

高效液相色谱法定量测定中药千层塔提取物中的石杉碱甲

张敬彩¹, 魏杰², 钟虹敏¹, 郭志谋^{2*}, 张华^{1*}

(1. 大连理工大学化学学院, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 建立了高效液相色谱快速定量测定中药千层塔提取物中石杉碱甲含量的分析方法。千层塔提取物经甲醇/水/甲酸(10/90/0.2, v/v/v)提取并定容后过滤膜后直接分析。色谱分离选用 XCharge C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以水(含 0.1% 三氟乙酸)和乙腈(含 0.09% 三氟乙酸)为流动相进行梯度洗脱, 流速为 2 mL/min, 于 310 nm 波长下检测, 可在 10 min 内完成石杉碱甲的快速分离分析。结果表明, 石杉碱甲在 2.12 ~ 106 mg/L 范围内线性关系良好(相关系数为 0.999 9); 平均加标回收率为 102.34% 相对标准偏差(RSD)为 0.46%; 日内及日间精密度均小于 2% 满足定量要求。该方法简便、快速、结果可靠、重现性好, 可作为千层塔提取物质量评价的依据。

关键词: 高效液相色谱法; 生物碱; 石杉碱甲; 千层塔; 中草药

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)01-0079-04

Determination of Huperzine A in the extract of *Huperzia serrata* by high performance liquid chromatography

ZHANG Jingcai¹, WEI Jie², ZHONG Hongmin¹, GUO Zhimou^{2*}, ZHANG Hua^{1*}

(1. College of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established to determine the Huperzine A in the extract of *Huperzia serrata*. After extracted by methanol/water/formic acid (10/90/0.2, v/v/v), the sample was filtered for HPLC analysis. The separation was performed on an XCharge C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution with water (containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid) and acetonitrile (containing 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid) as the mobile phases. Rapid separation was achieved within 10 min at a flow rate of 2 mL/min with ultraviolet absorption detection at a wavelength of 310 nm. Under the optimized conditions, good linearity was obtained in the range of 2.12 – 106 mg/L with the correlation coefficient (R^2) of about 0.999 9. The average recovery was 102.34% with the relative standard deviation (RSD) of 0.46%. The intraday and interday precisions were all below 2%. The results demonstrate that this method is simple, rapid and accurate with good reproducibility, and can be used to evaluate the quality of *Huperzia serrata*.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); alkaloid; Huperzine A; *Huperzia serrata*; Chinese medicinal herb

中药千层塔为石杉科石杉属多年生草本植物蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb) T. 的全草, 出自《植物名实图考》, 功能主治清热解毒、止血定痛散瘀。千层塔主要成分有生物碱、黄酮苷和三萜类化合物等, 其中对生物碱成分的研究较为成熟^[1, 2]。在 20 世纪 80 年代, 我国科技人员首次从该药材中提取到

生物碱类成分——石杉碱甲(Huperzine A), 后经证明石杉碱甲是一种高效可逆的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 对于治疗老年痴呆症有良好的疗效^[3]。

由于通过人工合成很难获得与天然药物活性相当的石杉碱甲, 因此千层塔仍是得到石杉碱甲的主要来源^[3]。目前测定千层塔提取物中生物碱含量

* 通讯联系人. E-mail: zhanghua@dlut.edu.cn(张华); E-mail: guozhimou@dicp.ac.cn(郭志谋).

基金项目: 国家杰出青年基金项目(20825518); 国家自然科学基金项目(21005077).

收稿日期: 2012-08-22

的方法主要为反相高效液相色谱法(RP-HPLC)。RP-HPLC 具有选择性高、重现性高和分离效率高的优点,是一种能够准确分析千层塔的有效方法。但千层塔提取物中生物碱成分复杂,有必要发展一种能够很好地分离石杉碱甲与类化合物的色谱方法。Pan 等^[4]试图通过在流动相中添加赖氨酸来提高选择性,但色谱峰拖尾比较严重。在中性 pH 条件下进行石杉碱甲分离,硅醇基仍具有较大的活性,即使采用封尾的色谱柱也无法避免峰拖尾问题^[5-7]。在低 pH 下进行分离,使用末端未封尾的 C18 柱依然存在色谱峰拖尾、保留时间较短的问题^[8-10]。因此,选择能获得对称峰形的色谱柱和合适的流动相对于石杉碱甲的色谱分离分析十分重要。改善封尾效果和引入极性基团是两种常用的降低色谱柱分离碱性化合物时峰形拖尾的主要途径,但是都存在一定的局限性^[11]。我们研究发现在 C18 柱表面引入正电荷能显著改善碱性化合物的峰形和载样量^[12,13]。北京华谱新创公司和 Waters 公司分别推出的具有表面电荷的 XCharge C18 和 CSH C18 商品化色谱柱,在增加样品上样量和改善碱性化合物的峰形方面表现出独特的优势^[14]。

本文使用带有表面正电荷的 XCharge C18 色谱柱,以添加三氟乙酸的水和乙腈为流动相,建立一种快速定量分析千层塔提取物中石杉碱甲的含量的 RP-HPLC 方法,提高了千层塔提取物中石杉碱甲含量测定的准确性和速度,为千层塔提取物的质量控制提供基础。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪,配有 Waters 2489 紫外检测器(美国 Waters 公司);XCharge C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm;北京华谱新创科技有限公司);ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm;Agilent 科技有限公司);Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司);真空干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);KQ5200DE 超声仪(江苏昆山超声仪器有限公司)。

石杉碱甲标准品(纯度 99%,泰州市奥睿锦生物科技有限公司);2 个千层塔提取物(泰州市奥睿锦生物科技有限公司);乙腈、甲醇(安徽时联特种溶剂股份有限公司);三氟乙酸、甲酸(百灵威科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

精密称取经过干燥的石杉碱甲对照品 5.31 mg 于 5 mL 容量瓶中,用甲醇/水/甲酸(10/90/0.2, v/v/v)溶液定容,配制成质量浓度为 1.06 g/L 的标准储备液,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

用上述溶液逐级稀释石杉碱甲储备液,配制成质量浓度为 106.0、53.0、10.6、5.3、2.12 mg/L 的标准溶液。

1.2.2 供试品溶液的配制

精密称取 20.0 mg 2 个千层塔提取物各 3 份,于 50 mL 容量瓶中,用甲醇/水/甲酸(10/90/0.2, v/v/v)溶液定容。超声 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜于液相小瓶中备用。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: XCharge C18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 0.1% 三氟乙酸水溶液(A)和 0.09% 三氟乙酸乙腈(B);梯度洗脱: 0 ~ 10 min, 5% B ~ 8% B;流速: 2.0 mL/min;检测波长: 310 nm;柱温: 30 °C;进样体积: 10 μL。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

石杉碱甲为碱性化合物,并具有一定的极性,在反相色谱柱上保留较弱,且会产生拖尾问题。选用 XCharge C18 柱,分别在乙腈-水中添加甲酸、三氟乙酸为流动相对供试品溶液进行分析,结果表明,千层塔提取物在两种流动相梯度的最优条件下,采用 2.0 mL/min 的流速,可以有效避免石杉碱甲的拖尾问题(图 1a 和 1b)。但相比之下,采用添加三氟乙酸的乙腈-水为流动相时,石杉碱甲可以获得较对称的峰形和较强保留。这是由于三氟乙酸作为离子对试剂,可以很好地增强极性化合物在反相色谱柱上的保留。良好的峰形和分离度能显著提高色谱定量的准确性和灵敏度,因此最终选用添加三氟乙酸的乙腈-水为流动相进行千层塔提取物中石杉碱甲的分离。

2.1.2 色谱柱的考察

选用商品化 XCharge C18 柱和 XDB-C18 柱分别对供试品溶液进行分析,结果(见图 1b 与 1c)表明,在 XCharge C18 柱上分离千层塔提取物中石杉碱甲的保留时间较长,分离度较高,有利于石杉碱甲的定量测定。因此选用 XCharge C18 柱进行实验。

2.2 方法学考察

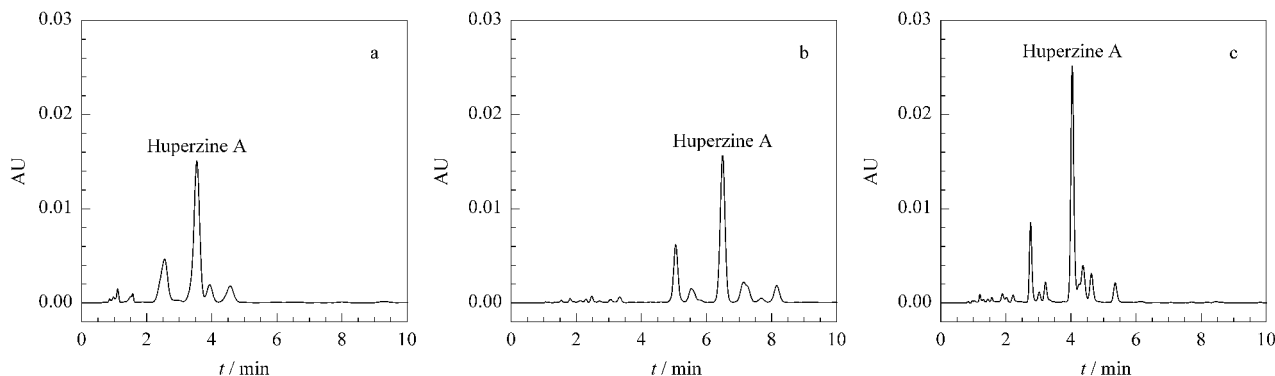


图 1 采用不同的色谱柱及流动相中添加不同的酸分离样品溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a sample separated on different columns with gradient elution using the mobile phases by adding different acids

a. XCharge C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase A, water containing 0.1% (v/v) formic acid; mobile phase B, acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid; gradient program: 0 - 10 min, 0% B - 3% B. b. XCharge C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase A, water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid; mobile phase B, acetonitrile containing 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid; gradient program: 0 - 10 min, 5% B - 8% B. c. XDB-C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase A, water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid; mobile phase B, acetonitrile containing 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid; gradient program: 0 - 10 min, 10% B - 15% B. Flow rate: 2.0 mL/min.

2.2.1 标准曲线及定量限

将配制的不同浓度的标准品溶液重复进样 3 次, 用得到的峰面积 (平均值/1000) Y 为纵坐标, 石杉碱甲标准品的质量浓度 X (mg/L) 为横坐标建立标准曲线。结果表明, 石杉碱甲在 2.12 ~ 106 mg/L 范围内线性关系良好, 线性相关系数 R^2 为 0.9999, 线性回归方程为 $Y = 10.6184X + 3.266$ 。以信噪比为 10 计的定量限为 0.024 mg/L。

2.2.2 仪器精密度

取石杉碱甲对照品溶液, 重复进样测定 6 次, 计算石杉碱甲峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 0.50%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.3 方法稳定性

取同一千层塔提取物平行称取 3 份, 按建立的方法制备, 分别于制备后 2、6、10 h 进样分析测定石杉碱甲的含量, 测定日内精密度; 连续 3 d 重复试验, 测定日间精密度。由表 1 可知, 日内及日间精密度均低于 2%, 表明该方法的稳定性和重现性良好。

表 1 石杉碱甲定量分析方法的稳定性 ($n=3$)
Table 1 Stability of the quantitative method of Huperzine A ($n=3$)

Sample number	RSD/%	
	Intra-day	Inter-day
1	0.34	0.22
2	1.42	0.69
3	0.35	1.91

2.2.4 回收率及精密度

精密量取 3 份相近浓度的样品溶液各 3 mL, 分

别加入 0.2 mL 标准溶液, 每份样品分析 3 次, 用外标法计算平均回收率及精密度。结果表明, 3 次样品加标平均回收率为 102.34%, RSD < 0.5%, 满足定量分析要求。

2.3 样品测定

按 1.2.2 节方法配制 6 份千层塔提取物供试品溶液, 分别按 1.2.3 节的方法重复分析 3 次, 通过标准曲线计算千层塔提取物中石杉碱甲的含量。图 2 显示实际样品中的石杉碱甲与石杉碱甲标准品的保留时间可以很好地吻合。计算结果表明, 按建立的方法提取得到的 2 个千层塔提取物中的石杉碱甲含量分别为 3.785% 和 3.694%。

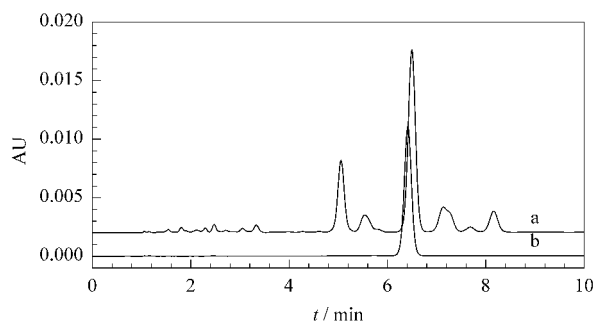


图 2 (a) 供试品溶液和 (b) 对照品溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) a sample solution and (b) standard solution on an XCharge C18 column

Conditions: mobile phase A, water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid; mobile phase B, acetonitrile containing 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid; gradient program: 0 - 10 min, 5% B - 8% B; flow rate: 2.0 mL/min.

3 结语

建立了测定千层塔提取物中石杉碱甲含量的反相高效液相色谱方法,可在 10 min 内完成石杉碱甲的快速分析。方法的线性关系、精密度及加标回收率等各项参数表明,方法的灵敏度和准确度均符合实际样品检测要求。该方法具有简单快速和重现性好等优点。

参考文献:

- [1] Zhang Q P. Strait Pharmaceutical Journal (张庆平. 海峡药学), 2011, 23(4): 42
- [2] Guo B, Xu L L, Wei Y H, et al. Chinese Journal of Chinese Materia Medica (郭斌, 徐玲玲, 尉亚辉, 等. 中国中药杂志), 2009, 34(16): 2018
- [3] Ma X J, Yan Z G, Tian X H, et al. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (马小军, 闫志刚, 田夏红, 等. 时珍国医国药), 2009, 20(11): 2858
- [4] Pan J, Jin R S, Hu X Q. J Chromatogr B, 2006, 836(1/2): 108
- [5] Ma X Q, Tan C H, Zhu D Y, et al. J Agric Food Chem, 2005, 53(5): 1393
- [6] Wu Q Q, Gu Y H. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(4): 993
- [7] Wang J, Pan S L. Chinese Pharmaceutical Journal (王峻, 潘胜利. 中国药学杂志), 2009, 44(16): 1212
- [8] Wang R, Wang H, Liu J, et al. Journal of Henan University of Chinese Medicine (王锐, 王辉, 刘菊, 等. 河南中医学院学报), 2007, 22(6): 32
- [9] Zhang X, Chen J, Zeng Y M, et al. Modern Chinese Medicine (张馨, 陈靖, 曾毅梅, 等. 中国现代中药), 2008, 10(11): 26
- [10] Huang J, Yang L M, Li Q J, et al. Guizhou Medical Journal (黄静, 杨理明, 李齐激, 等. 贵州医药), 2007, 31(7): 644
- [11] McCalley D V. J Chromatogr A, 2010, 1217(6): 858
- [12] Guo Z M, Wang C R, Liang T, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(27): 4555
- [13] Wang C R, Guo Z M, Zhang J, et al. J Sep Sci, 2011, 34(1): 53
- [14] Lucie N, Hana V, Solich P. Talanta, 2012, 93: 99