

· 论 著 ·

HPLC-ELSD 法测定中药钩藤中钩藤碱的含量

胡岚岚, 汤建林[△], 徐 颖, 李晶晶
(第三军医大学新桥医院临床药理基地, 重庆 400037)

摘 要:目的 建立中药钩藤中钩藤碱的高效液相色谱-蒸发散射检测器法(HPLC-ELSD)的测定方法。方法 采用甲醇冷浸超声法处理钩藤药材,经 0.22 μm 的滤膜过滤后进样分析;色谱柱为 Diamonsil C18(4.6 mm×200 mm,5 μm),流动相组成,乙腈:0.01 mol/L 醋酸铵=20:80,采用梯度洗脱方式,乙腈比例在 20 min 内从 20%变为 60%,流速为 1.0 mL/min,柱温为室温 30 ℃,进样量为 20 μL。ELSD 参数:漂移管温度 105 ℃,载气(N₂)流速 3.0 mL/min。结果 钩藤碱测定的浓度范围内呈良好线性($r=0.999\ 0$),加标回收率大于 96.1%,日内、日间变异系数均小于 8.0%,重复性试验 RSD 为 4.7%,稳定性试验钩藤碱高、中、低浓度溶液室温 48 h 内 RSD 为 6.8%、7.2%、9.1%。结论 该方法成功地应用于钩藤碱含量的测定,成为一个全面评价钩藤质量的新方法。

关键词:高效液相色谱-蒸发散射检测器法;钩藤;钩藤碱

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.10.004 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)10-1089-03

Quantification analysis of rhynchophylline in uncaria rhynchophylla by HPLC-ELSD
Hu Lanlan, Tang Jianlin[△], Xu Ying, Li Jingjing

(Clinical Pharmacology Base, Affiliated Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract:Objective To establish a method using HPLC-ELSD to determine rhynchophylline in a traditional Chinese herb, Uncaria rhynchophylla. **Methods** Cold maceration with methanol and supersonic extraction was used to treat the medical material, and the supernatant was filtered through a 0.22 μm membrane. Chromatography was performed on a diamonsil C18 (4.6 mm×200 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile(0.01 mol/L) and ammonium acetate[20:80(V:V)]; then the proportion of acetonitrile changed from 20% to 60% within 20min by using gradient elution method, the flow rate was 1.0mL/min, the column temperature was 30 ℃ and the sample size was 20 μL. ELSD: the tube temperature was 105 ℃, the nitrogen flow rate was 3.0 mL/min. **Results** The calibration curve was linear ($r=0.999\ 0$) among the concentration range, the recovery of the method was higher than 96.1%, the coefficients of variation for inter day and intra day were both lower than 8.0%, the relative standard deviation(RSD) of the reproducibility test was 4.7% and the stability test was 6.8%、7.2% and 9.1% from the high density to the low. **Conclusion** As an accurate and reliable method, it can be used for determining rhynchophylline in uncariar rhynchophylla.

Key words: HPLC-ELSD; uncariar rhynchophylla; rhynchophylline

钩藤[uncariar rhynchophylla(Miq) jacks]原名钩藤,其植物形态为常绿木质藤本,为茜草科植物钩藤的带钩茎枝,具有息风定惊、清热平肝的功效,其药理活性成分主要为生物碱^[1-2]。目前,已从钩藤药材中分离出的生物碱包括钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛碱和去氢钩藤碱等,其中以钩藤碱含量最高,占主要生物碱的 28%~50%^[3],因其是主要的活性物质,可以作为评价钩藤药材和制剂的质量指标。鉴于此,研究出一种快速有效的测定钩藤碱的含量方法尤为重要。目前,文献中报道钩藤碱测定方法大多采用的是高效液相色谱-紫外检测器法(HPLC-UV)^[4-9],这些方法主要的缺点在于分析时间长,且对梯度洗脱适应性较差。此外,液相色谱-质谱检测法(LC-MS)对鼠血浆中含量测定的方法也有报道,该法虽然显示出较高的灵敏度,但是针对的是体内的研究,且质谱作为常规的检测器使用时成本较高^[10]。本研究采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)对钩藤碱进行检测,ELSD是一种极为普遍的质量检测器,它的响应与非挥发性待测物的质量相关。ELSD具有广泛的梯度和溶剂兼容性,可以获得较平稳的基线,无溶剂峰干扰,且分析时间较UV短。本研究对评价钩藤药材的质量提供了新的研究方法和科学依据,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Alltech 高效液相色谱系统(配 2000ES 型 ELSD 检测器, Series III 型高压泵, Alltech 公司);色谱柱: Dikma Diamonsil C18(4.6 mm×200.0 mm, 5 μm); MC-210S 型电子天平(精度 0.01 mg, Sartorius 公司); Abbott Diagnostics, Division 离心机(made in west Germany); XH-86 多用途旋涡混合器(江苏省阜宁县罗桥校办工厂), Millipore 超纯水系统。对照品: 钩藤碱对照药(批号: 10172-080117, 含量 98%, 南昌贝塔生物科技有限公司), 乙腈、甲醇均为色谱纯(Merck 公司); 醋酸铵(纯度大于或等于 99.0%, 天津市光复精细化工研究所), 试验用水均为 Millipore 超纯水, 钩藤干药材产自湖南。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液的配制 精密称取 2.76 mg 钩藤碱, 用甲醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 配成浓度为 276.0 μg/mL 的钩藤碱储备液, 4 ℃冰箱保存备用。取其储备液用甲醇对半稀释至浓度分别为 138.00、69.00、34.50、17.25、8.62、4.31 μg/mL 的标准工作液, 4 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 钩藤药材的处理 采用“醇提法”工艺: 将干燥后的钩藤药材粉碎, 准确称取 10 g 药粉, 加入 50 mL 甲醇混匀后, 置 4 ℃冰箱中冷浸 12 h, 然后超声 30 min, 过滤后定容于 100

mL 容量瓶中,得到药材冷浸液。进入 HPLC-ELSD 分析,进样前经 0.22 μm 的滤膜过滤。

1.2.3 HPLC-ELSD 色谱条件 色谱柱:Dikma Diamonsil C18(4.6 mm×200.0 mm,5 μm);流动相:乙腈联合 0.01 mol/L 醋酸铵;梯度法洗脱:乙腈 0~20 min 内比例由 20:80 递增至 60:40;流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;进样量为 20 μL。ELSD 参数:飘逸管温度 105 ℃,载气流速 3.0 mL/min,放大倍数为 2;分流器:关。

1.2.4 HPLC-UV 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C18(4.6 mm×200.0 mm,5 μm);流动相:甲醇联合 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(氨水 pH=8.0);梯度法洗脱:乙腈 0~40 min 内比例由 30:70 递增至 60:40,41 min 乙腈比例恢复 30:70;流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;检测波长:254 nm;进样量为 20 μL。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ELSD 条件的优化 试验通过进样 20 μg/mL 的钩藤碱标准品来对 ELSD 两个参数(漂移管温度和气体流速)进行优化。在流动相(乙腈:醋酸铵=20:80)的基础上,设定了初始飘逸管温度为 102 ℃,气体流量为 2.78 mL/min,然后比较了在不同流速(2.6、2.8、3.0、3.2、3.4 mL/min)和不同温度

(95、100、105、110、115 ℃)条件下待测物钩藤碱的信号响应(峰面积)及噪音信号,以此得到最优的信噪比及平衡基线。以噪音信号比对峰面积作图帮助确认最佳条件,最终选择检测器漂移管温度为 105 ℃,氮气流速为 3.0 mL/min,该条件下,待测物钩藤碱峰面积最大,且噪音信号适中,见图 1。

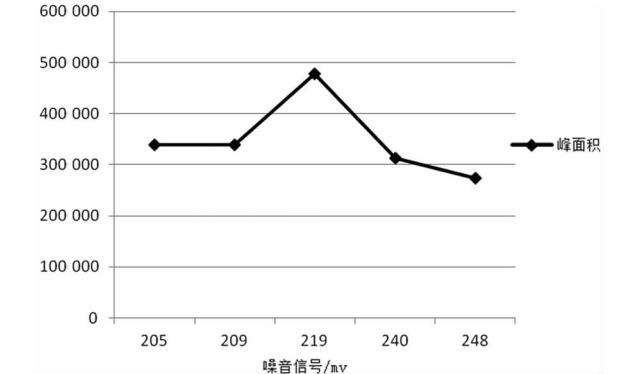
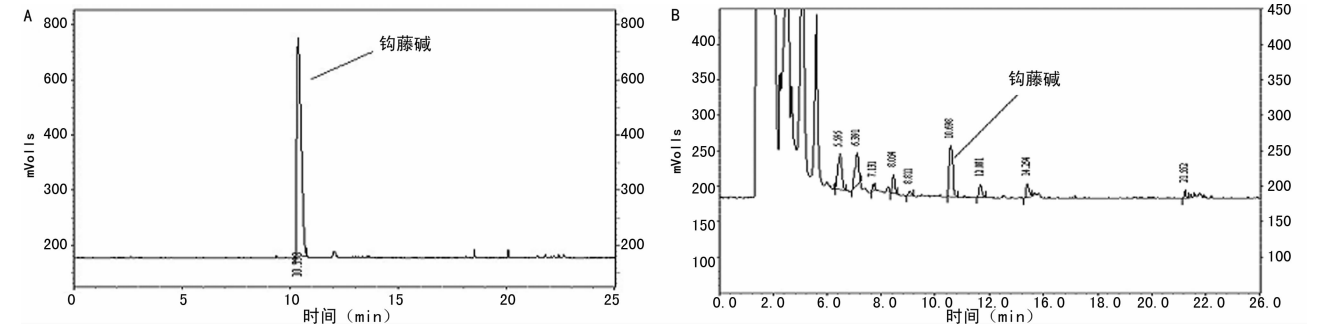


图 1 ELSD 噪音信号比对峰面积作图

2.2 分离特性 在上述条件下,测得钩藤碱与钩藤药材提取物的色谱图(图 2)。由图可见,待测物峰形良好,且不受其余生物碱及杂质峰的干扰,药材中钩藤碱的保留时间约为 10.4 min。



A: 钩藤碱标准品;B: 钩藤药材提取物。

图 2 钩藤碱与药材提取物色谱图

2.3 标准曲线和线性范围 取上述配置好的系列工作液依次进样分析,每一浓度进样 20 μL。记录色谱图,以峰面积为横坐标,以浓度比为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $Y = 3.563e - 5X + 7.639$ ($r = 0.999$, $level = 7$, $n = 2$),线性范围为 4.31~276.00 μg/mL。

2.4 加标回收率试验 按照 1.2.2 方法处理钩藤药材得到冷浸液,将其分别与 276.00、69.00、17.25 μg/mL 的钩藤碱标准品按 1:1 的比例混合均匀,得到 138.00、34.50、8.62 μg/mL 的钩藤加标样品,每个浓度平行配 5 份;再将上述药材冷浸液与甲醇等体积混合,得到 3 份药材提取物的基质溶液。将其进样分析,计算公式:平均加标回收率=(加标样品测定值-基质样品测定值)/加标量×100%。计算得低、中、高 3 种浓度的钩藤加标的相对回收率($n = 6$)分别为 103.5%、97.2%、96.1%;变异系数分别为 11.4%、8.9%、7.0%,低、中、高 3 种浓度的相对回收率均符合要求,方法准确可靠,见表 1。

2.5 精密度试验 按照 1.2.2 方法处理钩藤药材得到冷浸液,将其分别与 276.0、69.0、17.25 μg/mL 的钩藤碱标准品按 1:1 的比例混合均匀,得到 138.0、34.5、8.62 μg/mL 的钩藤加标样品,每个浓度平行配 5 份,在 1 d 内不同时间处理测定,

考察日内精密性;连续 3 d 于同一时间配制 138.0、34.5、8.62 μg/mL 的钩藤加标样品各 5 份,处理测定,考察日间精密性。计算得低、中、高 3 种浓度的日内变异系数($n = 5$)分别为 8.0%、3.8%、6.3%;日间变异系数($n = 5$)分别为 6.5%、3.6%、6.1%。结果表明日内、日间变异系数在允许范围内,方法精密性良好。

表 1 钩藤碱加标回收率试验

试验样品	<i>n</i>	测得浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)	回收率 ($\bar{x} \pm s$, %)	相对标准化 偏差(%)
钩藤碱基质溶液	3	—	20.331	—	—
加标样品-高	5	138.00	152.967	96.1±6.7	7.0
加标样品-中	5	34.50	53.861	97.2±8.9	8.9
加标样品-低	5	8.62	29.261	103.5±11.8	11.4

—:此项无数据。

2.6 稳定性试验 按照 1.2.2 方法处理钩藤药材得到冷浸液,将其分别与 276.00、69.00、17.25 μg/mL 的钩藤碱标准品按 1:1 的比例混合均匀,得到 138.00、34.50、8.62 μg/mL 的钩藤加标样品,每个浓度平行配 5 份,−4 ℃冰箱放置,于 0、12、24、48 h 复管测定。考察冻存稳定性,计算得 48 h 内稳定

性得变异系数为 6.8%、7.2%、9.1%。表明钩藤碱提取物样品在 48 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 按照 1.2.2 方法平行处理钩藤药材得到浸液 9 份,测定样品中钩藤碱含量来考察重复性。结果方法重复性的变异系数为 4.7%。结果该方法的重现性符合测定要求。

2.8 HPLC-UV 与 HPLC-ELSD 测定结果对比 HPLC-UV 法目前广泛应用于钩藤碱鉴别及含量测定,本文分别采用文献报道的 HPLC-UV^[4] (实测样品色谱图见图 3) 和所建立的 HPLC-ELSD 两种检测方法对钩藤碱样品进行了测定,比较两种方法测定结果的相关性。从测定结果来看,HPLC-ELSD 在选择性和测定时间方面较好,而 HPLC-UV 在灵敏度方面较优,以 HPLC-UV 法测定结果为 X,HPLC-ELSD 法测定结果为 Y,进行直线回归,评价其相关性(图 4)。由线性回归图表明,两种方法的结果之间具有良好的相关性,相关系数为 $r^2 = 0.9749$ 。

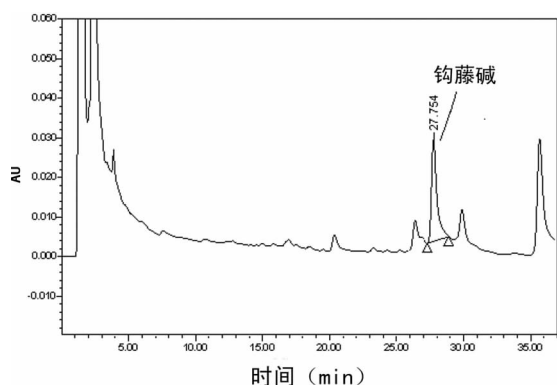


图 3 HPLC-UV 法测定钩藤提取物色谱图

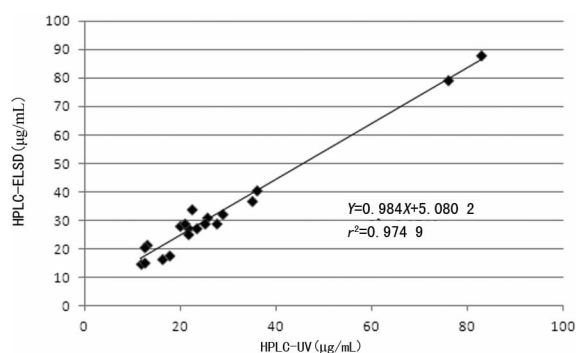


图 4 UV 法与 ELSD 法测定钩藤碱含量的相关性

3 讨论

根据 ELSD 检测器的原理,流动相中若存在非挥发性的杂质,将会产生较大的噪音信号,所以本试验选择的是具有挥发性的醋酸铵和乙腈作为流动相^[11]。然后,考察了醋酸铵的浓度为 2.00、1.00、0.50、0.10、0.05 和 0.01 mol/L 时对待测物钩藤碱灵敏度的影响,结果发现随着缓冲盐浓度在一定范围的降低,灵敏度出现增加的趋势,所以最终选择了浓度为 0.01 mol/L 的醋酸铵。这一点也表明了 ELSD 的响应与雾化器中气溶胶颗粒的大小有一定的关系,而气溶胶的大小又依赖于流动相的密度和黏度^[12-14]。此外,由于钩藤提取物中的杂质与钩藤碱在等度条件下分离效果差,本文便采用了梯度洗脱的方法。本试验结果显示,当流动相中乙腈的初始比例小于 20% 时,分析时间将会延长,并且当流动相中乙腈的初始比例大于 20% 时,提取物中的杂质与待测物不能分开,最终选择了乙腈

在 0~20 min 内比例由 20:80 递增至 60:40,这样不仅节约了分析时间,而且提高了分辨率。

ELSD 主要是通过将流动相蒸发后对挥发程度小于流动相的待测物进行检测,所以雾化气体流速和漂移管温度是蒸发光散射检测器的两个重要参数。其中,雾化气体的流量决定雾化时形成的液滴大小,气体流量越高形成的液滴越小,也就比大尺寸的液滴更容易蒸发;适当的漂移管温度取决于流动相组成和流速,以及样品的挥发性^[15]。本试验考察了不同的参数条件下的信号响应及噪音信号,以此获得了最优灵敏度、最佳参数值。

本试验利用了钩藤碱的不挥发性,建立了一种新的测定钩藤提取物中钩藤碱含量的 HPLC-ELSD 方法。与 HPLC-UV^[4-9] 相比,该方法分析时间短,对梯度洗脱适应性较好,且基线平稳,使得测定更为快速和稳定。同时,本法新颖、准确、重复性好,并与 HPLC-UV 法具有良好的相关性,可作为钩藤碱含量测定的依据。

参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版(一部) [S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:240.
- [2] Shi JS, Yu JX, Chen XP, et al. Pharmacological actions of Uncaria alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(2): 97-101.
- [3] Zhou JY, Zhou SW. Antihypertensive and neuroprotective activities of rhynchophylline: The role of rhynchophylline in neurotransmission and ion channel activity [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(1): 15-27.
- [4] 刘明, 汤建林, 胡岚岚, 等. 中药钩藤中钩藤碱含量的测定 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(14): 1539-1541.
- [5] 张荣, 刘睿, 刘启德, 等. 钩藤中钩藤碱、异钩藤碱的提取与含量测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 338-341.
- [6] 仲崇林, 赵为民, 杨美林, 等. 反相高效液相色谱法测定植物钩藤中钩藤碱含量 [J]. 应用化学, 2006, 23(9): 1061-1062.
- [7] Qu JL, Gong TX, Ma B, et al. Comparative study of fourteen alkaloids from uncaria rhynchophylla hooks and leaves using HPLC-Diode array detection-atmospheric pressure chemical ionization/MS method [J]. Chem Pharm Bull, 2012, 60(1): 23-30.
- [8] 宋坤, 毛颐晴, 季德. 高效液相色谱法测定萝藦安神片中钩藤碱的含量 [J]. 中国药师, 2006, 9(4): 325-326.
- [9] 张鹏, 黄瑞松, 覃冬杰, 等. 钩藤药材中钩藤碱含量测定方法的建立 [J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(1): 19-22.
- [10] Wang W, Ma CM, Hattori M. Metabolism and Pharmacokinetics of Rhynchophylline in Rats [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(4): 669.
- [11] Eom HY, Park SY, Kim M, et al. Comparison between evaporative light scattering detection and charged aerosol detection for the analysis of saikosaponins [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(26): 4347-4354.
- [12] Vehovec T, Obreza A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(10): 1549-1556. (下转第 1094 页)

3 讨 论

SAP 的临床发病占了急性胰腺炎的 20%,但其病死率却一直居高不下,目前临床上尚无特效的治疗方法,SAP 的发生机制极其复杂,主要是胰腺腺酶的自身消化,以及随后的继发感染和炎症细胞浸润所导致的一系列级联炎症反应所致^[7]。近年来研究发现了鱼油特有的抗炎和免疫调节作用,因而受到越来越多学者的青睐,本研究 ω -3 鱼油脂肪乳联合常规治疗 SAP 患者,结果显示加用 ω -3 鱼油脂肪乳联合治疗比常规治疗具有较好的临床疗效。

SAP 患者处于一种高分解和低合成代谢状态,蛋白质营养不良可直接抑制 T 淋巴细胞的免疫功能,本研究显示 SAP 患者 CD4 T 淋巴细胞的比例显著低于健康对照,说明 SAP 患者抵抗力降低,使用 ω -3 鱼油脂肪乳后有利于机体免疫功能的恢复,在治疗第 5 天时 CD4 细胞的比例就可以恢复到正常水平。同时治疗组可以提前肠功能恢复时间,有利于早期转入肠内营养支持治疗,对于保护肠道黏膜的免疫屏障功能,减少肠道细菌移位导致的内源性感染具有积极的作用,因为有统计显示肠道细菌移位导致的内源性感染占了 SAP 继发感染的 90% 左右^[6-8]。

炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 等是体内的主要的炎症因子,能够激发炎症的级联反应,损伤机体的组织器官,有研究显示 IL-1 β 和 TNF- α 是 SAP 预后的一个独立危险因素,其表达水平的变化可以预示病情的进展^[9-10]。本研究显示,SAP 患者 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平显著高于健康对照组,与上述的结果相一致,加用 ω -3 鱼油脂肪乳联合治疗后可以显著降低 SAP 患者 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平。 ω -3 鱼油脂肪乳降低 IL-1 β 和 TNF- α 的可能机制是 ω -3 鱼油脂肪中的主要活性成分二十碳五烯酸与花生四烯酸竞争相同的环加氧酶(COX-1、2),抑制了前列腺素 E2 (PGE2) 的产生,而 PGE2 是一个已知的合成 IL-1 β 和 TNF- α 等炎症介质的主要原料^[11-15]。

综上所述,本研究显示在肠外营养液中添加 ω -3 鱼油脂肪乳注射液,应用于 SAP 患者的治疗,能显著缩短患者的肠功能恢复和住院天数,减少并发症和病死率,临床疗效显著,增加 CD4 细胞的比例和下调 IL-1 β 和 TNF- α 炎症因子的表达是其主要的的作用机制,可见 ω -3 鱼油脂肪乳联合常规治疗在 SAP 治疗方面有着广泛的应用前景,值得临床推广应用。

参考文献:

- [1] Su MS, Lin MH, Zhao QH, et al. Clinical study of distribution and drug resistance of pathogens in patients with severe acute pancreatitis[J]. Chin Med J, 2012, 125(10): 1772-1776.
- [2] Shen HN, Lu CL, Li CY. The Effect of Hospital Volume on Patient Outcomes in Severe Acute Pancreatitis[J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12(1): 112-121.

- [3] Huang L, Ma J, Tang Y, et al. siRNA-based targeting of fractalkine overexpression suppresses inflammation development in a severe acute pancreatitis rat model[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(3): 514-520.
- [4] Malmstrom ML, Hansen MB, Andersen AM, et al. Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2012, 41(2): 271-277.
- [5] Cabre E, Manosa M, Gassull MA. Omega-3 fatty acids and inflammatory bowel diseases - a systematic review[J]. Br J Nutr, 2012, 107(Suppl 2): S240-252.
- [6] 余杨. 精氨酸强化的全肠外营养对重症急性胰腺炎患者免疫功能的影响[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(3): 532-533.
- [7] Kylanpaa ML, Repo H, Puolakkainen PA. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(23): 2867-2872.
- [8] 熊德巧, 杜彪, 郭华庭. 肠外营养液中加入 ω -3 鱼油脂肪乳注射液的临床应用[J]. 中国药房, 2012, 23(18): 1709-1710.
- [9] Lee JH, An CS, Yun BS, et al. Prevention effects of ND-07, a novel drug candidate with a potent antioxidative action and anti-inflammatory action, in animal models of severe acute pancreatitis[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 687(1/3): 28-38.
- [10] Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(41): 6273-6275.
- [11] Wang X, Li W, Zhang F, et al. Fish oil-supplemented parenteral nutrition in severe acute pancreatitis patients and effects on immune function and infectious risk: a randomized controlled trial[J]. Inflammation, 2009, 32(5): 304-309.
- [12] Xiong J, Zhu S, Zhou Y, et al. Regulation of omega-3 fish oil emulsion on the SIRS during the initial stage of severe acute pancreatitis[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(1): 35-38.
- [13] 张克君, 宋彩霞, 焦学龙, 等. NF- κ B 和 PUMA 与重症胰腺炎致急性肺损伤的关系以及 PDTC 的干预作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 19(9): 921-926.
- [14] 何满西, 张肇达, 刘续宝, 等. 重症胰腺炎病死原因分析: 附 144 例[J]. 中华肝胆外科杂志, 2010, 16(6): 404-406.
- [15] 王春友. 重症急性胰腺炎外科干预的时机与方式[J]. 中华消化外科杂志, 2012, 11(4): 309-311.

(收稿日期: 2012-10-18 修回日期: 2012-12-21)

(上接第 1091 页)

- [13] Vervoort N, Daemen D, Torok G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography[J]. J Chromatography A, 2008, 1189(1/2): 92-100.
- [14] Novakova L, Lopez SA, Solichova D, et al. Comparison of UV and charged aerosol detection approach in pharmaceutical analysis of statins[J]. Talanta, 2009, 78(3): 834-

839.

- [15] Beilmann B, Langguth P, Hausler H, et al. High-performance liquid chromatography of lactose with evaporative light scattering detection, applied to determine fine particle dose of carrier in dry powder inhalation products[J]. J Chromatogr A, 2006, 1107(1/2): 204-207.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-12-22)