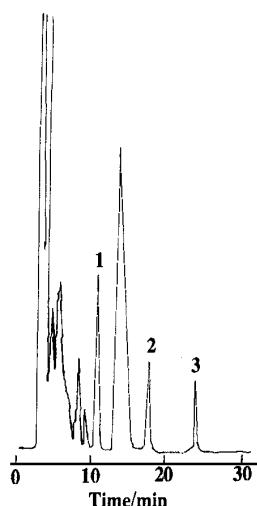


Fig 2 HPLC chromatogram of Pericarpium Papaveris. 1. Morphine; 2. Codeine; 3. Papaverine.

## 2.2 分析方法的建立与评价

**HPCE 色谱条件** 毛细管柱: 无涂层熔融石英毛细管,  $50 \mu\text{m}(\text{ID}) \times 47 \text{cm}$  (有效长度  $39.4 \text{cm}$ )。缓冲溶液:  $80 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS— $60 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼砂硼酸溶液 (pH 7.8)— $10\%$  甲醇。以气压方式进样, 进样时间  $1.5 \text{s}$ 。运行电压  $25 \text{kV}$ 。检测波长  $214 \text{nm}$ 。温度  $25 \text{C}$ 。

**分离情况** 3 种生物碱对照品 HPCE 色谱图见图 3。各生物碱分离情况良好, 分离度均  $>1.5$ , 峰形对称, 拖尾因子  $T(0.95 < T < 1.05)$  和保留时间的天内精密性 ( $\text{RSD} < 2.0\%$ ) 均符合分析要求。

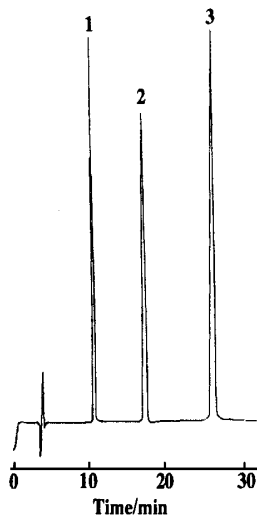


Fig 3 HPCE electropherogram of three alkaloids. 1. Morphine; 2. Codeine phosphate; 3. Papaverine hydrochloride.

**标准曲线及线性范围** 精密称取吗啡和磷酸可待因对照品约  $5 \text{mg}$ , 盐酸罂粟碱对照品约  $2.5 \text{mg}$  于  $25 \text{mL}$  量瓶中, 加甲醇溶解并定容。分别吸取对照品溶液  $0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 \text{mL}$  于  $10 \text{mL}$  量瓶中, 甲醇定容, 制成 6 个浓度梯度的标准溶液。经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 与同法已滤缓冲溶液 ( $80 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS— $60 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼砂硼酸溶液, pH 7.8) 1:1 混合, 超声  $30 \text{min}$ , 依次进样  $1.5 \text{s}$ , 进行 HPCE 分析。以峰面积对浓度进行回归处理。表 3 的数据表明, 在一定的浓度范围内, 3 种生物碱对照品的峰面积与浓度均呈良好的线性关系。

Tab 3 High performance capillary electrophoresis (HPCE) data for calibration graphs

Alkaloid	Regression equation	$r$	Linearity range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Morphine	$Y = -8.257 \times 10^{-3} + 0.0163 X$	0.9999	4.02 ~ 80.32
Codeine phosphate	$Y = -2.869 \times 10^{-3} + 0.0183 X$	0.9997	4.02 ~ 80.32
Papaverine hydrochloride	$Y = -3.323 \times 10^{-3} + 0.0417 X$	0.9999	2.01 ~ 40.16

**精密性** 精密称取罂粟壳(上海 B) 样品粉末, 按 1.2.4 提取方案制备样品液, 与已滤缓冲溶液 ( $80 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS— $60 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼砂硼酸溶液, pH 7.8) 1:1 混合, 超声  $30 \text{min}$ , 进行 HPCE 测定。分别考察天内及日间精密性。结果均符合中药含量测定方法 ( $\text{RSD} < 5\%$ ) 的要求。

**加样回收率** 精密称取罂粟壳(上海 B) 样品粉末约  $120 \text{mg}$  6 份, 精密加入一定量甲醇与对照品储备液, 使  $5.0 \text{mL}$  溶剂中分别含有储备液  $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 \text{mL}$ , 按“提取条件优化”制备样品液, 与已滤缓冲溶液 ( $80 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS— $60 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼砂硼酸溶液, pH 7.8) 1:1 混合, 超声  $30 \text{min}$ , 进行 HPCE 测定。结果回收率 ( $n=3$ ) 吗啡为  $100.9\%$  ( $\text{RSD} 1.5\%$ ), 可待因为  $100.8\%$  ( $\text{RSD} 1.9\%$ ), 罂粟碱为  $100.6\%$  ( $\text{RSD} 1.9\%$ )。

## 2.3 样品分析

按照“提取条件优化”平行制备样品液各 3 份, 进行 HPCE 分析, 测定了 12 种不同来源罂粟壳样品中 3 种生物碱的含量, 结果见表 4。样品谱图见图 4。

**Tab 4 Alkaloid contents in Pericarpium Papaveris determined by HPCE (n = 3)**

Source	Morphine		Codeine		Papaverine	
	Content / %	RSD / %	Content / %	RSD / %	Content / %	RSD / %
Anhui	0.10	2.87	0.08	3.29	0.037	2.41
Chongqing	0.06	1.48	0.04	2.71	0.015	1.43
Gansu	0.05	1.72	0.07	3.71	0.011	2.79
Guangdong	0.07	3.21	0.03	3.32	0.010	1.24
Hebei	0.04	3.26	0.05	1.91	0.013	2.90
Hubei	0.09	1.90	0.02	2.68	0.018	2.52
Jiangsu	0.04	2.07	0.03	2.24	0.010	2.41
Shanghai (A)	0.06	2.99	0.02	2.99	0.031	2.25
Shanghai (B)	0.05	3.05	0.05	1.98	0.019	1.68
Shanxi	0.04	1.33	0.05	2.19	0.020	3.23
Sichuan	0.05	1.91	0.04	2.43	0.014	1.98
Yunnan	0.08	2.39	0.05	2.29	0.013	3.19

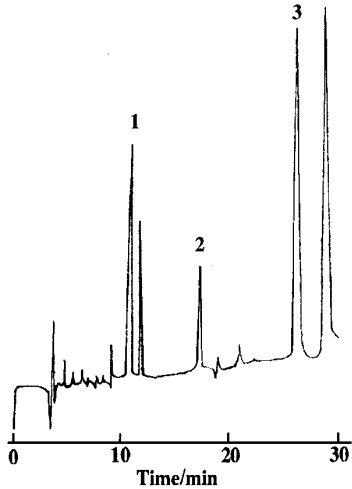


Fig 4 HPCE electropherogram of Pericarpium Papaveris. 1. Morphine; 2. Codeine; 3. Papaverine.

### 讨 论

本文用 HPLC 和 HPCE 两种方法分别对罂粟壳中 3 种生物碱进行了分离与含量测定。其中 HPLC 法系首次报道。HPCE 法使用的是胶束电动

毛细管电泳分析法,缓冲溶液的选择有所改进,与文献<sup>[2]</sup>比较,生物碱的峰形与分离度均较理想,可同时测定 3 种生物碱,且方法的考察均符合分析的要求。

本实验样品均以超声为提取手段,并通过正交试验比较了样品提取率中 3 个主要因素对提取率的影响,降低了摸索样品最佳提取方案的盲目性。

HPLC 含量测定结果显示:罂粟壳中吗啡的含量为 0.04% ~ 0.10%,可待因的含量为 0.02% ~ 0.07%,罂粟碱的含量为 0.009% ~ 0.038%。HPCE 含量测定结果显示:罂粟壳中吗啡的含量为 0.04% ~ 0.10%,可待因的含量为 0.02% ~ 0.08%,罂粟碱的含量约为 0.010% ~ 0.037%。两种方法对罂粟壳中 3 种生物碱的含量测定结果基本一致。不同来源的罂粟壳样品的生物碱含量存在一定的差异,这可能与生长环境和采收方法等多种因素有关。

根据本文样品分析的结果,初步提出罂粟壳质量评价的指标,建议罂粟壳中吗啡含量不低于 0.04%,可待因含量不低于 0.02% 以及罂粟碱含量不低于 0.01% 为宜。此两种方法的建立及由含量测定结果提出的罂粟壳质量评价的建议,可供药典委员会和药品检验部门参考。

此外,还对罂粟属其他 3 种植物虞美人 *Papaver rhoens* L.、重瓣罂粟 *P. somniferum* L. var. *paeoniaeflorum* Hort. 和野罂粟 *P. nudicaule* L. 的果实同法进行了含量测定,结果 3 种生物碱均未检出。

致谢 上海市药检所季申等提供样品;香港科大化学系马翠英,蔡晓芸,段金殿等协助 HPCE 工作。

### 参 考 文 献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 广州: 广东科技出版社, 1995. 326
- 2 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. 色谱, 1997, 15: 438

## DETERMINATION OF 3 BIO ACTIVE ALKALOIDS IN THE CHINESE DRUG PERICARPIUM PAPAVERIS BY HPLC AND HPCE

Hao Hongyan, Guo Jixian, Shun Qingsheng<sup>1</sup>, Liang Jie, Yu Yunqiu and Che Zhuntao<sup>2</sup>

(*School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032; <sup>1</sup>Shanghai Medical College for Health Staff, Shanghai 200237; <sup>2</sup>Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong*)

**ABSTRACT** **AIM:** To establish HPLC and HPCE methods for determination of 3 bio active alkaloids (morphine, codeine and papaverine) in the Chinese drug Pericarpium Papaveris, and to evaluate the quality of the drug. **METHODS:** HPLC system includes ODS column, 0.5% ammonium acetate — 1% triethylamine — methanol (49:1:50) and UV detection (230 nm). HPCE system includes a 50  $\mu\text{m}$  (ID)  $\times$  47 cm (effective length is 39.4 cm) capillary, 80  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS — 60  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  borax (0.8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  boric acid adjusted to pH 7.8) — 10% methanol and UV detection (241 nm). **RESULTS:** From the contents of the 3 bio active alkaloids in Pericarpium Papaveris it was suggested that the quality of the Chinese drug Pericarpium Papaveris should contain morphine, codeine, and papaverine not less than 0.04%, 0.02% and 0.01%, respectively. **CONCLUSION:** The two methods prove to be accurate, precise and sensitive, and can be used for the determination of 3 bio active alkaloids in Pericarpium Papaveris. The two methods and the quality evaluation can be referred for the Chinese Pharmacopeia Commission and institutes for drug control.

**KEY WORDS** Pericarpium Papaveris; alkaloids; high performance liquid chromatography; high performance capillary electrophoresis; quality evaluation