

以离子液体为流动相添加剂的HPLC法分离并测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量[△]

张媛媛*,曾慧婷,陈超,何小群,胡燕珍,陈乐,虞金宝[#](江西省中医药研究院中药所,南昌 330046)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2952-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.15

摘要 目的:建立测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱含量的方法。方法:以离子液体1-丁基-3-甲基咪唑氯化盐(C_4mimCl)为流动相添加剂,与无添加剂的流动相以及加入传统添加剂三乙胺(对色谱柱有损伤)后对高效液相色谱(HPLC)法分离钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的分离度进行比较,筛选 C_4mimCl 的最佳浓度,用新建的方法测定江西4个产地钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量。色谱柱为Dikmatech Diamonsil Plus C_{18} ,流动相为乙腈-缓冲液(0.1%磷酸+3.0 mmol/L C_4mimCl),梯度洗脱,紫外检测波长为245 nm,流速为1 mL/min,进样量为10 μ L。结果:当流动相中无添加剂时、加入3.0 mmol/L三乙胺或3.0 mmol/L C_4mimCl 作添加剂时,钩藤碱与前峰分离度分别为1.02、1.23、1.72,与后峰分离度分别为1.06、6.00、4.25,对称因子分别为0.81、0.86、1.13;异钩藤碱与前峰分离度分别为0.96、3.89、4.05,与后峰分离度分别为1.02、2.34、2.36,对称因子分别为0.88、0.81、0.96。钩藤碱、异钩藤碱检测质量浓度线性范围分别为4.93~157.76($r=0.999\ 9$)、4.98~159.50 μ g/mL($r=1.000\ 0$),定量限分别为0.486 4、0.793 6 μ g/mL,精密性、重复性、稳定性和耐用性试验中的RSD均小于5%($n=6$),回收率分别为102.9%~107.8%(RSD=1.7%, $n=6$)、95.4%~106.3%(RSD=3.9%, $n=6$)。4个产地钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量范围分别为0.758~1.343、1.511~1.823 mg/g。结论: C_4mimCl 加入到流动相中能提高分离度,且以此建立的HPLC法快速、准确、重复性好,可用于钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量测定。

关键词 离子液体;1-丁基-3-甲基咪唑氯化盐;流动相;添加剂;高效液相色谱法;钩藤碱;异钩藤碱;含量测定

Separation and Determination of Rhynchophylline and Isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla* by HPLC with Ionic Liquid as Mobile Phase Additives

ZHANG Yuanyuan, ZENG Huiting, CHEN Chao, HE Xiaqun, HU Yanzhen, CHEN Le, YU Jinbao (Institute of TCM Research, Jiangxi Academy of TCM Research, Nanchang 330046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method to determine the contents of rhynchophylline and isorhynchophylline in *Uncaria rhynchophylla*. METHODS: The separation degree of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (C_4mimCl) as mobile phase additive was compared with that of mobile phase without additives and with traditional additive triethylamine (which damaged the chromatographic column). The optimum concentration of C_4mimCl was screened and the contents of rhynchophylline and isorhynchophylline in *U. rhynchophylla* from 4 habitats in Jiangxi province were determined by the newly established method. The determination was performed on Dikmatech Diamonsil Plus C_{18} column, the mobile phase was acetonitrile-buffer (0.1% phosphoric acid+3.0 mmol/L C_4mimCl), gradient elution. UV detection wavelength was set at 245 nm and the flow rate was 1 mL/min. Sample size was 10 μ L. RESULTS: When mobile phase had no additives or 3.0 mmol/L triethylamine and 3.0 mmol/L C_4mimCl were added as additives, the separation of rhynchophylline from the front peak was 1.02, 1.23 and 1.72, and the separation from the back peak was 1.06, 6.00 and 4.25, respectively. The symmetry factors were 0.81, 0.86 and 1.13, respectively. The separation of isorhynchophylline from the front peak was 0.96, 3.89 and 4.05, and the separation from the back peak was 1.02, 2.34 and 2.36, respectively. The symmetry factors were 0.88, 0.81 and 0.96, respectively. The linear range of rhynchophylline and isorhynchophylline were 4.93-157.76 ($r=0.999\ 9$) and 4.98-159.50 μ g/mL ($r=1.000$), respectively. The quantitative limits were 0.486 4, 0.793 6 μ g/mL, respectively. RSDs of precision, repeatability, stability and durability tests were all less than 5% ($n=6$). The recovery rates were 102.9%-107.8% (RSD=1.7%, $n=6$) and 95.4%-106.3% (RSD=3.9%, $n=6$), respectively. The content of rhynchophylline and isorhynchophylline in *U. rhynchophylla* from 4 habitats were 0.758-1.343 and 1.511-1.823 mg/g, respectively. CONCLUSIONS:

[△] 基金项目:江西省卫生和计划生育委员会中医药科研课题(No.2017A320);2017年中医药局公共卫生服务补助资金“全国中药资源普查项目”(No.财社[2017]66号);江西省自然科学基金资助项目(No.20161BAB205222)

* 研究实习生。研究方向:中药分析。电话:0791-88501404。E-mail:1261115822@qq.com

[#] 通信作者:研究员。研究方向:中药分析和中药资源。电话:0791-88501404。E-mail:543349695@qq.com

Addition of C_4mimCl into mobile phase can enhance its separation. Established HPLC method is rapid, accurate and reproducible, which can be used for content determination of rhynchophylline and isorhynchophylline in *U. rhynchophylla*.

KEYWORDS Ionic liquid; 1-butyl-3-methylimidazolium chloride; Mobile phase; Additive; HPLC; Rhynchophylline; Isorhynchophylline; Content determination

中药钩藤为茜草科植物钩藤 [*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. exHavil.]、大叶钩藤 (*Uncaria macrophylla* Wall.)、毛钩藤 (*Uncaria hirsuta* Havil.)、华钩藤 [*Uncaria sinensis* (Oliv.) Havil.] 或无柄果钩藤 (*Uncaria sessilifructus* Roxb.) 的干燥带钩茎枝, 多于秋、冬二季采收, 去叶, 切段, 晒干^[1]。钩藤, 原名“钓藤”, 始载于《名医别录》^[2], 主要用于肝风内动、惊痫抽搐、高热惊厥、感冒夹惊、小儿惊啼、妊娠子痫、头痛眩晕^[1]。其主要化学成分有生物碱、三萜、木脂素、黄酮等成分^[3-4], 尤以生物碱在钩藤中含量较多^[5-7], 其中钩藤碱 (Rhynchophylline) 含量占总碱的 28%~50%, 异钩藤碱 (Isorhynchophylline) 含量约占总碱的 15%, 二者具有显著的降压、镇静、安眠、解痉等作用^[8-10], 因此, 笔者选择以钩藤碱和异钩藤碱作为钩藤质量评价指标能较有效地控制其药材质量。

目前, 在分析并测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量时, 主要采用高效液相色谱 (HPLC) 法和超高效液相色谱 (UPLC) 法^[11-12], 但由于二者结构中碱性氮原子与固定相中未键合的酸性硅醇基易发生相互作用, 使得该方法存在色谱峰的展宽拖尾、漂移、对称性和重现性差、分离效能低、分析时间长等缺点^[13]。为了解决这些问题, 一般会在流动相中加入三乙胺或醋酸铵等添加剂^[11-12], 虽然峰形可以得到一定的改善, 但可致色谱柱不可逆转的损害^[14]。离子液体 (Ionic liquids, ILs) 是近年来发展起来的一种由有机阳离子和无机阴离子组成的一种绿色溶剂, 已被广泛应用于现代医药化工领域^[15]。已有报道^[16], 当离子液体作为钩藤中钩藤碱和异钩藤碱液相色谱分离的流动相添加剂时, 能显著提高二者的分离效果、缩短分析时间、抑制碱性分析物的拖尾, 且对色谱柱损伤也更小。本试验以咪唑类离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯化盐 (C₄mimCl) 为流动相添加剂, 筛选其最优浓度, 采用 HPLC 法测定江西省不同产地钩藤药材中钩藤碱和异钩藤碱的含量, 为更快、更准确地控制钩藤药材及其制剂的质量提供依据。

钩藤碱和异钩藤碱的化学结构式见图 1。

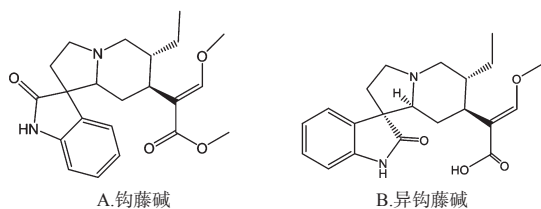


图 1 钩藤碱和异钩藤碱的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of rhynchophylline and isorhynchophylline

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 HPLC 仪 (美国 Agilent 公司); Shimadzu LC-20AT HPLC 仪 (日本岛津公司); Waters e26953 HPLC 仪 (美国 Waters 公司); Dikmatech Diamonsil Plus

C₁₈ (美国 Dikma Technologies 公司, 250 mm×4.6 mm, 5 μm, 柱号: 2509215,); Hypersil ODS C₁₈ (大连依利特分析仪器有限公司, 柱号: 2912645, 250 mm×4.6 mm, 5 μm); Agilent HC-C₁₈ (美国 Agilent Technologies 公司, 柱号: 538639, 250 mm×4.6 mm, 5 μm); MS105DU 十万分之一天平 (瑞士 Mettler toledo 公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); PHS-25 PH 计 (上海霄盛仪器制造有限公司); FY-1H 旋片式真空泵 (浙江飞越机电有限公司); 103B 200 g 高速中药粉碎机 (浙江省瑞安市永历制药机械有限公司)。

1.2 药品与试剂

试验用药材采收于江西省的安义、资溪、黎川、宁都 4 个县, 每个县各采了 2 批, 安义县批号: 181205、181206, 资溪县批号: 181208、181209, 黎川县批号: 181211、181212, 宁都县批号: 181214、181215, 上述各药材均为野生, 采收时间为 2018 年 12 月, 经江西省中医药研究院虞金宝研究员鉴定为钩藤; 钩藤碱对照品 (批号: B20453, 纯度: ≥98%)、异钩藤碱对照品 (批号: B21526, 纯度: ≥98%)、C₄mimCl (批号: S50839, 纯度: ≥97%), 均购于上海源叶生物科技有限公司; 乙腈和甲醇均为色谱纯, 磷酸、三乙胺、氢氧化钠、乙醇均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Dikmatech Diamonsil Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-缓冲液 (0.1% 磷酸+3.0 mmol/L C₄mimCl 或 3.0 mol/L 三乙胺) (B), pH 约为 2.3; 检测波长: 245 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 梯度洗脱 (0~15 min, 8%→35% A; 15~17 min, 35%→43% A; 17~19 min, 43%→44% A; 19~30 min, 44%→90%)。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取钩藤碱 12.16 mg 和异钩藤碱 9.92 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并定容, 摇匀, 得钩藤碱对照品贮备液和异钩藤碱对照品贮备液。再精密吸取钩藤碱对照品贮备液 1 mL 和异钩藤碱对照品贮备液 2 mL 置于 100 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 分别含钩藤碱 12.16 μg、异钩藤碱 19.84 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

分别取过 3 号筛的钩藤粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 50 mL, 称定质量, 室温浸泡 1 h; 然后超声提取 30 min (功率: 250 W, 频率: 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得供试品溶液。

2.4 流动相添加剂的选择

2.4.1 离子液体 C₄mimCl 与三乙胺的比较 按照“2.1”

项下色谱条件,取批号为181206的安义县钩藤供试品溶液进样,比较不含添加剂的流动相以及在流动相中添加剂分别为三乙胺(3.0 mmol/L)和 C_4mimCl (3.0 mmol/L)时的分离效果,如图2所示。

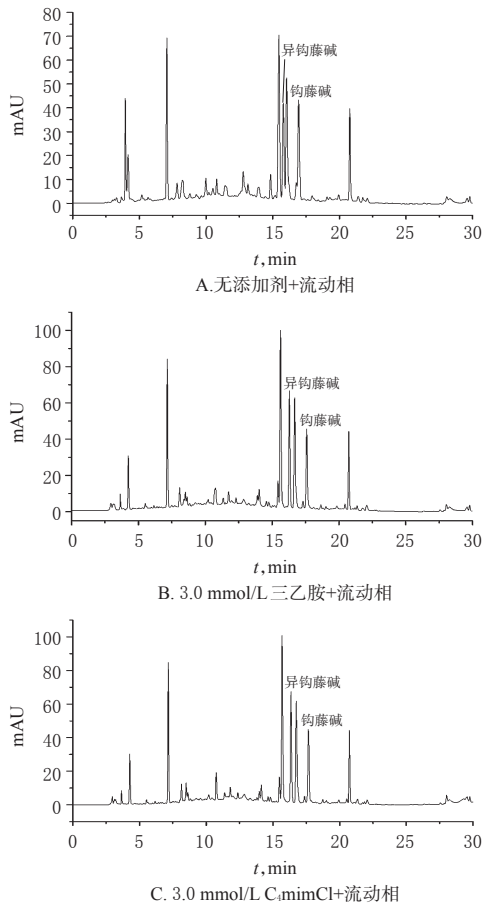


图2 不同流动相组成下钩藤供试品溶液的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of *U. rhynchophylla* sample under different mobile phase

经计算后可知,当流动相中无添加剂时以及加入3.0 mmol/L 三乙胺、3.0 mmol/L C_4mimCl 作添加剂时,钩藤碱与前峰分离度分别为1.02、1.23、1.72,与后峰分离度分别为1.06、6.00、4.25,对称因子分别为0.81、0.86、1.13;异钩藤碱与前峰分离度分别为0.96、3.89、4.05,与后峰分离度分别为1.02、2.34、2.36,对称因子分别为0.88、0.81、0.96。即当向流动相中加入添加剂时,能明显改善钩藤碱和异钩藤碱与其前后峰的分离效果,可以抑制拖尾峰的产生。其中,加入 C_4mimCl 效果明显优于三乙胺,且对色谱柱损伤更小,因此,本试验以 C_4mimCl 作为流动相添加剂。

2.4.2 不同 C_4mimCl 浓度下的分离效果及作用机制考察 取安义县钩藤粉末(批号:181206),按“2.3”项下方法制备供试品溶液;另制备5种含不同浓度 C_4mimCl 的缓冲液(0.1%磷酸+n mmol/L C_4mimCl)作流动相,其中n依次为0、1.0、3.0、6.0、9.0,在其他色谱条件不变,只改

变缓冲液中 C_4mimCl 浓度的情况下,考察钩藤碱和异钩藤碱的分离效果。首先制备一定浓度的 $NaNO_2$ 溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定, $NaNO_2$ 出峰时间为2.966 min,设定其为死时间(t_0)。以保留因子 $[k'$,其中 $k' = (t_R - t_0)/t_0$,其中 t_R 为分析物保留时间]的对数(lgk')为纵坐标,以 C_4mimCl 浓度(α_D)的对数($lg\alpha_D$)为横坐标绘制标准曲线,得到 $lgk' \sim lg\alpha_D$ 的回归方程,见图3A;以峰的对称因子(f_s)为纵坐标,以 C_4mimCl 浓度(α_D)为横坐标绘制曲线,见图3B。

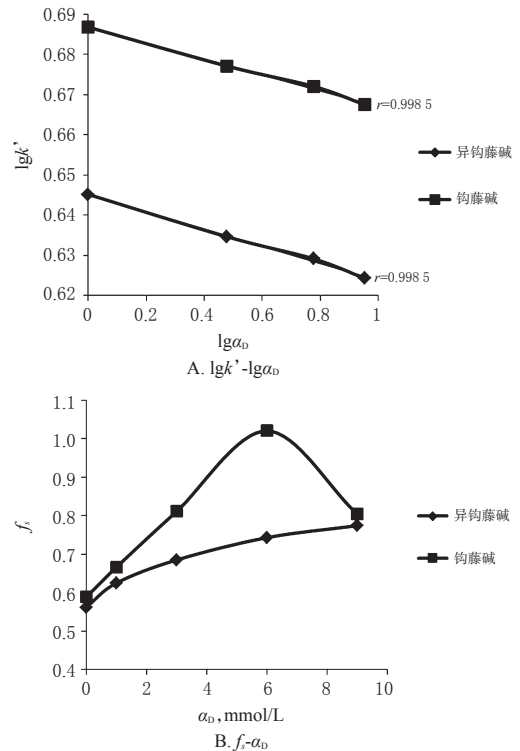


图3 $lgk' - lg\alpha_D$ 与 $f_s - \alpha_D$ 结果

Fig 3 The result of $lgk' - lg\alpha_D$ and $f_s - \alpha_D$

结果表明, C_4mimCl 的浓度对分析物的保留时间和峰形有显著影响,随着 C_4mimCl 浓度的增加, lgk' 降低,即保留时间呈减小趋势(见图3A);且 f_s 增加,即钩藤碱和异钩藤碱的色谱峰拖尾被有效地抑制(见图3B)。此外,在试验中发现,当 C_4mimCl 浓度大于3.0 mmol/L时,分析物保留时间缩短,导致目标峰与相邻峰分离度减小而影响试验结果;当 C_4mimCl 浓度大于3.0 mmol/L时,由于其浓度越大越容易产生噪音,对基线的干扰越严重,其黏度也不断增加,导致系统平衡时间延长,因此最终本试验选择 C_4mimCl 浓度为3.0 mmol/L。

根据溶质计量置换保留模型(SDM-R)^[17],考察了 C_4mimCl 的 $lg\alpha_D$ 与 lgk' 的关系,以探讨离子液体作用机制。其中SDM-R的简化数学表达式为: $lgk' = lgI - Zlg\alpha_D$,式中 lgI 和 Z 为常数。根据图3的数据,结果表明, lgk' 与 $lg\alpha_D$ 的线性关系良好,钩藤碱和异钩藤碱的 $lg\alpha_D$ 与 lgk' 之间均呈线性关系,相关系数(r)均为0.9985, f_s 也随浓度增加而增加(见图3B)。由此可知, C_4mimCl

浓度与容量因子的变化符合溶质计量置换保留模型(SDM-R),且保留过程以竞争吸附为主。

2.5 方法学考察

2.5.1 系统适用性试验 取安义县钩藤药材粉末样品(批号:181206)1份,按“2.3”项下方法制备成供试品溶液;取“2.2”项下混合对照品溶液及空白溶液(60%甲醇)。将3种溶液按“2.1”项下色谱条件(流动相中加入3.0 mmol/L C_{18} 咪唑)进样,记录色谱图。结果,混合对照品溶液与供试品溶液中钩藤碱和异钩藤碱与各自前后峰均达到基线分离,分离度均大于1.5,理论板数以异钩藤碱计不低于50 000,保留时间为16.35 min。色谱图见图4。

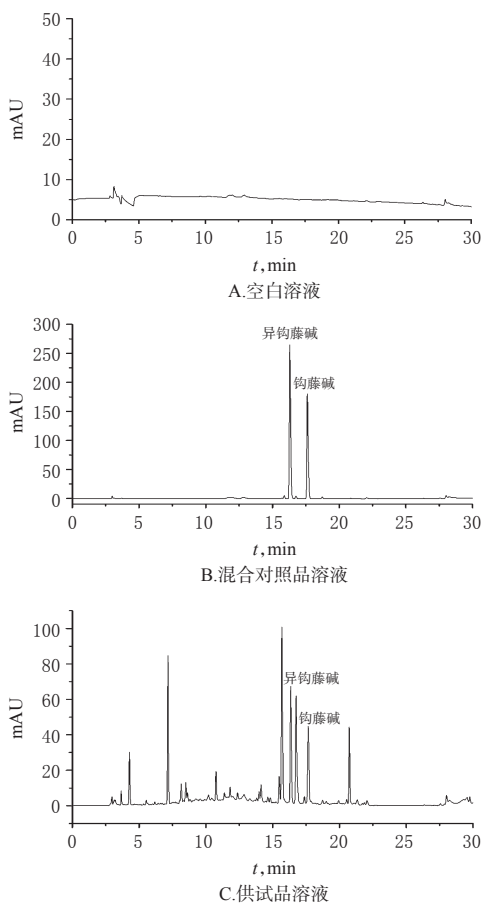


图4 3种溶液的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of 3 kinds of solution

2.5.2 线性关系考察 精密称取钩藤碱对照品9.86 mg和异钩藤碱对照品9.97 mg,置于同一25 mL量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度得混合对照品母液;再逐步稀释成6份,得钩藤碱质量浓度分别为157.76、78.88、39.44、19.72、9.86、4.93 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,以及异钩藤碱质量浓度分别为159.50、79.76、39.88、19.44、9.97、4.98 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。各取10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标(y),以对照品质量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得钩藤碱和异钩藤碱回归方程分别为 $y=2.603 \times 10^4 x - 31.562$ ($r=0.999 \ 9$)、 $y=2.643 \times 10^4 x +$

6.862 ($r=1.000 \ 0$),钩藤碱和异钩藤碱的检测质量浓度线性范围分别为4.93~157.76、4.98~159.50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.3 定量限与检测限考察 精密量取“2.2”项下钩藤碱对照品贮备液适量和异钩藤碱对照品贮备液适量,分别倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进行测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限和检测限。结果,钩藤碱和异钩藤碱定量限分别为0.486 4、0.793 6 $\mu\text{g/mL}$,检测限分别为0.147 4、0.240 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.4 精密度试验 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液10 μL ,注入液相色谱仪,连续进样6次,记录色谱峰峰面积,结果钩藤碱和异钩藤碱峰面积的RSD均为1.3% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5.5 重复性试验 取安义县钩藤样品(批号:181206)粉末6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,测定其含量,结果钩藤碱和异钩藤碱含量的RSD分别为2.7%和3.1% ($n=6$)。结果表明,本法重复性良好。

2.5.6 稳定性考察 取“2.3”项下安义县钩藤样品(批号:181206)供试品溶液1份,分别于0、1、2、4、8、12 h时进样10 μL 测定,结果钩藤碱和异钩藤碱峰面积的RSD分别为1.3%和1.8% ($n=6$),结果表明,供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.5.7 耐用性试验 (1)流动相中pH值变化的考察。取安义县钩藤样品粉末(批号:181206),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,流动相缓冲液的pH分别调整为1.8、2.3、2.8。在其他色谱条件不变,只改变流动相pH值的情况下,分别测定供试品中有效成分含量。结果,钩藤碱和异钩藤碱含量的RSD分别为4.8%和2.9% ($n=3$)。表明在本试验条件下,流动相pH值的变化对测定结果影响不大。(2)不同色谱柱的考察。取安义县钩藤样品粉末(批号:181206),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,色谱柱分别为Dikmatech Diamonsil Plus C_{18} 、Hypersil ODS C_{18} 、Agilent HC- C_{18} ,在流动相及其他色谱条件不变,只改变色谱柱的情况下,分别测定供试品中有效成分含量。结果,钩藤碱和异钩藤碱含量的RSD分别为4.3%和3.1% ($n=3$),表明在本试验条件下,不同色谱柱对测定结果影响较小。(3)不同品牌高效液相色谱仪的考察。取安义县钩藤样品粉末(批号:181206),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别采用Agilent1260、Shimadzu LC-20AT、Waters e26953 HPLC仪对供试品中有效成分进行含量测定,其他色谱条件不变。结果,钩藤碱和异钩藤碱含量的RSD分别为3.7%和2.6% ($n=3$)。表明在本试验条件下,不同品牌的HPLC仪对测定结果影响较小。

2.5.8 加样回收率试验 取安义县钩藤样品粉末(批号:181206)6份,每份各约0.25 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,分别精密加入0.315 5 mg/mL的钩藤碱和0.398 8 mg/mL的异钩藤碱各1.0 mL,按“2.3”项下方法

制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery tests

成分	样品质量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
钩藤碱	0.251 1	0.313 9	0.315 5	0.647 9	105.9	106.24	1.7
	0.259 5	0.324 4	0.315 5	0.664 5	107.8		
	0.257 3	0.321 6	0.315 5	0.660 5	107.4		
	0.259 6	0.324 5	0.315 5	0.664 4	107.7		
	0.250 9	0.313 6	0.315 5	0.638 2	102.9		
异钩藤碱	0.250 7	0.313 4	0.315 5	0.647 1	105.8		
	0.251 1	0.413 3	0.398 8	0.828 6	104.1	102.89	3.9
	0.259 5	0.427 1	0.398 8	0.850 7	106.2		
	0.257 3	0.423 5	0.398 8	0.847 4	106.3		
	0.259 6	0.427 3	0.398 8	0.845 3	104.8		
0.250 9	0.413 0	0.398 8	0.793 4	95.4			
0.250 7	0.412 7	0.398 8	0.813 5	100.5			

2.6 钩藤中异钩藤碱与钩藤碱的含量测定

取4个不同产地的钩藤样品粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件(流动相中加入3.0 mmol/L C₄mimCl)测定4种不同产地钩藤中钩藤碱与异钩藤碱的含量,结果见表2。

表2 不同产地钩藤中钩藤碱和异钩藤碱含量(mg/g)

Tab 2 Contents of rhynchophylline and isorhynchophylline in *U. rhynchophylla* from different habitats(mg/g)

样品	钩藤碱	异钩藤碱	二者总和
安义1	1.343	1.823	3.166
安义2	1.250	1.646	2.896
黎川1	0.832	1.751	2.583
黎川2	0.758	1.511	2.269
资溪1	0.833	1.613	2.446
资溪2	0.839	1.647	2.486
宁都1	0.964	1.606	2.570
宁都2	0.959	1.645	2.604

3 讨论

3.1 检测波长

通过光谱全波长扫描发现,钩藤碱和异钩藤碱在检测波长为245 nm波长处均有最大吸收,因此将检测波长定为245 nm。

3.2 有机相的选择

分别考察相同有机相比例下甲醇和乙腈对2种成分分离效果的影响。结果发现,与乙腈为有机相比较,用甲醇时钩藤碱和异钩藤碱出峰时间延后近7 min,且峰形较差,因此本试验选用乙腈为有机相。

3.3 含量测定结果分析

本试验采用离子液体C₄mimCl做流动相添加剂测定了江西不同产地的野生钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量,由表2可知,江西不同产地野生钩藤中均含有钩藤碱和异钩藤碱,但各产地样品中钩藤碱和异钩藤碱的含量差异均较大,来自赣北地区(安义县)的钩藤碱和异钩藤碱含量相对较高,笔者推测气候环境、土壤性质对野

生钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量有一定影响。后期,笔者将收集江西更多产地的野生钩藤、栽培钩藤、野生抚育钩藤对其有效成分含量进行测定,为江西钩藤药材合理布局与生产管理提供依据。

3.4 离子液体在HPLC中的应用

离子液体的分离作用机制可能与其可以抑制固定相中未封闭的硅烷醇有关,并且其抑制能力大大强于传统的三乙胺、醋酸铵等添加剂^[13]。近年来,将离子液体作为流动相添加剂用于反相液相色谱的研究日益增加,并取得了一定成果^[18-19],目前以咪唑类离子液体的应用最广泛^[20],如有采用离子液体1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([HMIM][BF₄])为流动相添加剂的HPLC法^[19],但该研究由于仅限于方法学考察方面的研究,未对离子液体作用机制和分离效能进行探讨,亦未将该方法应用于含量测定,而本研究则在方法学考察的基础上还进行了离子液体作用机制的探究与含量测定的应用,可为相关研究提供更有价值的参考。

在本研究中,离子液体作为流动相添加剂时,能够减小钩藤碱和异钩藤碱等碱性化合物的拖尾,缩短分析时间,改善分离效果,主要是因为离子液体可作为质子受体抑制游离硅醇基效应,且离子液体对硅醇基的抑制能力远远大于常用的烷基胺类添加剂^[5],而与常用流动相添加剂比,离子液体更安全、使目标物分离度更高、对色谱柱损伤也更低^[18]。

本文以C₄mimCl为流动相添加剂,建立了钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的分离分析方法,考察了离子液体浓度等因素的影响,并与传统的流动相添加剂进行了比较,初步探讨了离子液体作用机制和分离效能,确定了最佳色谱条件,为快速、准确地控制钩藤药材及其制剂的质量提供了依据,为钩藤质量标准的提高奠定了基础,所得不同产地指标成分的含量结果可为江西钩藤药材合理布局提供思路。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:257.
- [2] 汉·陶弘景集.名医别录[M].尚志钧,辑校.北京:人民卫生出版社,1986:267.
- [3] NDAGIJIMANA A, WANG X, PAN G, et al. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies[J]. *Fitoterapia*, 2013.DOI: 10.1016/j.fitote.2013.01.018.
- [4] ZHANG Q, ZHAO J J, XU J, et al. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015.DOI: 10.1016/j.jep.2015.06.011.
- [5] 刘碧崇,王强.钩藤活性成分研究进展[J].成都大学学报:自然科学版,2018,37(3):269-272.
- [6] 高晓宇,丁茹,王道平,等.钩藤化学成分及药理作用研究进展[J].天津医科大学学报,2017,23(4):380-382.

HPLC法同时测定藿香正气口服液中9种成分的含量^Δ

陈金凤^{1*},郭大乐^{1,2},董自亮²,禹奇男²,彭涛²,李张宇²,余佳文³,卢庆³,姚辰³,邓赞¹,秦少容^{2,3#}(1.成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室/四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室省部共建国家重点实验培育基地,成都 611137;2.太极医药研究院,重庆 401147;3.太极集团有限公司,重庆 408000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2957-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.16

摘要 目的:建立同时测定藿香正气口服液中9种成分含量的方法,提高并完善藿香正气口服液质量标准。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法测定10批藿香正气口服液中甘草香豆素、异甘草素、芹糖甘草苷、柚皮芸香苷、甘草苷、川皮苷、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚9种成分的含量。色谱柱为Kromasil EternityXT-5-C₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,检测波长为220 nm,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果:甘草香豆素、异甘草素、芹糖甘草苷、柚皮芸香苷、甘草苷、川皮苷、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚检测质量浓度线性范围分别为0.000 5~0.007 5、0.000 8~0.025 0、0.006 1~0.976 0、0.001 6~0.250 0、0.007 8~0.025 0、0.000 4~0.062 7、0.008 6~0.276 0、0.010 0~0.500 0、0.010 0~0.500 0 mg/mL($r=0.999 2\sim 1.000 0$);检测限分别为0.001 3、0.000 1、0.004 7、0.005 0、0.012 0、0.001 3、0.007 8、0.007 0、0.005 8 μg/mL,定量限分别为0.013 0、0.000 8、0.047 0、0.050 0、0.120 0、0.013 0、0.078 0、0.070 0、0.058 0 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3.0%($n=6$);平均回收率分别为98.67%、101.85%、98.97%、103.05%、100.00%、97.78%、97.91%、100.13%、101.95%,RSD为1.14%、2.18%、0.40%、0.17%、1.38%、0.85%、1.38%、0.10%、1.35%($n=6$)。结论:建立的含量测定方法结果准确、可靠,可为藿香正气口服液整体质量控制评价体系的建立及质量标准的提高提供依据。

关键词 藿香正气口服液;HPLC;甘草香豆素;异甘草素;芹糖甘草苷;柚皮芸香苷;甘草苷;川皮苷;橙皮苷;厚朴酚;和厚朴酚;含量测定

- [7] 崔莹.钩藤化学成分和药理活性研究进展[J].西安文理学院学报:自然科学版,2015,18(4):16-18.
- [8] 段凯旋,罗文浩,罗琼,等.基于BATMAN-TCM在线分析平台研究钩藤药理机制[J].井冈山大学学报:自然科学版,2019,40(2):91-96.
- [9] 汪江涛,丁伯平.钩藤碱和异钩藤碱药理作用研究进展[J].中国医药导刊,2012,14(7):1224-1225.
- [10] 万伟忠,朱育凤,胡莹,等.我院2010-2014年平肝息风类中药饮片应用分析[J].中国药房,2016,27(11):1460-1462.
- [11] 钟鸣,刘伟锐,杨占东,等.高效液相色谱梯度洗脱法测定八宝惊风散中钩藤碱、异钩藤碱、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J].中国药物经济学,2017,12(8):38-42.
- [12] 邓岳,刘阿娜,王小明,等.UPLC法同时测定钩藤提取物中4种生物碱类成分的含量[J].中药材,2016,39(4):819-821.
- [13] 罗旭彪.生物碱的分离分析及其液相色谱保留机理的研究[D].长沙:湖南大学,2006.
- [14] 王新.高效液相色谱柱的保护[J].安庆师范学院学报:自然科学版,2001,7(4):71-72.
- [15] 闫华,张红梅,张丽静,等.离子液体研究进展[J].山东化工,2016,45(23):55-57.
- [16] BIAN M, ZHANG Z, YIN H. Effects and mechanism characterization of ionic liquids as mobile phase additives for the separation of matrine-type alkaloids by liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 58(1): 163-167.
- [17] 边敏,杨勇,周世界.咪唑类离子液体作流动相添加剂对苦参类生物碱保留行为的表征[J].南京中医药大学学报,2012,28(1):30-33.
- [18] 崔歌,于泓,张亚楠.以吡啶离子液体作为流动相添加剂的液相色谱法分析三氟乙酸根与三氟甲磺酸根[J].分析测试学报,2018,37(8):925-929.
- [19] 田玲,姚成,边敏.以离子液体为流动相添加剂的高效液相色谱法测定钩藤药材中钩藤碱和异钩藤碱[J].理化检验:化学分册,2018,54(2):138-141.
- [20] 李颖萍,程正军.两种咪唑离子液体的合成研究[J].广东化工,2018,45(16):3-4.

Δ 基金项目:四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项计划项目(No.2016TD0006)

* 硕士研究生。研究方向:中药化学成分与质量标准。E-mail: 908882457@qq.com

通信作者:总工程师。研究方向:中药制剂及新剂型开发。E-mail: srqin@163.com

(收稿日期:2019-06-21 修回日期:2019-07-26)

(编辑:刘萍)