

## RP-HPLC 法测定钩吻生物碱

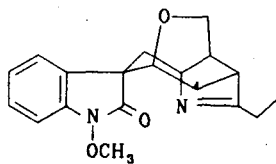
罗淑荣 李 彤 杨峻山

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

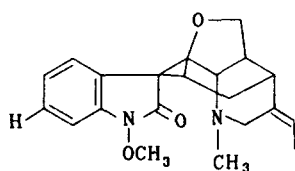
**提要** 用 RP-HPLC 法分离和测定了钩吻碱甲(G), 钩吻碱戊(F), 胡蔓藤碱丙(D)、胡蔓藤碱乙(B)及胡蔓藤碱甲(A)。用常山碱为内标。分析柱  $C_{18}$ , 甲醇-水-正丁胺(78:22:0.1 V/V)为流动相, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 256 nm。线性范围 0.02~0.12  $\mu\text{g}$ , 相关系数  $r=0.9835\sim0.9977$ , 回收率 95.01~99.70%。本方法简便、灵敏、重现性好, 为生产及临床用药提供质量控制依据。

**关键词** 钩吻; 钩吻碱甲; 钩吻碱戊; 胡蔓藤碱甲、乙、丙; 反相高效液相色谱法

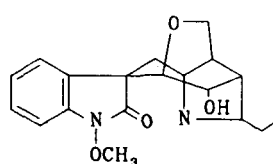
钩吻 *Gelsemium elegans* Benth 为马钱科胡蔓藤属植物, 以根、叶及全草入药, 作为外用治疗皮肤湿疹、麻风等症。近年来又试用于治疗鼻咽癌及肝癌等。但因本品含有多种极毒的生物碱<sup>(1)</sup>, 生产及临床上需有一个准确、简便的质量控制方法。文献报道用 HPLC 法测定一种生物碱<sup>(2)</sup>, 目前对本品中5种生物碱的含量测定方法尚未见报道。本文采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定钩吻中5种主要生物碱即钩吻碱甲(gelsemine, G)、钩吻碱戊(koumine, F)、胡蔓藤碱丙(kumantenidine, D)、胡蔓藤碱乙(kumantenine, B)及胡蔓藤碱甲(kumantenmine, A)。以常山碱为内标物, 考察了生药中5种生物碱的提取、分离及测定等条件。本法可应用于钩吻注射液及总碱浸膏的分析。5种生物碱结构式如下:



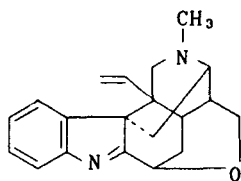
Kumantenmine(A)



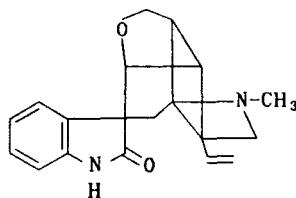
Kumantenine(B)



Kumantenidine(D)



Koumine(F)



Gelsemine(G)

## 实 验 部 分

### 仪器、药品

高效液相色谱仪 美国 Varian LC 5000; 检测器 日本岛津 SPD-6AV; 数据处理机 日本岛津 C-R1B; 离心机 北京离心机厂 LD5-2A; 超声清洗机 无锡超声电子设备厂。

标准品 钩吻碱甲 gelsemium alkaloid A (G)、钩吻碱戊 koumine (F)、胡蔓藤碱丙 kumantenidine (D)、胡蔓藤碱乙 kumantenine (B)、胡蔓藤碱甲 kumantenmine (A) 及内标物常山碱 (dichroine) 均为本所提供。

样品 钩吻生物碱注射液及总碱浸膏均由广东羊城制药厂提供。试剂规格为 AR 级。

### 色谱条件

分析色谱柱: 日本岛津 ODS 柱 (25 cm × 4 mm ID, 10 μm); 流动相: 甲醇—水—正丁胺 (78:22:0.1 V/V); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 256 nm; 色谱柱温 25℃; 纸速 5 mm/min; 量程 0.01 AUFS; 柱效 (理论塔板数/m) 30,000 (按苯计算), 分离情况见 HPLC 色谱图 (图1)。

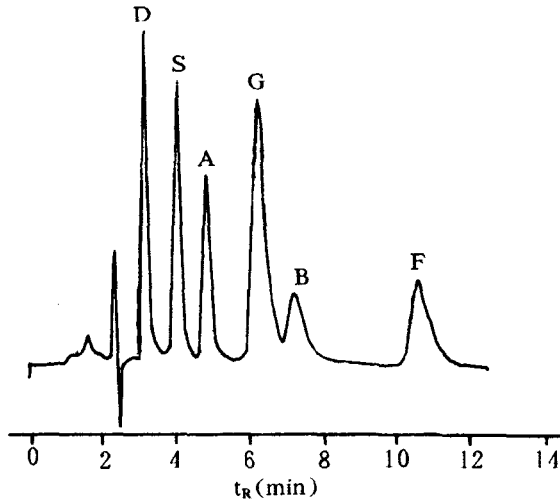


Fig 1 Chromatogram of *Gelsemium* alkaloids. A. Kumantenmine; B. Kumantenine; D. Kumantenidine; F. Koumine; G. Gelsemine; S. Dichroine.

### 检测波长的选择

钩吻中的5种生物碱在 UV-3000型分光光度计上扫描, 最大紫外吸收在252~260 nm, 为了兼顾各生物碱, 我们选用256 nm 作为检测波长。

### 提取条件

曾试用三种碱(氨水、碳酸钠及氢氧化钠)调节至 pH 8~9, 对总生物碱进行碱化提取, 实验结果三种碱均无明显差异, 为了方便操作, 我们选用氨水作为碱化生物碱提取试剂。

### 测定方法

取注射液0.5 ml (或总碱浸膏0.6 mg), 加氨水0.2 ml 和去离子水0.5 ml, 超声10 min, 加氯仿1.0 ml, 超声振荡提取10 min, 离心(3000 r/min)5 min, 取上清液500 μl, 置试管中吹干氯仿, 残渣中加内标液10 μl (2 mg/5 ml 甲醇), 再加甲醇溶解并稀释至200 μl, 混匀, 进样6 μl, 按上述

色谱条件进行分离、测定,以内标法计算含量。

## 结 果

### 线性范围

精密称取5种生物碱标准品各约0.5~1.0 mg,用甲醇溶解并定容至1.0 ml。分别吸取各溶液60~100  $\mu$ l 置1 ml 具塞试管中,加甲醇至总体积为400  $\mu$ l,吸取此液10,15,20,25及30  $\mu$ l,分别加氨水0.2 ml 及去离子水0.5 ml,按上法操作,进样2  $\mu$ l 测定,可得5条直线,其线性范围及相关系数为:生物碱 A. 0.01~0.06  $\mu$ g,  $r=0.9970$ ; B. 0.02~0.07  $\mu$ g,  $r=0.9940$ ; D. 0.03~0.12  $\mu$ g,  $r=0.9930$ ; F. 0.02~1.00  $\mu$ g,  $r=0.9840$ ; G. 0.02~0.09  $\mu$ g,  $r=0.9980$ 。

### 稳定性试验

用混合标准品溶液进样6  $\mu$ l,依法测定,在2 h 内测定峰面积基本稳定。

### 精密度试验

取标准品溶液(4  $\mu$ g/ml)6  $\mu$ l,连续进样7次,测定结果 RSD 分别为:生物碱 A. 0.93%; B. 2.58%; D. 2.01%; F. 3.22%; G. 2.19%。

### 回收率试验

取等量的样品4份,其中二份加入混合标准溶液,依法提取、分离及测定,进行比较,计算回收率,其结果:生物碱 A. 95.01%; B. 99.04%; D. 97.84%; F. 99.70%; G. 95.98%。

### 样品分析

用本法对钩吻注射液及总碱浸膏进行测定,结果如表1。

Tab 1 Analysis of samples (n=3)

Sample	Alkaloid contents (%)					Total
	A	B	D	F	G	
<i>Gelsemium</i> injection (1 mg/2 ml)		4.99		31.52	12.82	49.33
Total alkaloid extract	0.53	0.54	0.35	0.76	0.36	2.54

## 讨 论

流动相中改性剂正丁胺的应用及加入时对钩吻中生物碱的色谱行为影响很大。流动相中不加改性剂则药物滞留,难以洗脱,当加入改性剂一定量时,钩吻中5种生物碱能完全洗脱,这可能由于胺基占据固定相表面的游离硅醇基,将药物取代所致。实验结果表明当100 ml 流动相中加入正丁胺量小于0.08 ml 时只能分离4个生物碱,若大于0.12 ml 时则5个生物碱均能得到分离,但峰间距小,当加入正丁胺0.10 ml 时5种生物碱能得到最佳的分离。

钩吻生物碱浸膏中含有毒性极大的胡蔓藤生物碱甲,但其注射液中未检出胡蔓藤生物碱甲,这肯定了生产工艺的合理及临床用药的安全性。

本法简便易行,重现性好,适于样品分析。

## 参 考 文 献

- 1 杨峻山,等. 胡蔓藤生物碱的化学研究. 药学报 1983;18:104.
- 2 罗淑荣. 胡蔓藤中生物碱的高效液相层析测定. 痕量分析 1986;2:47.

## DETERMINATION OF GELSEMIUM ALKALOIDS BY RP-HPLC

SR Luo, T Li and JS Yang

*(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)*

**ABSTRACT** *Gelsemium elegans* Benth is a kind of traditional Chinese medicine, eight alkaloids have been isolated from this herb.

In recent years, an HPLC method for the separation and determination of five of these alkaloids, ie. gelsemium A (G), koumine (F), kumantenidine (D), kumantenine (B) and kumantenmine (A) is described, dichroine being used as the internal standard. In this report a RP column of C<sub>18</sub> and the mobile phase methanol—water—n-butylamine (78:22:0.1 V/V) were employed. The flow rate was 1.0 ml/min, the column temperature was 25°C and the detection wavelength was 256 nm.

The calibration curves showed good linearity over the range of 0.02~0.12 µg,  $r=0.9835\sim 0.9977$  and the recoveries were 95.01~99.70% for the five alkaloids.

The method is simple, sensitive and reproducible and can be used for the quality control of *Gelsemium* preparations for clinical evaluation.

**Key words** *Gelsemium elegans*; Gelsemine; Koumine; Kumantenidine; Kumantenine; Kumantenmine; RP-HPLC