

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00193

## 反相离子对色谱法测定青风藤中青藤碱的含量

王慧, 叶卿, 赵亮, 田文君, 张国庆\*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 建立离子对色谱法测定青风藤中青藤碱的含量。**方法** 使用 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 乙腈:磷酸盐缓冲液(0.03 mol/L 磷酸二氢钾和 0.03 mol/L 庚烷磺酸钠, 磷酸调节 pH 值至 4.0)=18:82 为流动相, 流速 1.0 ml/min, 柱温 40℃, 检测波长 262 nm。**结果** 青藤碱在 0.025~0.5 mg/ml ( $r=1.000$ ) 范围内呈良好的线性关系。最低检测限为 2.5 μg/ml, 低、中、高 3 个浓度的日内精密度 RSD 分别为 0.62%、0.35%、0.60%, 日间精密度 RSD 为 1.54%、0.70%、0.45%。平均回收率 99.9% (RSD=2.9%,  $n=6$ ), 均符合分析要求。**结论** 该方法简单快捷, 结果准确, 适用于测定青风藤中青藤碱的含量。

**[关键词]** 青风藤; 青藤碱; 反相离子对色谱法; 含量测定

**[中图分类号]** R 927.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0193-03

### Reversed-phase ion-pair chromatography in determination of sinomenine contents in *Sinomenium acutum*

WANG Hui, YE Qing, ZHAO Liang, TIAN Wen-jun, ZHANG Guo-qing\*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a reversed-phase ion-pair chromatography (RP-IPC) method for determination of sinomenine content in *Sinomenium acutum*. **Methods** The IPC method was established using a column of Eclipse Plus C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile and buffer phosphate (0.03 mol/L potassium dihydrogen phosphate and 0.03 mol/L sodium heptane sulfonic acid, adjusted to pH 4.0 by phosphoric acid) 18:82. The flow rate was 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 262 nm, and the temperature was at 40℃. **Results** The linearity was obtained over a concentration range of 0.025-0.5 mg/ml ( $r=1.000$ ). The low limit of detection was 2.5 μg/ml. The intra-day precisions of low, medium, and high concentrations of sinomenine were 1.54%, 0.70%, and 0.45%, and the inter-day precisions were 1.54%, 0.70%, and 0.45%, respectively. The average recovery was 99.9% (RSD=2.9%,  $n=6$ ), which met the requirement for analysis. **Conclusion** The present method is simple, fast, and accurate; it is suitable for determination of sinomenine content in *Sinomenium acutum*.

**[Key words]** *Sinomenium acutum*; sinomenine; reversed phase ion pair chromatography; determination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):193-195]

青风藤为防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 及毛青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. var. cinereum Rehd. et Wils. 的干燥藤茎。青风藤有祛风湿、通经络、利小便之功效, 用于治疗风湿痹痛、关节肿胀、麻痹瘙痒等症<sup>[1]</sup>。青风藤的成分为青藤碱、胡萝卜苷等<sup>[2]</sup>。青藤碱的含量测定方法有薄层扫描法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4]</sup>、一阶导数光谱法<sup>[5]</sup>, 其中 HPLC 法因其高效、快速、灵敏等优点, 适合于分析成分复杂的复方制剂。2005 版《中国药典》一部<sup>[1]</sup> 采用的

色谱条件中流动相的配制过程繁琐, 经重复后发现色谱峰的拖尾严重, 不利于含量的测定。本法采用离子对色谱法, 以乙腈与磷酸盐缓冲液系统测定青藤碱含量, 其方法简单、色谱峰峰形好, 结果准确, 重现性好, 可作为该制剂质量控制的有效方法。

### 1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 包括低压四元梯度泵; 在线脱气机; 自动进样器; 柱温箱; ChemStation 色谱工作站。上海淀久 DJ-04 药材

**[收稿日期]** 2009-10-12 **[接受日期]** 2010-01-04

**[作者简介]** 王慧, 药师, E-mail: wang\_h2007@sina.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing\_zhang91@126.com

粉碎机;METTLER AE240 电子天平;BRANSON SB3200-T 型超声仪。

1.2 药品和试剂 青藤碱对照品(购于上海诗丹德生物技术有限公司,纯度大于98%);青风藤2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 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎。乙腈为色谱纯(B&J ACS/HPLC);磷酸二氢钾为分析纯(上海三浦化工有限公司);庚烷磺酸钠为分析纯(东京化成工业株式会社);磷酸为分析纯(上海试剂四厂昆山分厂),无水乙醇为分析纯(上海强顺化工有限公司),水为纯净水。

## 2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈:磷酸盐缓冲液(0.03 mol/L 磷酸二氢钾和 0.03 mol/L 庚烷磺酸钠,磷酸调节 pH 至 4.0)=18:82;柱温 40℃,检测波长为 262 nm;流速:1.0 ml/min;进样量 5 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取青藤碱对照品 50 mg,置于 50 ml 容量瓶中,加 70%乙醇至刻度,作为对照品储备溶液,置 4℃冰箱保存。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密称取青风藤药材 0.15 g,加 20 ml 70%乙醇,按 2005 版《中国药典》一部“含量测定项下”供试品溶液的配制描述操作,得供试品溶液,置 4℃冰箱保存备用。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性实验 在 2.1 项的色谱条件下,以对照品溶液和样品溶液分别进样,根据色谱参数计算系统适应性。样品溶液的色谱图中青藤碱的保留时间是 22.039 min,拖尾因子为 1.005,理论塔板数大于 13 000,与旁边的杂质峰分离度大于 3.5。空白、对照品和样品的色谱图见图 1。

2.3.2 标准曲线及线性 精密取对照品溶液 0.25、0.5、1、2.5、5 ml 置于 10 ml 容量瓶中,用 70%乙醇稀释至刻度,配成含青藤碱 0.025、0.05、0.1、0.25、0.5 mg/ml 的对照品溶液,分别进样,记录峰面积。以青藤碱浓度为  $x$  轴,峰面积为  $y$  轴,进行回归分析,得回归方程: $y=3\,998.1x+2.104\,7$ , $r=1.000$ 。表明青藤碱在 0.025~0.5 mg/ml 范围内线性良好。

2.3.3 精密度 在 2.1 项下色谱条件下,分别取 2.3.2 项下 0.025、0.1、0.5 mg/ml 低、中、高 3 个浓度对照品溶液在 1 d 内连续进样 5 次,以及连续 5 d,每天进样一次,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。结果,低、中、高 3 个浓度日内精密度 RSD 分别为 0.62%、0.35%、0.60%,低、中、高 3 个浓度日间精密度 RSD 分别为 1.54%、0.70%、0.45%,表明方法的精密度良好。

图 1 空白(A)、对照品(B)和青风藤样品(C)溶液的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank control (A), reference substance (B), and sample *Sinomenium acutum* (C)  
1: Sinomenine

2.3.4 稳定性 精密称取青风藤药材粉末 0.15 g,照 2.2.2 项下的方法制备样品溶液。分别在 0、2、4、6、8 h 测定青藤碱的峰面积,RSD 为 1.32% ( $n=5$ ),说明样品溶液在一个工作日内稳定性良好。

2.3.5 最低检测限和定量限 将青藤碱对照品溶液稀释进样,以信噪比 3:1 确定最低检测限为 2.5 μg/ml;以信噪比 10:1 确定定量限为 5 μg/ml。

2.3.6 回收率 精密称取青风藤粉末 0.15 g,精密量取 1 mg/ml 青藤碱标准溶液 2.5 ml,加入 70%乙醇溶液 17.5 ml,按 2.2.2 项下操作,得样品溶液,平行操作 6 份,得平均回收率为 99.9%,RSD 为 2.9% ( $n=6$ )。

2.4 样品测定 精密称取 2 个批号的青风藤药材粉末 0.15 g,分别按 2.2.2 项下方法制备溶液并测

定,每批药材平行操作3份,按标准曲线计算出样品的含量。批次1的含量是2.5%,批次2的含量是2.6%,符合药典规定的含量不低于0.5%。

### 3 讨 论

3.1 流动相的选择 药典采用的色谱条件是甲醇-磷酸盐缓冲液(0.005 mol/L 磷酸氢二钠溶液,以0.005 mol/L的磷酸二氢钠调节 pH 至 8.0,再以1%三乙胺调节 pH 至 9.0)(55:45)为流动相,操作过程繁琐,进样后所得的色谱图拖尾严重,影响测定值的准确性。改进流动相,参考其他生物碱的测定方法<sup>[6-8]</sup>,采用乙腈-磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钾和庚烷磺酸钠),用离子对色谱法分离测定青风藤中的青藤碱。

3.2 四因素三水平正交试验考察缓冲液浓度及 pH 值 考虑了 0.01、0.02、0.03 mol/L 的磷酸二氢钾和 0.01、0.02、0.03 mol/L 的庚烷磺酸钠,20、30、40℃的柱温以及 pH 3.0、4.0、4.5。结果发现,当缓冲液采用 0.03 mol/L 磷酸二氢钾和 0.03 mol/L 庚烷磺酸钠,用磷酸调节 pH 至 4.0,柱温是 40℃时,

所得色谱图的对称性最佳,拖尾因子在规定范围内,故本法采用此条件。

### [参 考 文 献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:135.
- [2] 班小红,黄筑艳,李 焱,周 岚,张吉明,杨小生,等. 青风藤化学成分的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19:1831-1832.
- [3] 王隶书,金向群,程东岩,孙亚东,严玉清. 薄层扫描法测定复方青藤片中青藤碱的含量[J]. 中成药,1996,16:10-11.
- [4] 周 昊,彭国平. HPLC 法测定复方青藤片中青藤碱的含量[J]. 中国中医急症,2006,15:1382-1383.
- [5] 马平勃,黄中伟. 透皮促进剂对青藤碱凝胶体外透皮吸收的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9:7-8.
- [6] 乐 辉. HPLC 法测定盐酸黄连素溶液中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药师,2009,12:541-542.
- [7] 夏 荃,李灿明. HPLC 测定黄柏生品与不同炮制品中 3 种生物碱的含量[J]. 中成药,2008,30:1018-1021.
- [8] 袁久荣,魏英勤,袁 浩,徐 娟,容 蓉. RP-HPLC 法同时测定黄连中四种原小檗碱型生物碱的含量[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2006,8:36-39.

[本文编辑] 尹 茶

## · 消 息 ·

### 《中国医科大学学报》征稿启事

《中国医科大学学报》为全国性医药卫生综合类学术期刊,中国综合性医药卫生类核心期刊,《中国科技论文统计与分析》、《中国科学引文索引》统计源期刊,国内外公开发行。本刊已进入美国化学文摘(CA)、美国生物学文摘(BA)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、美国《剑桥科学文摘:自然科学》(CSA;NS)、波兰哥白尼索引(IC)等国际重要检索系统;并被国内中文生物医学期刊目次数据库、中国科技期刊中医药文献索引、中文科技资料目录、中国生物医学文献光盘数据库、中国科学技术期刊文摘数据库、万方数据资源系统等多种权威数据库收录。

本刊为双月刊,A4开本,144页,主要刊载国内外广大医药卫生科研工作者在医疗、教学、科研领域的科技论文,设有:专家述评,专题报告,论著(基础医学、临床医学、药学、公共卫生学、检验医学、法医学、口腔医学、医学心理学、护理医学等),研究快报,短篇论著,经验交流,疑难病例,个案与短篇,技术方法等栏目。作者投稿请登陆本刊网站(<http://journal.cmu.edu.cn>),省级以上基金稿件请注明基金项目、名称和批准号,并附相关单位证明及作者简介,基金资助论文将优先发表。

热忱欢迎国内外作者积极投稿,对您的支持和协作,我刊表示诚挚的谢意!

地址:沈阳市和平区北二马路92号,邮编:110001

电话:(024)23250375