

高效液相色谱 化学发光法测定盐酸青藤碱

孙永华, 张琰图, 章竹君

(陕西师范大学 化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 基于盐酸青藤碱对高锰酸钾-硫代硫酸钠的化学发光的增敏作用, 建立了反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离柱后化学发光检测盐酸青藤碱的新方法, 并成功用于血样和尿样中盐酸青藤碱的测定。该方法的线性范围为 $5.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ g/mL, 检出限为 8×10^{-8} g/mL, 对盐酸青藤碱溶液连续 11 次测定的相对标准偏差为 2.8%。

关键词: 高效液相色谱; 化学发光; 盐酸青藤碱; 高锰酸钾

中图分类号: O657.72; R971.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)02-0087-03

Determination of Sinomenine Hydrochloride by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection

SUN Yong-hua, ZHANG Yan-tu, ZHANG Zhu-jun

(College of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract A method based on the chemiluminescence reaction of $\text{KMnO}_4 - \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 - \text{SN}$ was developed for the determination of sinomenine hydrochloride (SN) using reversed phase high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. The chemiluminescence intensity is correlated linearly with SN concentration in the range of $5.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ g/mL with a detection limit of 8.0×10^{-8} g/mL. Its relative standard deviation is 2.8% for 11 measurements. This method has been applied to the determination of SN in human serum and urine samples.

Key words High performance liquid chromatography; Chemiluminescence; Sinomenine hydrochloride; Potassium permanganate

盐酸青藤碱 (sinomenine hydrochloride, SN, 青藤碱的结构式见图 1) 是从植物青风藤 (*Sinomenium acutum* Rehd. et Wils) 中提取生物碱单体盐酸盐。具有抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心率失常等药理作用, 临床用于治疗类风湿性关节炎等各种风湿病以及心率失常, 取得较好疗效^[1]。已报道的测定方法有薄层扫描法^[2]、等速电泳法^[3]、毛细管电泳高频电导法^[4]、高效液相色谱法^[5]等。这些方法或者线性范围不宽, 灵敏度较低, 或者操作繁冗, 检测设备昂贵。化学发光 (chemiluminescence, CL) 具有灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单等特点, 加上高效液相色谱 (HPLC) 的分离特性, 使得 HPLC/CL 越来越受到人们的青睐^[6]。化学发光测定盐酸青藤碱也已有报道^[7], 方法基于生物碱能沉淀雷氏盐, 导致鲁米诺-过氧化氢-雷氏盐体系化学发光强度的降低, 从而实现了青藤碱等的流动注射化学发光分析方法。方法操作复杂, 也未应用于实际样品的分析。本研究发现在硫酸介质中, 盐酸青藤碱可极大地增强 KMnO_4 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的发光; 据此, 建立了 HPLC/CL 测定盐酸青藤碱的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-6A 高效液相色谱仪 (Shimadzu Japan), 7125 手动进样阀 (25 μL), HL-2 恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂), 过滤器 (大连江申分离科学技术公司), FFS-A 型多功能化学发光检测器、IFFM-A 型化学数据采集系统 (西安瑞迈电子有限公司)。甲醇 (色谱纯) (Fisher); 盐酸青藤碱 (陕西省药检

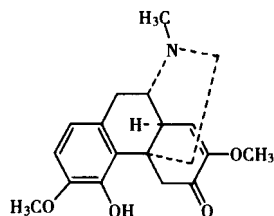


图 1 青藤碱的结构式
Fig. 1 Structure of sinomenine

收稿日期: 2005-03-20 修回日期: 2005-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470886)

作者简介: 孙永华 (1975-), 男, 陕西略阳人, 助理工程师, 硕士研究生; 章竹君, 联系人, Tel: 029-85308748

E-mail: zzjl8@hotmail.com

所); KMnO_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 H_2SO_4 均为国产分析纯试剂; 水为去离子石英亚沸蒸馏水; $6.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ KMnO_4 备用; $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 备用; 盐酸青藤碱标准储备液 1.25 mg/mL 。

1.2 色谱条件

NUCLEOSIL 100-5 C18 柱 ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, 德国); 流动相: 甲醇 - 水 - 三乙胺的体积比为 75 : 25 : 0.1, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 超声脱气后使用。流速: 1.0 mL/min 进样量: $25 \mu\text{L}$ 。柱温: 室温。

1.3 操作步骤

按图 2 所示连接各部件。分别将各反应试液、流动相通过相应的管道输入混合池, 待基线平稳后, 进样 $25 \mu\text{L}$ 。经色谱分离后待测组分和反应试剂在混合池中混合而发光。记录色谱图, 在线性范围内, 根据峰高定量。

2 结果与讨论

2.1 化学发光反应与色谱分离条件的选择

2.1.1 硫酸浓度对化学发光强度的影响

实验比较了硫酸、磷酸、硝酸对发光反应的影响, 发现在硫酸介质中, 有最大发光强度。随着硫酸浓度的增大, 化学发光强度增强。在硫酸浓度超过 2 mol/L 后, 信噪比降低。本文固定了流动相比例、 KMnO_4 浓度、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度、流速, 以 25.0 mg/L 盐酸青藤碱为例, 考察了不同浓度的硫酸 ($0 \sim 3 \text{ mol/L}$) 对化学发光反应的影响。结果表明, 当硫酸浓度为 2 mol/L 时, 有最大的信噪比。

2.1.2 硫代硫酸钠浓度对化学发光强度的影响

分别考察了盐酸青藤碱对亚硫酸钠、硫代硫酸钠、过氧化氢、甲醛与 KMnO_4 化学发光反应的增敏作用。发

现对 $\text{KMnO}_4 - \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 增敏作用最强。在一定浓度范围内, 随着 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度的升高, 化学发光强度增强。但 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度增大到一定程度后, 再增大其浓度, 发光强度随之降低。本文固定了流动相比例、 KMnO_4 浓度、 H_2SO_4 浓度、流速, 以 25.0 mg/L 盐酸青藤碱为例, 考察了不同浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($1.0 \times 10^{-4} \sim 1.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 对该化学发光反应的影响。结果表明, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 发光强度最大。

2.1.3 高锰酸钾浓度对化学发光强度的影响

实验表明, 在酸性介质中, 随 KMnO_4 浓度的增大, 化学发光强度增强。但 KMnO_4 浓度增大到一定程度后, 再增大其浓度, 发光强度反而降低。在固定了其他条件的情况下, 以 25.0 mg/L 盐酸青藤碱为例, 考察了不同浓度的 KMnO_4 ($2.0 \times 10^{-4} \sim 1.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 对发光反应的影响。结果表明, KMnO_4 浓度为 $6.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 有最大发光强度。

2.1.4 化学发光反应试剂的流速的影响

在流动注射化学发光分析中, 反应试剂的流速是影响发光强度的 1 个重要因素。在固定 HPLC 流动相流速为 1.0 mL/min 及其他条件的情况下, 考察了反应试液的流速对发光反应的影响。结果表明, 随着 $\text{KMnO}_4 - \text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液流速的增大, 发光信号增强, 增大到一定程度后, 噪音也随之变大。综合考虑试剂节省和信噪比两方面的因素, 选择流速为 4.0 mL/min 。

2.1.5 反应混合管的设计

在其他条件一定的情况下, 柱后洗脱液和发光试剂混合, 发光强度与混合管的设计有关。实验中将柱后洗脱液与化学发光试剂在 120°C 三通处汇合, 并连接一透明螺旋玻璃管直接置于检测窗口内, 取得了满意的效果^[8]。

2.1.6 流动相对发光强度的影响

实验中发现, 随着甲醇比例的增加, 发光信号增强。兼顾分离度和灵敏度的要求, 选用甲醇 - 水的体积比为 75 : 25。加入三乙胺可以有效地抑制峰脱尾, 而且 0.1% (V) 三乙胺对发光几乎没有影响。

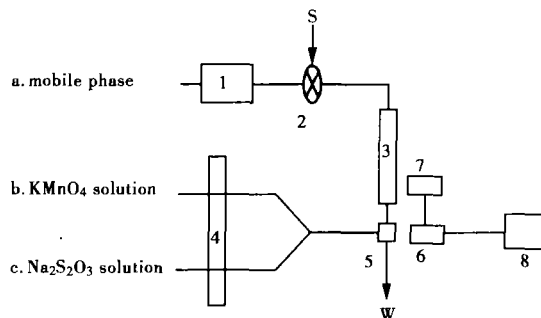


图 2 高效液相色谱 化学发光检测系统示意图

Fig. 2 Schematic diagram of HPLC/CL detection system

1. 色谱泵 (reciprocating pump); 2. 六通阀 (sixway valve);
3. 色谱柱 (HPLC column); 4. 恒流泵 (peristaltic pump);
5. 混合池 (CL flow cell); 6. 光电倍增管 (photomultiplier tube PMT); 7. 负高压 (high voltage supply); 8. 计算机 (computer)

2.2 线性范围和检出限

在选定的条件下, 盐酸青藤碱在 $5.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ g/mL 范围内与发光强度成良好线性关系。其回归方程为 $\Delta I = 6.193 \rho + 1.469 5(\rho$ 样品质量浓度, 10^{-6} g/mL, ΔI 相对发光强度, $r = 0.999 6)$ 。根据 IUPAC 建议, 计算得其检出限 (3σ) 为 8×10^{-8} g/mL。对 2.5 mg/L 的盐酸青藤碱平行测定 11 次, 得到相对标准偏差 (RSD) 为 2.8%。

2.3 样品分析

从陕西师范大学附属医院取 3 支人体血清样, 离心分离除去血球后, 储存于冰箱中 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。尿样适量, 储存于冰箱中 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

精密量取血样澄清液于塑料试管中, 用移液管分别准确加入盐酸青藤碱, 经除去蛋白后, 定容于 25 mL 容量瓶中; 尿样适量于 25 mL 容量瓶中, 分别准确加入盐酸青藤碱, 稀释至刻度。测定前用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤。测定结果见表 1 和图 3。

表 1 试样分析结果
Table 1 Analytical results of samples

Samples	Original $\rho_0 / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Added $\rho_A / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Found $\rho_F / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Recovery $R\%$
Serum	1.05	2.50	3.66	103
	1.05	5.00	6.11	101
	1.05	7.50	8.38	98
Urine	4.81	2.50	7.02	96
	4.81	5.00	9.61	98
	4.81	7.50	11.69	95

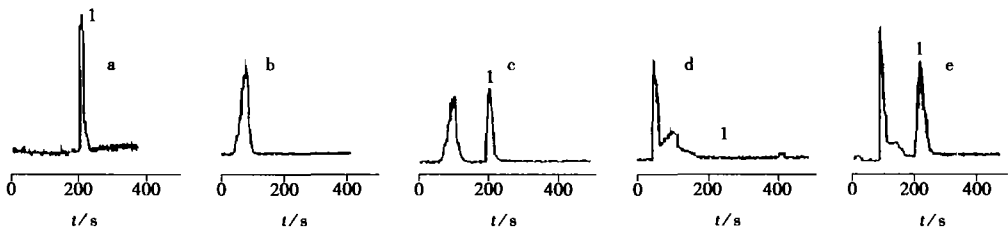


图 3 盐酸青藤碱的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of SN

a 对照 (standard sample); b 阴性尿样 (blank urine); c 尿样 (urine sample);
d 阴性血样 (blank serum); e 血样 (serum sample); 1 盐酸青藤碱 (SN)

参考文献:

[1] 王有志, 李春荣, 莫志贤. 青风藤化学成分与药理研究进展 [J]. 医药导报, 2004, 23(3): 177- 179.

[2] 王隶书, 金向裙, 程东岩, 等. 薄层扫描法测定复方青风藤片中青藤碱的含量 [J]. 中成药, 1996, 18(7): 10- 11.

[3] 成凤桂, 唐尹萍. 等速电泳法测定青风藤中青藤碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 140- 142.

[4] 翟海云, 王峻梅, 陈璐光, 等. 毛细管电泳高频电导法测定青风藤药材及制剂中青藤碱的含量 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(12): 2256- 2258.

[5] 闫小华, 李焕德, 彭文兴, 等. 高效液相色谱法测定人血清和尿中盐酸青藤碱浓度及药代动力学研究 [J]. 药学报, 1997, 32(8): 620- 624.

[6] KRICKA L J. Clinical applications of chemiluminescence [J]. Anal Chim Acta, 2003, 500: 279.

[7] 李建国, 吕九如. 吗啡烷型生物碱类药物的化学发光分析方法研究 [J]. 分析试验室, 1997, 16(3): 41- 44.

[8] 张琰图, 章竹君, 杨维平, 等. 反相高效液相色谱 - 化学发光法测定复合维生素片剂中的维生素 B1 和 B2 [J]. 色谱, 2003, 21(4): 391- 393.