

抗痛风颗粒中青风藤 TLC 鉴别与青藤碱的含量测定

陈 勇*, 邓家刚, 王 勤, 刘 婧, 潘丽娜, 丁光华
(广西中医学院药学院, 广西南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立抗痛风颗粒中青风藤的 TLC 定性鉴别方法和青藤碱的高效液相色谱含量测定方法。方法: 以青藤碱为对照品, 采用甲苯-乙酸乙酯-甲醇-氨水(2:4:2:1)为展开剂, 改良碘化铋钾溶液为显色剂, 对抗痛风颗粒中青风藤进行薄层色谱法定性鉴别。采用 Agilent extend C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-0.1% 磷酸溶液(用三乙胺调 pH 至 10)(38:62)为流动相, 262 nm 为检测波长, 测定了抗痛风颗粒中青藤碱的含量。结果: 抗痛风颗粒薄层色谱中, 青藤碱斑点清晰, 阴性对照无干扰。HPLC 定量分析中, 青藤碱线性范围为 0.414~ 2.484 μg($r=0.9998$), 平均回收率为 97.6%, RSD= 0.32%。结论: 所建立的分析方法简便可行, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 抗痛风颗粒; 青风藤; 青藤碱; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0011-03

TLC Identification of *Caulis Sinomenii* and the Content Determination of Sinomenine in Anti gout Granules

CHEN Yong*, DENG Jia-gang, WANG Qin, LIU Jing, PAN Li-na, DING Guang-hua
(Guangxi TCM University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a TLC method for *Caulis Sinomenii* identification and a HPLC method for Sinomenine determination in the anti gout granules. **Methods:** *Caulis Sinomenii* was identified on a silicagel thin layer plate developed with methylbenzene: acetidin: methanol: ammonia water (2: 4: 2: 1) and with sinomenine as the chemical reference substance, improved. Dragendorff reagent was used for visualization. The separation of Sinomenium was carried out on column Extend C₁₈ 4.6 mm × 150 mm, 5 μm. The mobile phase was the combination of methanol and the solution of 0.1% phosphoric acid(38: 62), and the detection wavelength was set at 262 nm. **Result:** Sinomenine spots on TLC plates was separated detection wavelength well. The linear range is between 0.414 and 2.484 μg ($r=0.9998$) and the recovery is 97.6% (RSD= 0.32%). **Conclusions:** The methods are sensitive, simple, accurate and can be used for the control of anti gout granules.

[Key words] Anti gout Granules; *Caulis Sinomenii*; Sinomenine; TLC; HPLC

抗痛风颗粒由粉萆薢、两面针、青风藤等多味中药组成, 具有抗痛风的功能。青风藤药材, 具有祛风湿、通经络、利小便等功效, 用于风湿痹痛、关节肿胀、麻痹瘙痒^[1]。为有效控制该制剂的质量, 本实验建立了抗痛风颗粒青风藤的薄层鉴别和青藤碱含量

测定方法。现报道如下:

1 材料、仪器与试剂

药材: 青风藤药材经广西中医学院药用植物教研室刘寿养副教授鉴定为防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎。青藤碱对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号为 0774-200105。抗痛风颗粒(广西中医学院药学院药剂教研室自制)。

Agilent1100 高效液相色谱仪, 在线真空脱气机

[收稿日期] 2006-08-28

[通讯作者] * 陈勇, Tel: (0771) 3137585; E-mail: cy6381@163.

com

(G-1322A), 四元泵(G-1311A), 标准自动进样器(G-1313A), 智能化柱温箱(G-1316A), 可变波长检测器(G-1314A), 二极管阵列检测器, Agilent1100 series 色谱工作站(美国安捷伦科技公司); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯); 939 薄层制板器(重庆南岸贝尔德仪器技术厂)。

甲醇, 乙腈(色谱纯)、磷酸(分析纯), 其他试剂均为分析纯。

2 TLC 鉴别

称取本品约 2 g, 加乙醇 25 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液水浴挥干溶剂, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用浓氨调 pH 值至 10~11, 用氯仿萃取 2 次(20 mL/次), 合并氯仿液, 水浴挥干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺青风藤阴性样品同法处理, 制成阴性供试品溶液。另称取青风藤药材 2 g, 用浓氨浸润, 加乙醚 25 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液水浴挥干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。另取青藤碱对照品, 加甲醇制成浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。吸取上述供试品溶液和阴性供试品溶液各 5 μ L, 对照药材液 3 μ L, 对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-氨水(2:4:2:1)为展开剂, 展距 8 cm, 取出, 晾干, 喷以改良碘化铋钾溶液。供试品色谱中, 在与对照品溶液相应的位置上, 显相同颜色的橙红色斑点, 阴性样品无干扰。

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent extend C₁₈ 柱(4.6mm \times 150 mm, 5 μ m, 美国安捷伦科技公司); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(用三乙胺调 pH 至 10)(38:62); 检测波长: 262 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流速: 1 mL/min; 进样量: 5 μ L; 理论塔板数以青藤碱计不低于 3 000, 见图 1~3。

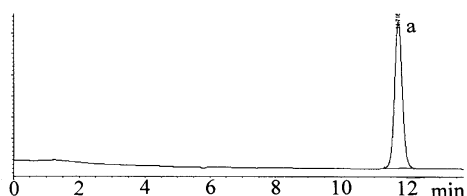


图 1 青藤碱对照品 HPLC 色谱图 a 为青藤碱

3.2 对照品溶液制备 精密称取青藤碱对照品适量(10.35 mg), 置 50 mL 量瓶中, 用适量甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.207 mg/mL 的对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备 取本品约 3 g, 精密称定,

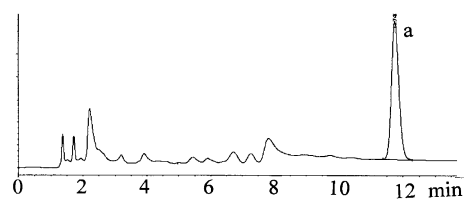


图 2 抗痛风颗粒供试品 HPLC 色谱 a 为青藤碱

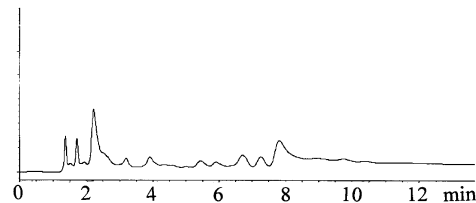


图 3 缺青风藤阴性供试品 HPLC 色谱图

置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 30 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 补足损失的重量, 滤过。精密量取续滤液 20 mL, 置蒸发皿中, 水浴挥干溶剂, 残渣加入水 20 mL, 用浓氨溶液调 pH 值至 10~11, 氯仿萃取 3 次(20 mL, 20 mL, 15 mL), 合并氯仿液, 水浴挥干溶剂, 残渣加甲醇使溶解, 并定量转移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液作为供试品溶液。同法制备缺青风藤的阴性供试品溶液和青风藤对照药材溶液。

3.4 方法学考察

3.4.1 标准曲线制备 分别配制一系列不同浓度的对照品溶液, 精密吸取不同浓度的对照品溶液各 5 μ L 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积值。以峰面积为纵坐标, 对照品进样量(μ g)为横坐标, 绘制标准曲线, 并求出回归方程为 $Y = 958.67X + 27.7$, $r = 0.9998$ 。结果表明青藤碱进样量在 0.414~2.484 μ g 间呈良好线性关系。

3.4.2 精密度试验 取同一供试品溶液 5 μ L, 注入高效液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测定青藤碱峰面积, 计算 $RSD = 0.13\%$ 。

3.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0, 4, 8, 12, 24 h 分别进样 5 μ L, 测定青藤碱峰面积值, 计算 $RSD = 0.23\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

3.4.4 重复性试验 精密称取同一批号供试品 6 份, 按样品测定项下方法进行测定, 计算平均含量为 0.093 9%, $RSD = 0.50\%$ 。

3.4.5 加样回收率试验 取已测知青藤碱含量的供试品干燥粗粉约 1.5 g, 精密称定, 分别精密加入一定量的青藤碱对照品溶液(1.450 mg/mL), 按供试品溶液制备方法制备待测溶液, 按上述色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

原有量(mg)	加入量(mg)	测得量(g)	回收率(%)	\bar{x} (%)	RSD(%)
1.412	1.450	2.801	97.4		
1.408	1.450	2.841	97.7		
1.406	1.450	2.806	97.9		
1.416	1.450	2.819	97.2	97.6	0.32
1.414	1.450	2.847	97.3		
1.405	1.450	2.836	97.9		

3.5 样品测定 分别取不同批次的抗痛风颗粒供试品约 3 g, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积值, 以外标一点法计算供试品中青藤碱的含量, 结果含量分别为 0.100, 0.103, 0.102(%)。

4 讨论与小结

曾选用甲苯-乙酸乙酯-甲醇-水(24: 2: 1) 10 °C 下放置的上层溶液作为展开剂, 以及氯仿-丙酮-甲醇(6: 1: 1) 为展开剂, 发现色谱斑点拖尾现象严重; 亦选用过甲苯-乙酸乙酯-三乙胺(7: 2: 1) 为展开剂, 但被检组分色谱斑点 Rf 值太低; 改用甲苯-乙酸乙酯-甲醇-氨水(2: 4: 2: 1) 为展开剂, 被检组分斑点清晰, Rf 值适宜。

曾选用过乙醇、乙酸乙酯超声提取后直接进样的方法, 但提取液杂质太多; 最后确定选用 3.3 项下的方法提取, 效果较好。

采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考

察, 青藤碱在 262 nm 处有最大吸收, 因此选择该波长作为检测波长; 曾对以下几种流动相进行过考察: ①乙腈-0.1% 磷酸溶液(pH 调到 10) 系统, 但由于青藤碱色谱峰出峰太快, 为了排除溶剂峰的影响和达到更好的分离效果, 而没有选择这个系统。②甲醇-0.1% 磷酸溶液系统, 由于各峰的分离度不理想, 达不到分离效果而放弃了该系统。③最后选定了甲醇-0.1% 磷酸溶液(pH 调到 10) 系统, 比例为(38: 62), 测得保留时间适宜, 分离度大于 1.5, 分离效果好; 曾选用过 Hypersil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 大连依利特公司) 进行测定, 结果得到的色谱峰拖尾严重, 分离度不佳。改用 Agilent extend C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 美国安捷伦科技公司生产的宽 pH 值碱性柱) 测定, 得到的色谱峰峰形较好, 分离度大于 1.5。实验中考虑到青藤碱为生物碱, 为了达到良好的分离效果, 在流动相中加入三乙胺调节 pH 值至碱性, 且只有当 pH ≥ 10 时才能得到较好的色谱峰峰形, 但普通色谱柱(C₁₈) 能耐受流动相的 pH 值范围是 2~ 8, 流动相的 pH ≥ 10 时普通色谱柱(C₁₈) 的化合键合相将会被破坏, 因此, 本实验选用了碱性宽 pH 值柱(C₁₈) 进行分离。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 135.