文章编号:1000-5404(2009)22-2217-03

论著

核磁共振氢谱内标法测定盐酸小檗碱的含量

陈玉兰[1],陶凌晖[2],侯 华[2],张 艺[1],周向东[2],范昕建[1] ([1]成都中医药大学民族医药学院,成都 611137;[2]第三军医大学医学检验系暨药学院药物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 建立用内标法快速、专属、简单的测定盐酸小檗碱含量的核磁共振氢谱定量分析方法。**方法** 用Varian公司Mercury Plus 400 MHz核磁共振仪,在25 ℃下,以氘代甲醇为溶剂,2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT)为内标,观察在频率400.123 MHz、谱宽6 410.3 Hz、90°脉冲宽度6.450 μs、采集时间4 s和延迟时间18 s的条件下采集盐酸小檗碱试样的氢谱。**结果** 以化学位移分别在δ 6.13 ppm和δ 8.45 ppm盐酸小檗碱单峰和2,4-DNT的双二重峰作为定量峰,含量测定重复性实验的RSD为1.785%($n=6$),测得3批盐酸小檗碱含量分别为88.847 7%、88.380 3%、88.658 7%。**结论** 在没有对照品的情况下,核磁共振氢谱内标法可用于盐酸小檗碱的含量测定和质量控制。

关键词: 核磁共振氢谱定量分析;内标法;盐酸小檗碱
中图法分类号: R282.71;R914.3;R927.2 **文献标识码:** A

Quantitive determination of berberine hydrochloride by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy with internal standard method

CHEN Yu-lan[1], TAO Ling-hui[2], HOU Hua[2], ZHANG Yi[1], ZHOU Xiang-dong[2], FAN Xin-jian[1] ([1]Department of Ethnomedicine, Chengdu University of Chinese Traditional Medicine, Chengdu 611137; [2]Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a rapid, specific and simple method for the quantitive determination of berberine hydrochloride. Methods Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H-NMR) spectra were obtained in CD_3OD with a Varian Mercury Plus 400 MHz spectrometer at 25 ℃. For each sample, 64 scans were recorded with the following parameters: observing frequency (400.123 MHz), spectra width (6 410.3 Hz), 90° pulses width (6.450 μs), acquisition time (4 s) and delay time (18 s). Results The analysis of ^{1}H-NMR spectrum of berberine hydrochloride mixed with 2, 4-dinitrotoluene (2, 4-DNT) as internal standard in CD_3OD revealed that the integration of signals at δ6.13 ppm of berberine hydrochloride and δ8.45 ppm of 2, 4-DNT could be used for the quantitation. The precision RSD was 1.785% ($n=6$). The results of the contents were 88.847 7%、88.380 3% and 88.658 7%. Conclusion ^{1}H NMR can be used for the quantitative determination and quality control of berberine hydrochloride.

Key words: quantitive proton nuclear magnetic resonance spectroscopy; internal standard method; berberine hydrochloride

盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)又称盐酸黄连素,存在于小檗科等多种植物中,目前主要是从黄连、黄柏中提取。盐酸小檗碱能对抗病原微生物,常用来治疗细菌性胃肠炎、痢疾等消化道疾病[1]。现代药理学研究发现盐酸小檗碱具有显著的抗心力衰竭、抗心律失常、改善胰岛素抵抗等作用,因而在心血管系统和神经系统疾病以及Ⅱ型糖尿病方面将有广泛、重要的作用,日益受到重视。

目前盐酸小檗碱的含量测定主要是HPLC法[2,3]。2005版药典盐酸小檗碱项下采用的是滴定法[4]。HPLC法需要对照品,滴定法操作繁琐,而^{1}H-NMR定量分析已成为无需对照品的药物含量分析常见方法[5,6]。本研究采用核磁共振氢谱(^{1}H-NMR)内标法,

基金项目:"十一五"国家科技支撑计划(2007BAI40B05)
Supported by the "Eleventh Five-year Plan" National Key Technology R&D Program(2007BAI40B05)
作者简介:陈玉兰,女,四川省泸州市人,硕士研究生,主要从事中药化学成分及质量标准方面的研究。E-mail: cyqcyjcyl1@163.com
通信作者:张 艺,电话:(028)61800274,E-mail:9006zmy@sina.com
周向东,电话:(023)68753701,E-mail:zhouxd88@126.com
收稿日期:2009-03-24;**修回日期:**2009-05-10

建立无对照品的快速、专属、简单的盐酸小檗碱含量分析方法,为盐酸小檗碱原料药及其制剂的质量控制和质量标准的完善建立新的方法,为中药黄连的代谢组学研究建立方法学基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Mercury Plus 400MHz 高分辨核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司,第三军医大学 - 重庆化医集团控股公司联合实验室)。氘代甲醇(CD_3OD,D,99.8%,北京京云重轻科技有限公司),2,4-DNT(99.00%,Ardrich),3 批盐酸黄连素样品(编号为Ⅰ~Ⅲ,购自武汉鑫华远科技发展有限公司,含量为98.16%)。

1.2 实验条件

测定温度:25 ℃;环境湿度:35%;观察频率:400.123 MHz;谱宽:6410.3 Hz;90°脉冲宽度:6.450 μs;采集时间:4 s;脉冲延迟时间:18 s;累加次数:64。

1.3 实验方法

分别准确称取适量盐酸小檗碱和2,4-DNT置于直径5 mm核磁共振样品管中,加适量 CD_3OD 振荡溶解,制成待测试样溶液。在上述实验条件下调整仪器参数,调谐、控温、匀场、采样,得到^{1}H-NMR 谱。再进行相位和基线调整,对盐酸小檗碱和2,4-DNT 的定量峰分别进行5次积分,舍去最大值和最小值,取中间3次积分的平均值,得到积分结果。按^{1}H NMR 内标法,用以下公式计算样品的含量[5,6]。

$$W_s(\%) = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times m_r}{(A_r/n_r) \times M_r \times m_s} W_r \times 100\%$$

其中:A_s为被测样品定量峰的积分面积,n_s为被测样品定量峰包含的质子数,M_s为被测样品的分子质量,A_r为内标物质定量峰的积分面积,n_r为内标物质定量峰包含的质子数,Mr为内标物质的分子质量,m_r为称取的内标质量,W_r为内标的质量百分含量,m_s为样品质量。

2 结果

2.1 ^{1}H-NMR 内标法测定盐酸小檗碱含量方法的建立

2.1.1 溶剂的选择及盐酸小檗碱和2,4-DNT ^{1}H-NMR 谱图的归属 固体样品须配成溶液测试,合适的溶剂应粘度小,对样品溶解性能好,不与样品发生化学反应或缔合,其谱峰不与样品峰发生重叠。盐酸小檗碱不溶于水,能溶于乙醇,稍溶于乙醚、氯仿、苯等溶剂。由于 DMSO 粘度较大,且盐酸小檗碱在 CD_3OD 中溶解较好,因而选用 DMSO 和 CD_3OD 作溶剂。CD_3OD 空白实验的^{1}H -NMR 谱图,溶剂峰归属为 δ ppm:3.30(m, CD_3OD 峰),4.84(s, H_2O,HOD)。

将盐酸小檗碱溶于 CD_3OD 中所得^{1}H-NMR 谱见图1。^{1}H-NMR 谱图中,CD_3OD 各峰不与盐酸小檗碱各吸收峰重叠交叉,故溶剂选 CD_3OD。

盐酸小檗碱的^{1}H-NMR 谱峰归属为 δ ppm: 9.77 (1H, s, 8-H), 8.71 (1H, s, 13-H), 8.13 和8.11(1H, d, J=9.0 Hz, 11-H), 8.01 和7.98(1H,d, J=9.0 Hz,12-H), 7.64(1H,s,1-H),6.94 (1H, s, 4-H), 6.13(2H, s, -OCH_2O-), 4.92 (1H, t, J=6.0 Hz ,6-H), 4.20 (3H, s, 9-OCH_3), 4.11 (3H, s, 10-OCH_3), 3.25(1H, t, J=6.0 Hz, 5-H)。由此可见,CD_3OD 的溶剂峰不与盐酸小檗碱各峰重叠,不干扰其他质子的测定。

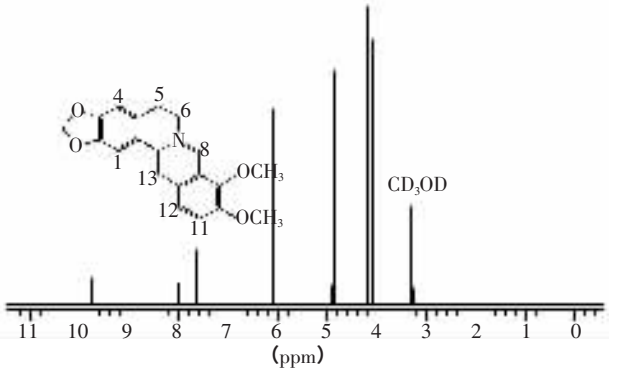


图1 盐酸小檗碱的^{1}H-NMR 谱图

2.1.2 内标和定量峰的选择 内标物质应具有较高纯度和准确含量,不与样品和溶剂发生化学反应或缔合,能溶于氘代溶剂,含有多个质子,具有易于识别的谱峰。实验中用 CD_3OD 做溶剂,选用2,4-DNT 为内标,其^{1}H-NMR 谱见图2。2,4-DNT 的谱峰归属为^{1}H-NMR(CD_3OD) δ ppm:8.79(1H, d, J=2.42 Hz, 3-H), 8.45 (1H, dd, J=2.42 Hz, J=8.51 Hz, 5-H), 7.84 (1H, d, J=8.51 Hz, 6-H), 2.69 (3H, s, CH_3)。

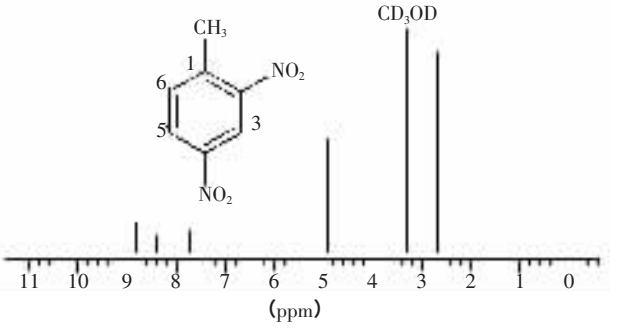


图2 2,4-DNT的^{1}H-NMR 谱图

分别准确称取盐酸小檗碱 3.17 mg 和2,4-DNT 1.28 mg 置于核磁样品管中,加入适量 CD_3OD 振荡溶解,制成待测试样。在核磁共振谱仪上测定,其^{1}H-NMR 谱见图3,溶剂峰、盐酸小檗碱峰和2,4-DNT 各峰不重叠交叉。

核磁共振定量分析的准确性与选作定量分析的特征峰质子的驰豫方式有很大关系。在确保所选择的内标定量峰与样品定量峰完全分离的前提下,选择驰豫方式相同的质子作为定量分析的特征峰,可保证单位质子峰积分面积的一致性。且在条件允许情况下,尽量不选择甲基峰作为定量的特征峰。由图3可知,盐酸小檗碱在 δ6.13 ppm 处有一 s 峰,2,4-DNT 在 δ8.45 ppm 处有一 dd 峰,且均无其他峰干扰。因此,以之作为盐酸小檗碱和2,4-DNT 的定量峰。

2.1.3 采集时间的选择 足够的采样时间(acquisitiontime, at)可以保证自由感应衰减(free induction decay, FID)信号能衰减完全,得到基底没有振荡的相应谱峰,从而提高分辨率。以不同的采集时间采集图谱,结果发现 at > 3.2 s,FID 衰减完全。因此,实验可选取 at = 4 s。

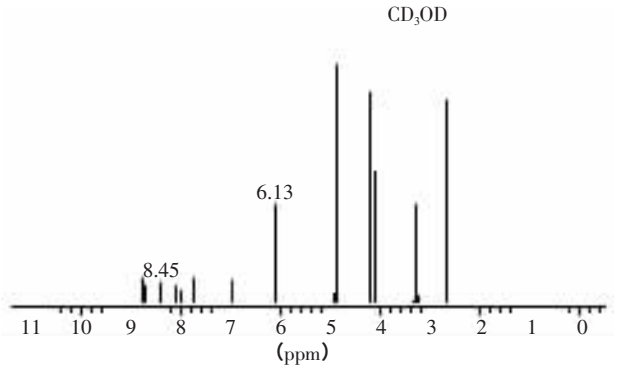


图 3　盐酸小檗碱与 2,4-DNT 的^{1}H-NMR 谱图

2.1.4　脉冲延迟时间的选择　　弛豫过程是核磁共振现象发生后得以保持的必要条件。因此,实验中应选取合适的脉冲延迟时间(delay time,d1),保证谱峰强度不会被饱和,这样才有利于对谱峰进行正确的积分,得到准确的结果。在实验中,按 d1 从短(2 s)到长(30 s)分别采样,然后对定量峰进行积分,在 18 s 之前,随着 d1 的增大,As/Ar 减小;在 d1≥18 s 后,As/Ar 没有明显的变化,因此实验选取 d1 = 18 s。

2.1.5　重复性实验　　按 1.3 的方法,称取盐酸小檗碱和 2,4-DNT 适量,在同一实验条件下连续做 5 个^{1}H-NMR 谱,并以盐酸小檗碱与 2,4-DNT 的定量峰面积比考察实验的重复性,RSD 为 1.78%。

2.2　定量结果

取 3 批盐酸小檗碱样品(编号为Ⅰ~Ⅲ),按 1.3 的方法,在同一实验条件下做^{1}H-NMR 图谱,按^{1}H-NMR 内标法计算Ⅰ~Ⅲ批样品中盐酸小檗碱的含量。3 批盐酸小檗碱含量平均值分别为 88.847 7%、88.380 3%、88.658 7%,结果见表 1。实验结果表明:以氘代甲醇为溶剂,2,4-DNT 为内标,溶剂峰和内标定量峰对盐酸小檗碱的定量峰没有干扰,专属性较好;盐酸小檗碱与 2,4-DNT 定量峰峰面积比对盐酸小檗碱与 2,4-DNT 质量比的重复性好。

表 1　3 批盐酸小檗碱样品含量测定结果

样品编号	取样量(mg)		峰面积比(%)	含量(%)	平均值(%)
	盐酸小檗碱	2,4-DNT			
1	5.77	2.91	1.743 9	88.873 3	88.847 7
	2.81	2.32	1.065 5	88.893 0	
	3.70	1.79	1.816 0	88.776 9	
2	2.80	1.92	1.278 7	88.454 5	88.380 3
	2.12	1.66	1.115 6	88.270 0	
	1.97	1.99	0.866 0	88.416 4	
3	2.37	1.45	1.435 3	88.735 0	88.658 7
	2.40	1.52	1.384 0	88.572 9	
	1.82	1.68	0.950 6	88.668 3	

3　讨论

在预实验中,用 HPLC 法以乙腈-磷酸二氢钾水溶液为流动相对盐酸小檗碱进行含量测定,算得含量为 98%,而核磁共振内标法测出的含量为 88% 左右,两者相差较大。盐酸小檗碱的分子式($C_{20}H_{18}ClNO_4 \cdot 2H_2O$)中两分子结晶水占分子量的 8.83%,且盐酸小檗碱易吸潮而吸收部分水份。由于样品中含有较多的水,HPLC 方法中的流动相与水混溶,HPLC 谱中无水峰出现,所以用面积归一化法测得的结果为不含水的量,因而测得的盐酸小檗碱的含量偏高,且 HPLC 方法实验操作繁琐。而^{1}H-NMR 方法称取样品的量为盐酸小檗碱、结晶水和吸收水份的总量,实验结果显示的是盐酸小檗碱的绝对含量,因而^{1}H-NMR 内标法直接测得的盐酸小檗碱含量更为准确、可靠,操作更为简单、快速。

按照中国药典 2005 版二部[4]盐酸小檗碱干燥失重项下,测得盐酸小檗碱的干燥失重为 9.004%(厂家质检报告中干燥失重为 11% 左右,购买后用乙醇重结晶)。文献报道,在样品处理过程中,盐酸小檗碱在 100 ℃烘烤后,由淡黄色变为黄棕色,易引起氧化变质[7]。我们在预实验中也发现,在 HPLC 图谱上可以看到 100 ℃烘后比烘前多了 2 个杂质峰。若用减压干燥进行干燥,除掉的是吸潮的水份,而盐酸小檗碱中的结晶水无法除掉。因此,我们在^{1}H-NMR 内标法直接测定盐酸小檗碱含量的研究中,没有进行 100 ℃的烘干处理,^{1}H-NMR 谱图较为清晰,无杂质峰出现。

综上,在控制原料药质量过程中,用核磁共振氢谱(^{1}H-NMR)定量分析方法测定盐酸小檗碱的含量,具有不需对照品、快速、专属、简单和直接测定绝对含量的特点,可用于盐酸小檗碱的原料药的质量监控和质量标准的完善建立的新方法,为中药黄连的代谢组学研究建立方法学基础。

(致谢:感谢第三军医大学医学检验系暨药学院徐长荣实验师对本实验提供的帮助。)

参考文献:

[1] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2006, 9(5): 469-470.

[2] 徐　颖, 周世文, 汤建林, 等. 反相高效液相色谱法测定黄连生药中盐酸小檗碱的含量[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 179-180.

[3] 裴明日, 姜　丽. HPLC 法测定乙肝解毒胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中医药杂志, 2008, 6(7): 6-8.

[4] 中国药典委员会. 中国药典 2005 版二部[M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 464-465.

[5] 蒋　文, 苏　敏, 陈双全, 等. 核磁共振氢谱内标法测定茚地普隆的含量[J]. 分析化学, 2008, 36(3): 385-388.

[6] 孙静霞, 张正行. NMR 在药物定量分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 117-122.

[7] 彭宗玢, 朱天明. 温度对盐酸小檗碱质量的影响[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(10): 583.

(编辑　张　维)