

非水毛细管电泳法测定青风藤中青藤碱的含量

陈俊,赵亮,张海,张国庆(第二军医大学东方肝胆外科医院药材料,上海 200438)

摘要 目的:建立青风藤药材中青藤碱的含量测定方法。方法:青风藤药材粉碎后过筛,取粉末用70%乙醇超声提取,未涂渍熔融石英毛细管(50 μm ×48.5 cm,有效长度40 cm),以30 mmol/L磷酸二氢钠溶液(水:甲醇=1:4)为缓冲液,运行电压25 kV,温度25℃,内标为盐酸小檗碱,检测波长为210 nm,运行时间20 min。结果:在此条件下青藤碱与内标及其他成分能达到基线分离,青风藤在34.66~346.6 μg/mL范围内呈良好的线性关系 $Y=0.029X-0.03$, $r=0.9998$,最低检测限为3.466 μg/mL($S/N=3$),最低定量限为17.33 μg/mL($S/N=10$),平均加样回收率为100.1%($RSD=3.1%$, $n=6$),低、中、高浓度日内、日间精密度 RSD 均小于5%($n=3$)。结论:此方法可用于青风藤药材中青藤碱的含量测定,具有方法简便快速、准确、试剂消耗量少的优点。

关键词 青风藤;青藤碱;非水毛细管电泳;含量测定

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)06-0434-03

Determination of sinomenine in *Caulis Sinomenii* by nonaqueous capillary electrophoresis

CHEN Jun, ZHAO Liang, ZHANG Hai, ZHANG Guo-qing (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for determination of sinomenine in *Caulis Sinomenii*. **Methods:** *Caulis Sinomenii* was extracted with 70% alcohol after pulverized to powder. An untreated fused-silica capillary (48.5 cm ×50 μm, 40 cm effective length) was used, the running buffer was 30 mmol/L sodium acid phosphate, the solvent was water: methanol=1:4, the voltage was 25 kV, the temperature was 25℃, the internal standard was berberine hydrochloride, the ultraviolet wavelength was set at 210 nm, running time was 20 minute. **Results:** Sinomenine, internal standard and impurities were separated by baseline in above conditions, sinomenine was liner in the range of 34.66~346.6 μg/mL, linear equation was $Y=0.029X-0.03$, $r=0.9998$, the correlation was 0.9998, the limit of determination was 3.466 μg/mL($S/N=3$), the limit of quantitation was 17.33 μg/mL($S/N=10$), the average recovery was 100.1% ($RSD=3.1%$, $n=6$), RSD of intra-day and inter-day were lower than 5% ($n=3$). **Conclusion:** The method can be utilized for the determination of sinomenine in *Caulis Sinomenii*, it was the advantages of convenience, fastness, accuracy, low sample and reagent consumption.

KEY WORDS *Caulis sinomenii*; sinomenine; nonaqueous capillary electrophoresis; determination

青风藤为防己科植物青藤(*Sinomenium actum* (Thunb.) Rehd et wils)及毛青藤(*Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd et wils var *cinereum* Rehd et wils)的干燥藤茎。又名青藤、寻风藤,其味苦、辛、性平,用于风湿痹痛、关节肿胀、肢体疼痛麻木搔痒^[1,2]。青风藤中含有多种生物碱,其中青藤碱含量最高,是其主要药理学活性成分,具有抗炎、免疫抑制、抗心率失常等作用^[3-5]。目前对青风藤药材的质量控制方法主要采用反相高效液相色谱法测定其中的青藤碱含量^[1,6],该方法配制缓冲液过程操作繁琐,耗时较长,且色谱峰脱尾严重,不利于青藤碱的准确测定。本法

采用非水毛细管电泳模式对青风藤中的青藤碱含量进行测定,方法简便,快速,结果准确,可靠。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 安捷伦公司 Agilent^{3D} CE高效毛细管电泳仪(美国);二极管阵列检测器;Agilent ChemStation工作站;OR DN MODEL 828型 pH计(美国奥立龙公司);KUDOS SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司);METTLER AE240型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司);DJ-04药材粉碎机(上海淀久公司)。

1.2 试剂 青风藤两批次药材均购自上海德康大药房,产地福建,经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定为防己科植物青藤的干燥藤茎,青藤碱(0774-200206)及内标小檗碱(110713-

作者简介:陈俊(1979-),女,药师。Tel: (021) 81875582, E-mail: chenjuntdj@126.com.

通讯作者:张国庆。Tel: (021) 81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com.

200208)对照品购自中国药品生物制品检定所, (纯度 98.0%), 磷酸二氢钠、磷酸、甲醇及乙醇等试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 电泳条件 毛细管: 未涂渍熔融石英毛细管 (河北永年光学纤维厂), 50 μm \times 48.5 cm (有效长

度 40 cm); 缓冲液: 30 mmol/L 磷酸二氢钠溶液 (甲醇: 水 = 4: 1), 电压: 25 kV; 温度: 25 $^{\circ}\text{C}$; 压力进样: 50 mbar \times 8 s; 内标盐酸小檗碱; 检测波长: 210 nm; 运行前用 0.1 N NaOH 及缓冲液各冲洗 5 min, 运行时间为 20 min。在此条件下青藤碱与内标及其他成分能达到基线分离, 柱效大于 11 000, 结果见图 1。

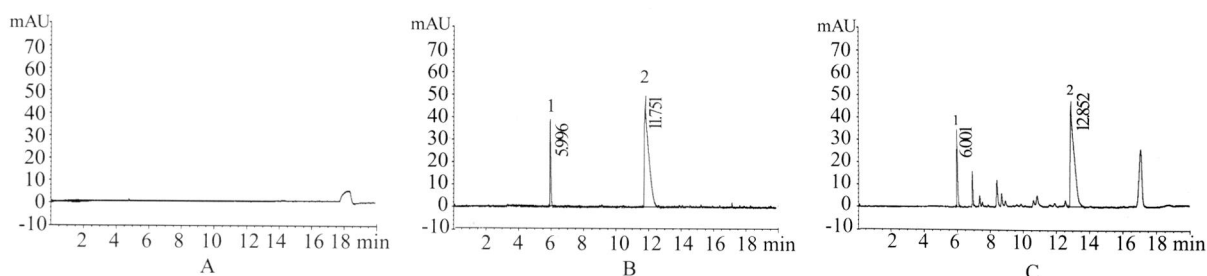


图 1 青藤碱毛细管电泳分离色谱图

A 空白样品; B 对照品与内标; C: 样品; 1 内标盐酸小檗碱, 2 青藤碱

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取青藤碱对照品 17.33 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 0.693 2 mg/mL 青藤碱对照品母液, 置冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱 53.2 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 1.064 mg/mL 盐酸小檗碱溶液, 作为内标, 置冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取青风藤药材饮片, 粉碎后过 60 目筛, 取粉末约 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 20 mL, 称重, 超声 15 min, 取出放冷至室温, 称重, 用 70% 乙醇补足减失重量, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 精密量取续滤液 4 mL 置 10 mL 量瓶中, 精密加入内标小檗碱溶液 1 mL, 用甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀作为供试品溶液。

2.3 标准曲线及线性 精密量取青藤碱对照品母液各 0.5、1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入 1 mL 盐酸小檗碱内标溶液, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 34.66、69.30、138.6、208.0、277.3、346.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。取前述 6 个浓度的青藤碱对照品溶液按“2.1 项”下的电泳条件进样, 以对照品峰面积同内标峰面积之比为纵坐标 (Y), 对照品溶液的浓度为横坐标 (X), 得回归方程: $Y = 0.029X - 0.03$, $r = 0.9998$; 线性范围: 34.66 ~ 346.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 精密度 取浓度为 34.66、208.0、346.6 $\mu\text{g/mL}$ 的低、中、高 3 种浓度对照品溶液按“2.1 项”下的电泳条件连续进样 5 次, 以及连续 5 d 分别进样一次, 进行日内、日间精密度考察。结果低、中、高浓度日内精密度分别为 2.5%、1.6%、4.4% ($n = 5$), 日间精密度分别为 3.8%、2.0%、4.1% ($n = 5$), 表明该方法日内、日间精密度良好。

2.5 检测限及定量限 取青藤碱对照品溶液, 以不同比例稀释后按“2.1 项”下的电泳条件进样, 以信噪比为 3 时的浓度作为最低检测限, 以信噪比为 10 时的浓度作为最低定量限, 结果青藤碱最低检测限为 3.466 $\mu\text{g/mL}$, 最低定量限为 17.33 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 稳定性 按“2.1 项”下的电泳条件, 取供试品溶液分别于 0、1、2、4、6、8、12 h 进样分析, 记录青藤碱与内标峰面积的比值, 考察样品室温放置稳定性, 结果发现样品在 12 h 内放置稳定, RSD 为 3.2% ($n = 7$)。

2.7 提取回收率 取青藤碱对照品 47.36 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入 70% 乙醇溶解并定容至刻度, 制成 0.947 2 $\mu\text{g/mL}$ 青藤碱对照品溶液。取青风藤药材粉末约 0.25 g, 精密称定, 加入上述青藤碱对照品溶液 5 mL, 再加入 70% 乙醇溶液 15 mL, 按照“2.2.3 项”下供试品溶液制备过程操作, 按“2.1 项”下的电泳条件进样分析, 平行操作 6 份, 考察提取回收率, 结果见表 1。

2.8 样品含量测定 取青风藤药材粉末约 0.5 g, 按照“2.2.3 项”下供试品溶液制备过程操作提取

样品,按“2.1项”下的电泳条件进样分析,每批药材平行操作3份,按标准曲线计算出样品的含量。两批青风藤中青藤碱的含量均大于0.5%,符合2005版药典标准,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果 (n=6)

序号	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	4.736	4.825	101.9		
2	4.736	4.752	100.3		
3	4.736	4.711	99.5		
4	4.736	4.972	104.8	100.1	3.1
5	4.736	4.512	95.3		
6	4.736	4.693	99.1		

表2 样品测定结果 (n=6)

样品重 (g)	测得量 (mg)	含量	平均值	RSD (%)
批次1				
0.50125	7.728	1.54		
0.50020	8.016	1.60	1.58	2.0
0.50046	7.954	1.59		
批次2				
0.50021	8.129	1.63		
0.49988	8.765	1.75	1.71	4.2
0.50008	8.733	1.75		

3 讨论

3.1 缓冲盐种类及有机溶剂对分离的影响 考察了硼砂、乙酸铵及磷酸盐水溶液作为缓冲液对青风藤中青藤碱的分离效果,发现当使用硼砂或乙酸铵配制缓冲液调节pH酸性时,青藤碱不出峰。以磷酸二氢钠水溶液作为缓冲液时,青风藤样品中青藤碱出峰时间早,峰宽较宽,且与杂峰不能完全分离,当向缓冲液中加入甲醇作为改性剂时,出峰时间延长,峰宽变窄,当甲醇:水=4:1时,青藤碱与周围杂峰能够很好的分离,当甲醇的量再增加时,电流变小,容易断流,故采用甲醇:水=4:1作为缓冲液的溶剂,以非水毛细管电泳模式分离青藤碱。

3.2 缓冲液pH值对分离的影响 以30mmol/L磷酸二氢钠溶液(甲醇:水=4:1)为缓冲液,pH值从6.32~4.12之间每隔0.2个单位考察一次,用磷酸调节pH值,发现pH值对分离度几乎没有影响,但随着pH降低,青藤碱迁移时间延长,当pH值小于4.0时,电泳过程容易断流。

3.3 缓冲液浓度对分离的影响 磷酸二氢钠溶液(甲醇:水=4:1)浓度从10mmol/L至40mmol/L之间每隔5mmol/L配制缓冲液,考察缓冲液浓度对

分离度的影响。结果发现浓度低于20mmol/L时,产生的电流小于10μA,电泳过程很容易断流,当浓度大于30mmol/L时,分离度变化不大,但青藤碱迁移时间延长,故选择30mmol/L的磷酸二氢钠作为缓冲溶液。

3.4 温度及电压对分离的影响 温度从15~30之间每隔5考察一次,发现温度对出峰时间影响较大,但对分离度影响较小,温度越低,出峰时间越晚,考虑到分析时间,选择室温作为运行温度。由于采用非水毛细管电泳模式,当电压小于25kV时,产生的电流较小,容易断流,且会降低青藤碱与周围杂峰的分度,延长分析时间;当选择30kV作为分离电压时,电泳过程容易断流,可能由于加大电压后电流增大,产生的焦耳热增加,导致毛细管中甲醇水混合溶液产生气泡而断流,故选用25kV作为分离电压。

3.5 毛细管内径及长度对分离的影响 考察了75μm及50μm内径的毛细管柱,结果发现采用50μm内径毛细管柱时,青藤碱与杂峰的分度优于使用75μm内径的毛细管柱。考察了40、50及60cm有效长度的毛细管柱对分离的影响,发现增加毛细管柱长度能够增加青藤碱与杂峰的分度,但分析时间延长;使用60cm有效长度的毛细管柱时,由于产生的电流很小,很容易断流,采用40cm有效长度毛细管柱能够满足青藤碱分离的要求。

3.6 目前青藤碱分析方法主要为反相高效液相色谱法,多采用磷酸盐调节pH值碱性,抑制青藤碱的解离,使之在硅胶填料色谱柱上有所保留,此法配制缓冲液及调节pH过程操作繁琐,时间较长,且青藤碱的色谱峰脱尾严重,柱效不高,影响测定准确性。采用非水毛细管电泳模式测定青风藤中青藤碱的含量,方法简便快速,重复性好,试剂消耗量少,结果可靠,可以作为青风藤药材的质量控制方法。

参考文献:

- [1] 中国药典 2005版[S].一部.2005:135.
- [2] 江苏新医学院.中药大词典[M].第一卷.上海:上海科学技术出版社,1978:1234.
- [3] 王有志,李春荣,莫志贤.青风藤化学成分与药理研究进展[J].医药导报,2004,23(3):177.
- [4] 孙霞,于晓佳,邱明丰,等.青风藤药理与临床研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2005,11(4):363.
- [5] 吴宗群.中药青风藤的药理作用及临床应用[J].中国药师,2006,9(9):857.
- [6] 严华,马双成. RP-HPLC法测定青风藤中青藤碱的含量[J].药物分析杂志,2006,26(2):201.