

分析测试

毛细管电泳测定钩藤中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量

肖 竦

(贵阳医学院基础医学院化学教研室, 贵州 贵阳 550004)

摘要:建立了钩藤中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量的测定方法:采用高效毛细管电泳法,运行缓冲液为25 mmol/L磷酸盐缓冲液(磷酸调pH为2.5)-甲醇(体积比为4:1),运行电压21 kV,柱温25℃,检测波长250 nm。结果:钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱、线性范围分别为0.00176~0.01760 mg/mL($r=0.9998$),0.00183~0.01830 mg/mL($r=0.9996$),0.00101~0.01010 mg/mL($r=0.9998$),加样回收率($n=6$)分别为99.73%(RSD1.17%)、99.23%(RSD 1.23%)、98.91%(RSD 1.02%)。试验证明该法操作简便,分析快速,结果准确,重现性好,适用于钩藤中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量的测定。

关键词:高效毛细管电泳;钩藤;钩藤碱;异钩藤碱;去氢钩藤碱

中图分类号:O657.5

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2011)08-0090-03

Determination of rhynchophylline, isorhynchophylline and dehydrogenase rhynchophylline in uncaria by HPCE

XIAO Song

(Department of chemistry, Basic medical college, Guiyang medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: Objective: To establish a new method for determination of rhynchophylline, isorhynchophylline and dehydrogenase rhynchophylline in *Uncaria*. Method: rhynchophylline, isorhynchophylline and dehydrogenase rhynchophylline in *Uncaria* were determined by using high performance capillary electrophoresis (HPCE), The background electrolyte system selected was 25 mmol·L⁻¹ phosphate buffer (pH = 2.5)-methanol (4:1). applied voltage was 21 kV; temperature was 25℃. diode array detector set at 250 nm. Results: the linear range of rhynchophylline, isorhynchophylline and dehydrogenase rhynchophylline was 0.00176~0.0176 mg·mL⁻¹ ($r=0.9998$), 0.00183~0.0183 mg·mL⁻¹ ($r=0.9996$), 0.00101~0.0101 mg·mL⁻¹ ($r=0.9998$), The average recovery was 99.73% (RSD1.17%), 99.23% (RSD 1.23%) and 98.91% (RSD 1.02%). Conclusion: The method is simple, rapid and reproducible, and could be used for determination of rhynchophylline, isorhynchophylline and dehydrogenase rhynchophylline in *Uncaria*.

Key words: HPCE; *Uncaria*; rhynchophylline; isorhynchophylline; dehydrogenase rhynchophylline

钩藤为茜草科植物钩藤的带钩茎枝,作为常用的中药材之一,其性微寒、味甘,具有清热镇惊、平肝熄风的功能,主要有效成分为钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱等^[1]氧化吲哚类生物碱。文献报道 HPLC 法测定钩藤生物碱含量较多^[2]。为了有效控制钩藤的内在质量,确保其临床疗效,在相关文献研究的基础上^[3],笔者采用毛细管电泳测定钩藤中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量,为其质量控制提供了一种新的快速、简便有效的检测方法。

1 仪器与试剂

HP^{3D}毛细管电泳仪, Hewlett-Packard, 美国; 二极管阵列紫外检测器(DAD), 惠普公司; 熔融石英毛细管(64.5 cm × 75 μm), 河北永年光导纤维厂。

维厂。

盐酸,磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,氢氧化钠均为分析纯;甲醇为色谱纯;水为超纯;钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110307—200909;110210—20090112;110301—20090307),对照品质量分数均≥98%。

钩藤分别采集于贵阳、遵义、安顺,为茜草科植物钩藤的干燥带钩茎枝,自然通风干燥。

2 试验方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱适量,加甲醇溶解,0.45 μm 滤膜滤过配置成质量浓度分别为0.176、0.183、0.101 mg/mL 对照品溶液。

收稿日期:2011-03-29;修回日期:2011-05-18

作者简介:肖竦(1974-),女,理学硕士,副教授,主要从事分析化学研究,13595020808,xsong0851@163.com。

2.1.2 测试溶液的制备

取阴干磨碎过40目药材粉末1g,精密称定。加甲醇100mL超声处理2h,滤液水浴蒸干,所得残渣加稀盐酸(pH=2)10mL溶解,并转移至25mL容量瓶中,甲醇稀释至相应刻度,摇匀。使用前离心,取上清液经微孔滤膜过滤器(0.45 μm)过滤作为供试品溶液。具体色谱图见图1。

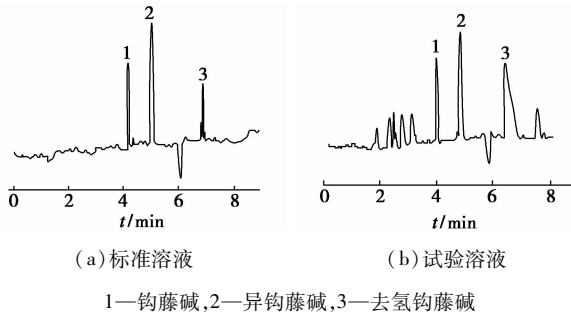


图1 毛细管电泳色谱图

2.2 电泳条件

运行缓冲液为25mmol/L磷酸盐缓冲液(磷酸调pH为2.5)-甲醇(体积比4:1)。毛细管柱温25℃;恒定电压21kV;压力进样0.5psi×10s;检测波长为250nm。每次进样前依次水和运行缓冲溶液冲洗3min。标准溶液和运行缓冲溶液过0.45 μm微孔滤膜,并超声脱气后使用。

2.3 线性关系

精密吸取对照品溶液1、2、4、6、8、10mL于100mL量瓶中,甲醇定容,得不同浓度标准系列溶液,按测定条件检测。然后对其质量浓度(X)为横坐标,对照品峰面积(Y)为纵坐标作回归曲线,得回归方程:

钩藤碱 $Y = 0.597X + 0.0476, r = 0.9998,$
 线性范围:0.00176 ~ 0.01760 mg/mL (1)

异钩藤碱 $Y = 0.469X + 0.0237, r = 0.9996,$
 线性范围:0.00183 ~ 0.01830 mg/mL (2)

去氢钩藤碱 $Y = 0.698X + 0.0147, r = 0.9998,$
 线性范围:0.00101 ~ 0.01010 mg/mL (3)

2.4 稳定性试验

取试验溶液分别在0、2、8、12、24h依次测定,记录峰面积(RSD),计算钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱RSD值为1.21%、1.09%、1.11%,表明测试溶液在24h内稳定。

2.5 精密度试验

精密吸取标准溶液在同一色谱条件下连续进样6次,测得RSD值,考察仪器的精密度。结果钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱RSD值为1.01%、

1.17%、1.03%,表明仪器的精密度良好。

2.6 重现性试验

对同一批样品6份,按照上述方法分别制备测试液,测定。结果钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱平均质量浓度为0.056、0.067、0.037mg/g,RSD为1.21%、1.27%、1.35%。试验结果表明,重复性良好。

2.7 加样回收率试验

回收率是指在实验条件下,于含有被分析组分的样品中加入已知量的被分析组分,在正确的操作下得到的分析结果增量占加入的已知量的百分比。本研究中,取已知含量钩藤(钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量分别为0.056、0.067、0.037mg/g)6份,各约0.5g,精密称定。分别按钩藤碱、异钩藤碱和去氢钩藤碱含量的80%、100%、120%加入测试溶液。按“2.1.2”方法制备对照品溶液,在“2.2”项色谱条件下进行分析,计算回收率,结果见表1,钩藤碱的平均回收率为98.73%,异钩藤碱的平均回收率为99.23%,去氢钩藤碱的平均回收率为98.91%。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

| 成分 | 称样量/g | 含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|
| 钩藤碱 | 0.5007 | 0.0280 | 0.0224 | 0.0502 | 99.27 | 98.73 | 1.17 |
| | 0.5016 | 0.0281 | 0.0224 | 0.0503 | 98.97 | | |
| | 0.5017 | 0.0281 | 0.0281 | 0.0556 | 97.89 | | |
| | 0.5019 | 0.0281 | 0.0281 | 0.0560 | 99.37 | | |
| | 0.5021 | 0.0281 | 0.0337 | 0.0614 | 98.57 | | |
| | 0.5011 | 0.0281 | 0.0337 | 0.0612 | 98.28 | | |
| 异钩藤碱 | 0.5007 | 0.0335 | 0.0269 | 0.0599 | 98.34 | 99.23 | 1.23 |
| | 0.5016 | 0.0336 | 0.0269 | 0.0604 | 99.67 | | |
| | 0.5017 | 0.0336 | 0.0336 | 0.0668 | 98.87 | | |
| | 0.5019 | 0.0336 | 0.0336 | 0.0673 | 100.14 | | |
| | 0.5021 | 0.0336 | 0.0403 | 0.0738 | 99.70 | | |
| | 0.5011 | 0.0336 | 0.0403 | 0.0734 | 98.64 | | |
| 去氢钩藤碱 | 0.5007 | 0.0185 | 0.0148 | 0.0331 | 98.35 | 98.91 | 1.02 |
| | 0.5016 | 0.0186 | 0.0148 | 0.0334 | 100.32 | | |
| | 0.5017 | 0.0186 | 0.0186 | 0.0368 | 97.98 | | |
| | 0.5019 | 0.0186 | 0.0186 | 0.0370 | 98.79 | | |
| | 0.5021 | 0.0186 | 0.0223 | 0.0406 | 98.64 | | |
| | 0.5011 | 0.0185 | 0.0223 | 0.0407 | 99.37 | | |

2.8 样品测定

准确称取不同产地钩藤各约 1 g,按照测试溶液制备方法制备,按照上述方法测定,每个样品测定 3 次,记录峰面积,计算 3 份样品钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱含量,结果见表 2。

表 2 不同产地的钩藤中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱含量($n=3$)

| 产地 | 钩藤碱 | | 异钩藤碱 | | 去氢钩藤碱 | |
|----|--|-----------|--|-----------|--|-----------|
| | 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD/ % | 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD/ % | 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD/ % |
| 贵阳 | 0.059 | 1.02 | 0.067 | 0.98 | 0.040 | 1.31 |
| 遵义 | 0.061 | 1.21 | 0.069 | 1.03 | 0.049 | 1.17 |
| 安顺 | 0.057 | 0.98 | 0.061 | 1.14 | 0.037 | 1.04 |

3 结果讨论

3.1 温度的影响

实验考察了分离温度(15~35℃)对钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱分离的影响。结果发现随着分离温度的增加,三者迁移时间均明显减小,综合考虑,最终选择 25℃。

3.2 工作电压的影响

实验考察了 16~25 kV 范围内的电压对钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱分离的影响。结果表明,分离电压过高或过低均不利于钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的分离。电压较低,分离分析时间较长;电压升高,分析时间缩短,但基线噪音显著增大,且峰形拖尾。综合考虑分离度、分辨率和灵敏度等因素,选择 21 kV 为工作电压。

3.3 缓冲液的优化

本试验考察不同缓冲液及浓度、pH 等操作参数对分离的影响。结果发现以 25 mmol/L 磷酸盐缓冲

液(磷酸调 pH 为 2.5)-甲醇为背景电解质时,甲醇的比例过低,色谱图峰变宽,出现拖尾,相反峰则变尖。综合考虑,缓冲溶液和甲醇的体积比为 4:1,此条件下钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱在较短的时间内达到基线。

3.4 缓冲溶液浓度的影响

缓冲溶液的选择对于减小溶质与管壁的相互作用,克服峰形畸变,改善分离度都具有十分重要的作用^[4]。实验中考察了磷酸盐缓冲液浓度(15~50 mmol/L)对分离的影响,结果表明伴随磷酸盐缓冲液浓度增加,三者迁移时间逐渐增加。为了使三者得到分离,实验选取磷酸盐缓冲液浓度为 25 mmol/L。

4 结论

用高效毛细管电泳测定钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量,操作简便,分析快速,结果准确,消耗试剂少,测试费用低,不用有毒试剂,不污染环境等优点,适用于钩藤中钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱的含量的测定。

参考文献

- [1] Kim T, Lee J, Yu J, et al. Corynoxine isolated from the hook of *Uncaria rhynchophylla* inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation through the blocking of extracellular signal regulated kinase 1/2 phosphorylation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(11): 2073-2078.
- [2] 于晨,杨丽娟,马斌,等. HPLC 法同时测定复方制剂中 4 种钩藤生物碱成分含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27(11): 897-901.
- [3] 陈思蔚,付春梅,李章万,等. 高效毛细管电泳法测定钩藤中的钩藤碱[J]. *华西药杂志*, 2008, 23(3): 355-356.
- [4] 王洪伦,明永飞,李玉林,等. 毛细管电泳法分析唐古特白刺种子中两种生物碱[J]. *分析试验室*, 25(30): 9-11. ■

《现代化工》“海外纵横”栏目征稿启事

《现代化工》“海外纵横”主要介绍国外某一国家或地区热点科研领域的开发应用状况、开发方向,或某一行业的发展现状、发展方向和问题探讨,以及有突出表现的国外公司的科研动态和研发经验等。

有意投稿的作者,请与“海外纵横”栏目编辑童志勇联系,以确定合适的主题和格式。联系电话:010-64444105-839, e-mail: tongzy@cheminfo.gov.cn。(本刊编辑部)