



采用 Agilent SampliQ OPT 固相萃取吸附剂对金印草生物碱净化并用高效液相色谱-二极管阵列检测器系统(HPLC-DAD)测定

应用报告

制药

作者

Janes Mokgadi, Lesego C. Mmualefe
和 Nelson Torto
罗德斯大学化学学院
P. O. Box 94, 格拉姆斯顿 6140 号
南非

摘要

在固相萃取技术中应用 Agilent SampliQ 优化聚合物技术 (OPT) 吸附剂, 可以进行市售金印草生物碱 (黄连碱和小檗碱) 样品的净化。这些生物碱的分离是以 0.1% 磷酸/甲醇溶液为流动相, 在 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (4.6 mm × 75 mm × 3.5 μm) 上, 采用配备二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪进行。梯度洗脱时的总分析时间仅为 6 分钟。黄连碱的回收率范围在 101% 到 106% (n=8) 指尖, 而小檗碱的回收率范围则在 71% 到 82% (n=8) 之间, 且 RSD% 均小于 1。黄连碱的检测限和定量限分别为 0.50 和 1.65 μg/mL, 而小檗碱的检测限和定量限则分别为 0.47 和 1.55 μg/mL。来自 Willow 的金印草样品含有 17 μg/mL 黄连碱和 35 μg/mL 小檗碱, 而来自 Solga 金印草样品含有 6 μg/mL 黄连碱和 12 μg/mL 小檗碱。



Agilent Technologies

前言

金印草（北美黄连）是多年生毛茛科草本植物，原产于加拿大东南部和美国东北部，是一种最古老的草药植物，也是传统中药中最常用的药用植物。金印草的生物活性与异喹啉生物碱黄连碱和小檗碱（结构见图 1）有关，金印草中还含有其它生物碱，包括白毛茛碱、四氢小檗碱和氢化小檗碱[2]。金印草已经用于感染、炎症的治疗和免疫系统增强剂[3]。然而，由于规范草药和保健品行业的新规章和新法律的紧迫性，建立包括样品制备、净化和预浓缩的样品处理方法在内的普遍适用和高灵敏度分析方法的需求正在增加。

样品前处理是分析过程中最基本的步骤，因为它有利于达到由监管部门所设定的低检测限要求[4]。固相萃取技术（SPE）是目前最常用的净化技术之一，常用于高效液相色谱（HPLC）或气相色谱（GC）进行环境、食品、制药和生物样品分析之前的样品处理。与传统的液-液萃取相比，固相萃取具有很多优势，如有机溶剂使用量小、易于自动化、更低的成本及有毒物残留量等。近年来，有关新型固相萃取材料的发展已有诸多报道，如混合模式吸附剂和限制进入型吸附剂、免疫亲和萃取吸附剂、分子印迹聚合物、导电聚合物[6,7,8]。

本应用报告报道了一种采用 Agilent SampliQ 优化聚合物技术 (OPT) 固相萃取柱，进行金印草中黄连碱和小檗碱固相萃取的优化方法，该方法采用了聚合物基吸附剂，大大减少了基体干扰，改善了分析结果。

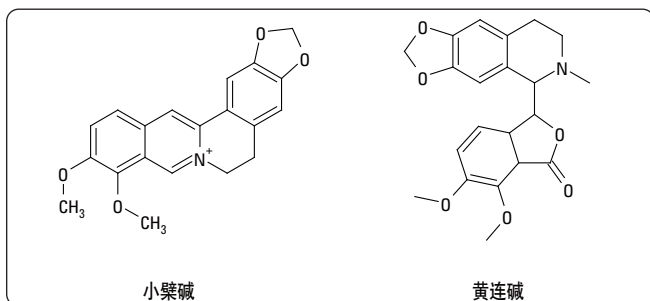


图 1. 黄连碱和小檗碱的结构式

实验部分

试剂和化学药品

盐酸小檗碱和盐酸黄连碱标准物购自 Sigma- Aldrich 公司（美国）。磷酸和氢氧化钾购自默克化学公司（南非），而色谱级甲醇则是从默克 KGaA 公司（德国）购买。磷酸二氢钾购自 Saarchem 分析公司（南非）。金印草胶囊（南非伊丽莎白港 Willow 出品的金印草胶囊和美国新泽西州里奥妮亚城索尔加公司出品的索尔加全能香草）购自南非格拉姆斯顿当地的药店。固相萃取柱为 Agilent SampliQ OPT 1 mL/30mg。仪器为 1200 系列梯度 HPLC-DAD 系统，分析柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (4.6 mm × 75 mm × 3.5 μm)。

贮备液和标准工作液的配制

1000 μg/mL 的黄连碱和小檗碱的甲醇贮备溶液，-4°C 储存。所有其它标准溶液均按要求用贮备液稀释配制。

样品制备

首先，对金印草胶囊样品进行均匀化处理。然后，将 200mg 均匀化处理后的样品与 50mL 的甲醇混合，用磁力搅拌器搅拌 1 小时，得到有不溶颗粒的悬浮液。然后用疏水的聚二氟乙烯（PVDF）0.45 μm-HV 滤膜（Billerica, MA, 美国）过滤。甲醇萃取物按 1:3 的比例用水稀释，用 0.01mol/L 的氢氧化钾溶液调 pH 值到 7。

分离

采用 5 μL 黄连碱—小檗碱标准物混合液（浓度均为 50 μg/mL）进行 HPLC 分离条件优化。检测波长为 242 nm，分别采用 294 nm 和 350 nm 的波长进行小檗碱和黄连碱的定量。HPLC 条件列于表 1 中：

表 1. HPLC 分离条件

色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse 快速分离 Plus C18 色谱柱, 4.6 mm × 75 mm, 3.5 μm (部件号 959933-902)		
流速	1 mL/min		
进样量	5 μL		
柱温	35 °C		
流动相	A: 0.1%磷酸溶液 B: 甲醇		
运行时间	6 分钟		
后运行时间	2 分钟		
检测	294 nm(小檗碱), 350 nm(黄连碱), 242 nm(用于对两个化合物的监测)		
梯度	时间	0	0.5
	%B	20	20
			50

固相萃取

对上样、淋洗和洗脱溶剂等一系列条件进行了系统研究。并通过标准物溶液中黄连碱和小檗碱的分离对这一过程进行了优化。图 2 给出了优化的结果。

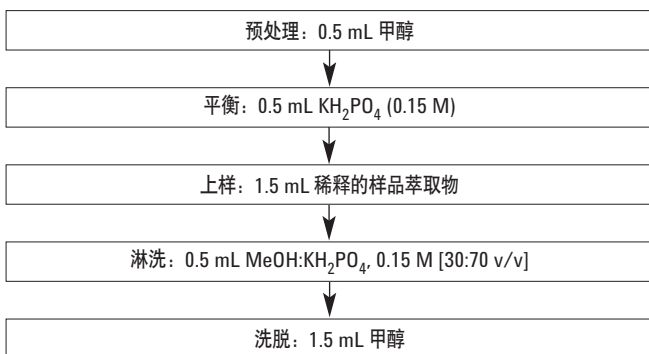


图 2. 利用 SampliQ OPT 吸附剂进行金印草中生物碱净化的 SPE 过程

结果与讨论

分离和固相萃取净化

虽然黄连碱和小檗碱标准品可以在等度条件下分离，但分析时间较长（15 分钟），所以采用梯度洗脱来缩短分析时间。利用表 1 中所列的优化的 HPLC 条件，仅用短短 4.5 分钟就获得了黄连碱和小檗碱标准物的良好分离和标准对称峰，如图 3 所示。通过整个过程中的空白基质实验，在基线中没有发现明显干扰。接下来，分别在 SPE 之前（图 4a）和之后（图 4b）进样 Willow 金印草样品简单过滤的萃取物。值得注意的是，图 4b 中小峰数目的减少意味着 SPE 处理去除了潜在的干扰物。来自 Willow 的第二个金印草样品添加并采用相似的方式处理，进行峰确认。图 5a 和图 5b 中表明，峰强度增加，干扰峰显著减少。

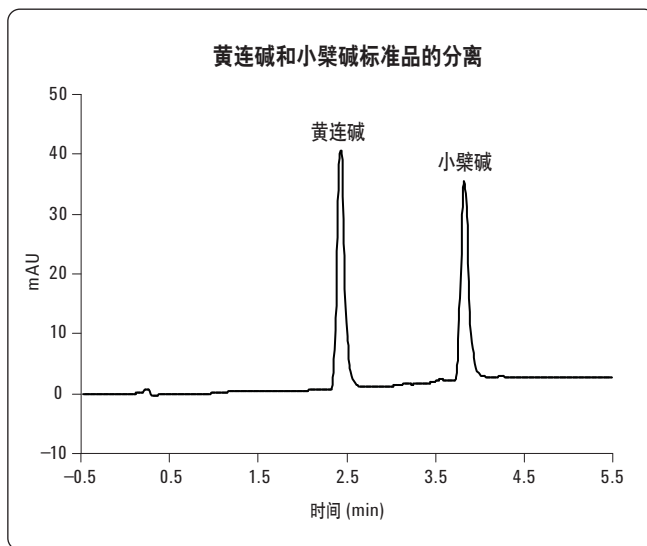


图 3. 黄连碱(120 μg/mL)和小檗碱(100 μg/mL)标准品混合物的色谱图

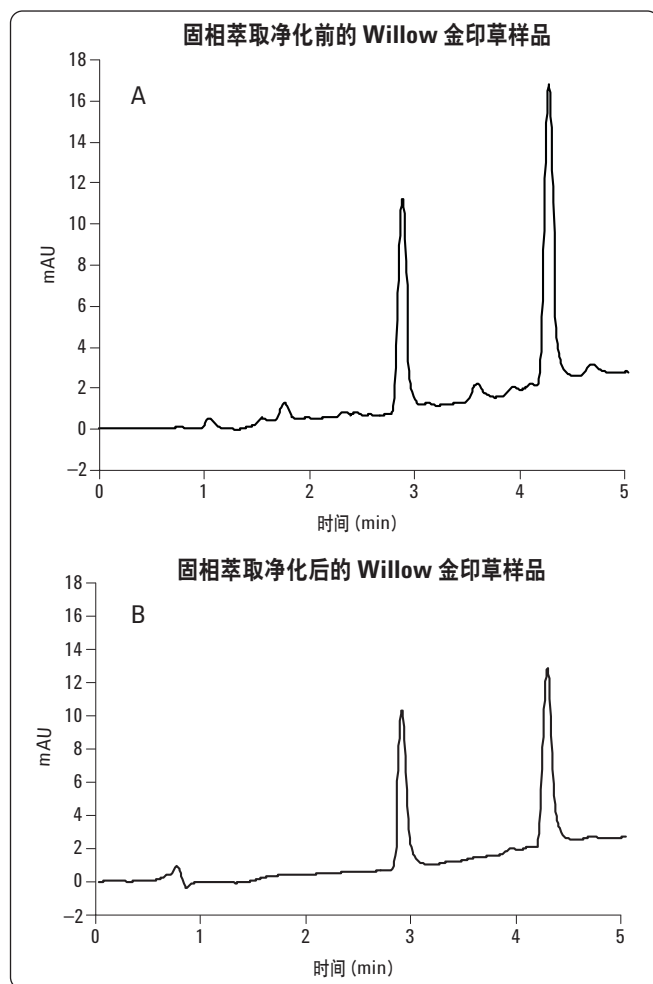


图 4. 金印草样品净化前(a)和净化后(b)的色谱图

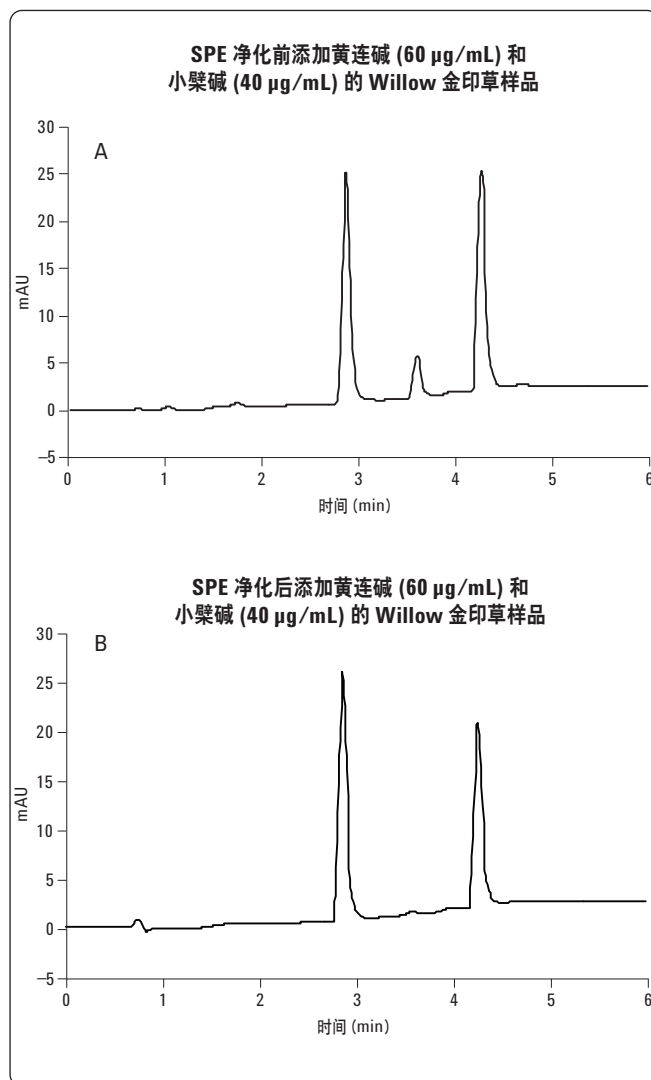


图 5. 利用 SampliQ OPT 吸附剂净化前和净化后的 Willow 金印草添加样品 (分别添加 60 $\mu\text{g/mL}$ 黄连碱和 40 $\mu\text{g/mL}$ 小檗碱) 的色谱图

回收率和重现性

通过对市售样品 (Willow 金印草胶囊) 的 8 次重复实验的分析, 考察了黄连碱和小檗碱的回收率和重现性。在一天之内, 对市售样品添加三个不同浓度水平的黄连碱和小檗碱, 后进行 SPE。在净化处理之前, 对每个浓度加标样品的背景水平进行了测试。通过比较净化前后萃取物的峰面积, 可以计算回收率。小檗碱和黄连碱的回收率和重现性列于表 2 中。RSD%均小于 1, 这个结果对于 SPE 净化和 HPLC 分析是完全可以接受的。

表2. 两种生物碱标准品的回收率和重现性

化合物	化合物添加水平 ($\mu\text{g/mL}$) n=8	回收率(%)	% RSD
黄连碱	40	101	0.16
	60	102	0.56
	100	106	0.75
小檗碱	10	71	0.17
	40	71	0.40
	80	82	0.32

校正曲线

用甲醇稀释小檗碱和黄连碱贮备液，得到不同浓度的标准溶液，直接进样进行 HPLC 分析，得到校正曲线。结果表明，黄连碱的线性范围为 0-120 $\mu\text{g/mL}$ ，小檗碱的线性范围为 0-100 $\mu\text{g/mL}$ ，且 r^2 值均为 0.9994。

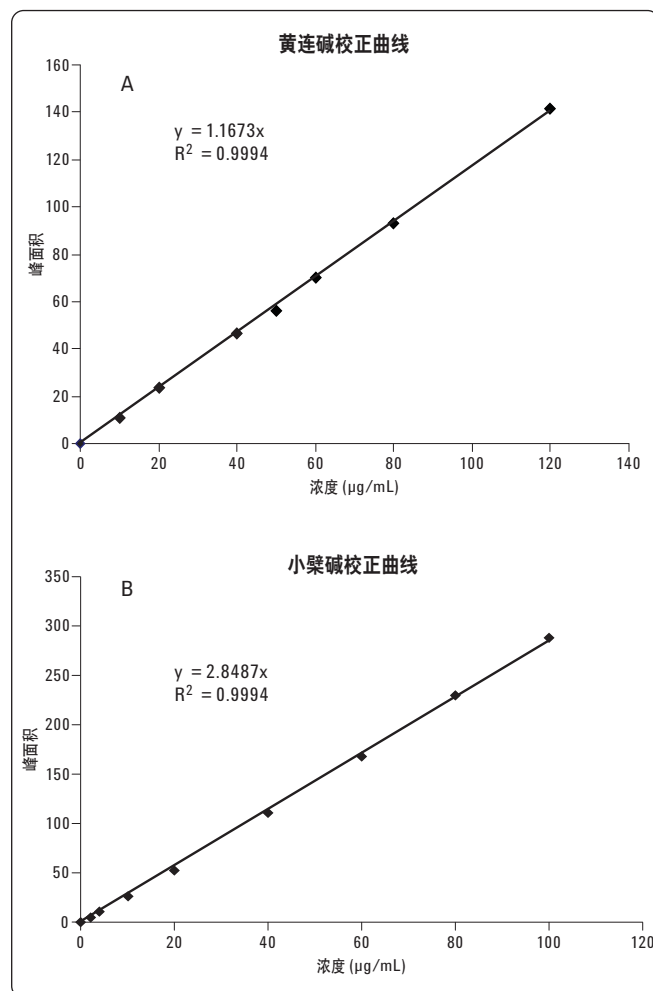


图6. 黄连碱(a)和小檗碱(b)的校正曲线

SPE 的线性

通过添加不同浓度的样品提取物，然后进行固相萃取净化，进行了用 SampliQ OPT 吸附剂进行 SPE 的线性考察。当小檗碱的浓度高于 200 $\mu\text{g/mL}$ 时，不再呈线性（如图 7 所示）。这是由于 SPE 吸附剂超载，不能保留小檗碱。淋洗时损失了一部分，部分样品甚至在上样时就损失了。对于黄连碱，浓度达到 500 $\mu\text{g/mL}$ 时，SampliQ OPT 吸附剂仍能保持良好的线性度。

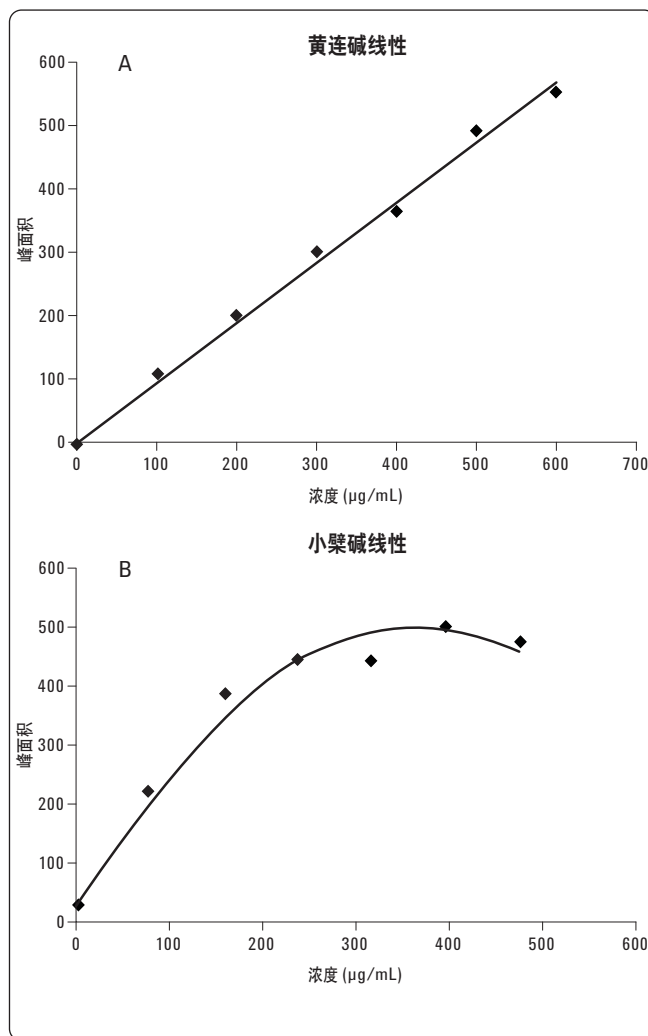


图7. 黄连碱(a)和小檗碱(b)在更高浓度下的线性

对市售样品的分析

本文的方法已成功地应用于 Willow 和 Solga 的金印草胶囊市售样品的分析。两种市售样品中均含有少量生物碱，定量结果如表 3 所示。

表 3. 市售样品中黄连碱和小檗碱的含量

	浓度 (µg/mL) 黄连碱	小檗碱
Willow	17	34
Solga	6	12

检测限和定量限

利用截距 y_B 和 3 倍的回归线标准偏差计算检测限，LOD 值则由式 1 和式 2 计算：

$$y_{LOD} = y_B + 3S_B \quad (\text{式 1})$$

$$LOD = (y_{LOD} - y_B)/m \quad m = \text{斜率} \quad (\text{式 2})$$

LOQ 用与式 1 和式 2 相同的方法计算，采用 10 倍的回归线标准偏差，并（式 3 和式 4）

$$y_{LOQ} = y_B + 10S_B \quad (\text{式 3})$$

$$LOQ = (y_{LOQ} - y_B)/m \quad (\text{式 4})$$

结果表明，黄连碱的检测限和定量限分别为 0.50 和 1.65 µg/mL，而小檗碱的检测限和定量限分别为 0.47 和 1.55 µg/mL。

结论

Agilent SampliQOPT 固相萃取小柱在传统中药—金印草中黄连碱和小檗碱的分离与分析应用中表现出良好的样品净化效果。结果表明，该方法重现性好、可靠性高、回收率高（黄连碱的回收率为 101%到 106%，小檗碱的回收率为 71%到 86%），RSD %小于 1%。黄连碱的检测限和定量限分别为 0.50 和 1.65 µg/mL，而小檗碱的检测限和定量限分别为 0.47 和 1.55 µg/mL。来自 Willow 的金印草样品含有 17 µg/mL 黄连碱和 35 µg/mL 小檗碱，而来自 Solga 的金印草样品含有 6 µg/mL 黄连碱和 12 µg/mL 小檗碱。

参考文献

1. P. N. Brown and M. C. Roman, *JAAC Int*, 91 (4) (2008), 694-701
2. M. Govindan and G. Govindan, *Fitoterapia*, 71 (2000), 232-235
3. L. Tong, Y. Liang, J. Song L. Xie, G. J. Wang, X. D. Lui, *J of Pharm Biomed Anal*, 40 (2006), 1218-1224.
4. L. Mmualefe, N. Torto, P. Huntsman-Mapila, B. Mbongwe, *Microchemical Journal* 91 (2009), 239-244.
5. L. F. C. Melo, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004), 51-58
6. M. S. Landis, *J. of Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007), 1029-1039
7. K. Bielicka-Daszkiwicz, A. Voelkel, M. Szejner and J. Osypiul, *Chemosphere*, 62 (2006) 890-898.
8. M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999), 3-54
9. F. Deng and S. W. Zito, *J of Chromatogr. A*, 986 (2003) 121-127
10. M. A. Alabdalla, *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 12 (2005) 310-315

更多信息

要获得我们产品和服务的更多的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技有限公司，2009
2009 年 10 月中国印刷
5990-4188CHCN



Agilent Technologies