

# 高效毛细管电泳法测定育亨宾树皮中育亨宾的含量

李开俊<sup>1</sup>, 陈琴华<sup>1,2</sup>, 张卓<sup>2</sup>, 朱军<sup>1</sup>, 张晓川<sup>1</sup> (1. 郧阳医学院附属东风总医院, 湖北 十堰 442008; 2. 西安交通大学医学院, 西安 710061)

**摘要:**目的 建立高效毛细管电泳 (HPCE) 测定育亨宾树皮中育亨宾含量的方法。方法 运用高效毛细管电泳方法, 熔融石英毛细管 (75  $\mu\text{m}$  ID  $\times$  50 cm), 缓冲液为 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (PH = 3.0), 检测波长: 270 nm, 分离电压: 15 kV, 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后进样, 压力进样: 50 mbar  $\times$  5 s。结果 方法最低检测浓度为 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 线性范围 1 ~ 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $r = 0.9991$ , 线性关系良好。精密度的 RSD 为 1.3%, 回收率为 98.4%。结论 本法简单、灵敏经济, 可作为育亨宾树皮中育亨宾的含量的测定。

**关键词:** 高效毛细管电泳; 育亨宾; 育亨宾树皮

中图分类号: 284.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)05-0426-03

## Determination of the Concentration of Yohimbine in Corynanthe yohimbe K. Schum by High Performance Capillary Electrophoresis

LI Kai-jun<sup>1</sup>, CHEN Qin-hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhuo<sup>2</sup>, ZHU Jun<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-chuan<sup>1</sup> (1. Affiliated Dongfeng General Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442008, China; 2. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** A method for the determination of yohimbine in Corynanthe yohimbe K. Schum was established by high

作者简介: 李开俊, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0719) 8272217 E-mail: cqh77@163.com

performance capillary electrophoresis (HPCE). **METHODS** 20 mmol·L<sup>-1</sup> phosphate buffer saline (PH = 3.0) was used as running buffer UV detection was set at 270 nm, separation voltage was 15 kV, column temperature was 25 °C and pressure injection was 50 mbar×5 s. **RESULTS** The minimal quantitative concentration was 0.1 μg·mL<sup>-1</sup>. The concentration of yohimbine showed a linear plot in the range of 1~200 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9991$ ). The recovery was found to be 98.4%, The precision was 1.3%. **CONCLUSION** The results of the experiments demonstrated that the established method was simple, sensitive and economic. The method was suitable for the quality control of yohimbine.

**KEY WORDS** HPCE; Yohimbine; Rubiaceae Corynanthaceae Yohimbine

育亨宾 (Yohimbine) 是一种天然生物碱, 分子式为: C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 化学名为: (16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ )-17-Hydroxy-yohimban-16-Carboxylic acid methyl ester<sup>[1]</sup>. 该药可从茜草科植物育亨宾树 *Corynanthe yohimbe* K. Schum. 的树皮和夹竹桃科萝芙木属 *Rauwolfia* 植物的根中提取<sup>[2]</sup>. 育亨宾树产于非洲, 而我国不产, 萝芙木属我国产 12 种, 4 变种, 傣药“麻三端”为云南萝芙木 *Rauwolfia yunnanensis* T. Siang 的干燥根. 该药主要的药理作用是用于治疗男性功能障碍, 同时还具有清风湿、降肝火、消肿毒的功效. 云南傣族很早也有应用; 在贵州常作退热、镇痛和治蛇咬伤; 广西用于消炎、退热和治伤寒等<sup>[3]</sup>. 笔者采用高效毛细管电泳测定其含量, 具有高效、快速和分离效果好等优点<sup>[4]</sup>, 可以用来控制育亨宾树皮中育亨宾的含量.

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

HP<sup>3D</sup>CE G1600AX 高效毛细管电泳仪 (美国 Agilent 公司); pH S-2 型酸度计 (上海仪器厂); 超声波振荡仪 (AUTO SCIENCE 公司); BP221S 电子分析天平 (美国 Sartorius 公司); Maxima 超纯水机 (英国基因公司); 0.45 μm 微孔滤膜; 未涂层熔融石英毛细管柱 75 μm×50 cm, 有效长度 41.5 cm (河北永年光导纤维厂).

甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 磷酸二氢钠 (分析纯, 西安化学试剂厂); 冰醋酸 (分析纯, 西安化学试剂厂); 育亨宾 (sigma), 育亨宾树皮 (南非, 西安中药材公司进口, 经生药教研室牛晓峰教授鉴定).

### 1.2 电泳条件

检测波长为 270 nm; 电压为 +15 kV; 温度为 25 °C; 进样量为 50 mbar×5 s; 缓冲液为 20 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (pH = 3.0). 缓冲液使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤, 并用超声波脱气, 两次分析之间依次用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠, 超纯水冲洗 4 min 用缓冲液冲洗 5 min.

### 1.3 标准溶液的配制

精密称取育亨宾对照品 10.00 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇-水充分溶解并定容, 作为储备液, 再用标准储备液分别稀释配制 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列溶液.

### 1.4 样品的配制

精密称取育亨宾树皮 1 g 用 40 mL 甲醇超声 3 次, 抽滤, 浓缩, 浓缩液转移至 100 mL 量瓶中, 70% 甲醇-水定容, 进样前, 用 0.45 μm 的超滤膜过滤后并脱气.

## 2 结果

### 2.1 线性关系和最低检测限

取“标准溶液配制”中所配的育亨宾系列溶液, 0.45 μm 滤膜过滤后, 按“1.2”电泳条件进样. 记录色谱图, 育亨宾的峰面积 (Y), 以浓度 (X) 为横坐标, 育亨宾的峰面积为纵坐标进行回归, 得线性回归方程:  $Y = 2.03X + 0.27$ ,  $r = 0.9991$ . 结果表明, 育亨宾在 1~200 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好. 在信噪比 (S/N) 为 3 时, 测得最低检出限为 0.01 μg·mL<sup>-1</sup>, 对照品电泳图见图 1-A.

### 2.2 重复进样精密度、重复性和稳定性试验

取供试品连续进样 6 次, 计算育亨宾峰面积的 RSD 为 1.3%.

取同一批样品, 共 6 份, 分别按“1.4”项下制备供试品溶液, 进样测定, 计算育亨宾峰面积的 RSD 为 1.7%.

取供试品溶液分别于 0, 1, 2, 3, 4 h 进样测定, 计算育亨宾峰面积的 RSD 为 2.7%, 说明供试品在 4 h 内稳定.

### 2.3 回收率试验

取同一供试品 (10.5 μg·mL<sup>-1</sup>) 5 份各 500 μL, 分别加入育亨宾对照品 (10.0 μg·mL<sup>-1</sup>) 500 μL 混匀, 并按“1.2”项下色谱条件进样, 进行含量测定, 以测定值与真实值之差除以真实值, 计算回收率, 其回收率为 98.4%.

### 2.4 样品的测定

精密称取育亨宾树皮 1 g 共 3 份, 按“1.4”项下制备, 同时制备空白对照液, 按“1.2”电泳条件进样, 记录色谱图, 见图 1-B. 用外标法计算育亨宾样品的含量 (质量百分含量), 其含量分别为 1.05%, 1.12%, 1.19%, 即育亨宾树皮中育亨宾的平均含量为 1.12%.

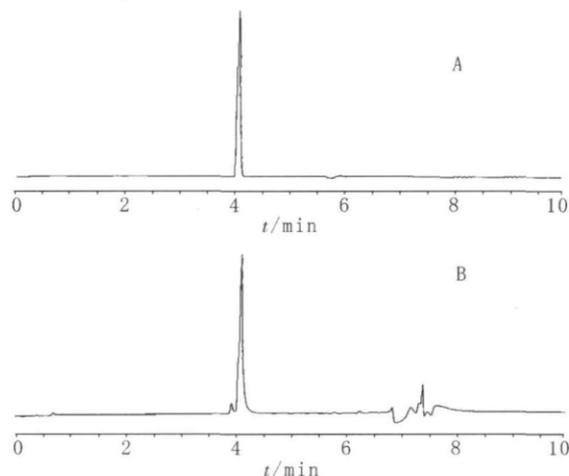


图 1 高效毛细管电泳图

A- 育亨宾对照品电泳图; B- 样品电泳图

Fig 1 Electropherogram

A- yohimbine B- sample solution

### 3 讨论

#### 3.1 缓冲溶液浓度对分离的影响

磷酸盐缓冲体系是毛细管电泳分析中最常用的缓冲体系之一,它的紫外吸收低,因而本实验也选用磷酸盐缓冲体系。缓冲溶液的浓度不仅影响毛细管内表面的 Zeta 电势,还影响溶液的黏度系数及分析物的扩散系数,最终影响分析物的分辨率和迁移时间<sup>[5]</sup>。改变磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) 的浓度使其依次为 10, 20, 30, 40 mmol·L<sup>-1</sup>, 结果发现当浓度大于 30 mmol·L<sup>-1</sup> 时,由于较大电流产生大量焦耳热和严重的噪声信号不利于检测限的提高,同时也明显的引起区带展宽;当浓度小于 20 mmol·L<sup>-1</sup> 时,迁移时间相对延长,综合考虑,选择 20 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钠溶液为缓冲溶液。

#### 3.2 缓冲液 pH 的选择

本实验测定的是一种生物碱,故选择了区带电泳,缓冲体系由缓冲试剂和 pH 值调节剂两部分组成,其中缓冲试剂的选择主要由所需的 pH 值决定,而 pH 值则依样品的性质和分离效率而定, pH 的选择是决定分离成败的一大关键。在分别考察 pH 为 2.5, 2.8, 3.0, 3.2, 3.5, 4.0 时,发现 pH 3.0 的理论塔板数高,分离时间短。

#### 3.3 运行电压的选择

本实验考察了 3 种分离电压 15, 17.5, 20 kV, 随着电压的加大,育亨宾的迁移时间均呈现缩短趋势,峰宽均减小。但是随着电压的增加,其产生的焦耳热也明显增大,当电压等于 20 kV 时,电流已经达到 200 mA 左右,这就必然使得分离的重复性大大降低,所以最后确定应用电压值为 15 kV。

#### 3.4 毛细管清洗条件的选择

临用前采用合适的预清洗好的毛细管是保证结果重复的一个必要条件。有关研究表明:为了减少预清洗时间,预清洗液的 pH 值与缓冲溶液的 pH 值间不应有较大的差异。

从节省预清洗时间方面考虑,只在每天开机后依次用 1 mol·L<sup>-1</sup> 和 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 分别清洗 4 min, 纯水冲洗 5 min, 背景缓冲液冲洗 5 min, 每次测定间省去 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 清洗之步骤,而仅用缓冲溶液清洗 5 min, 结果大大提高了迁移时间的精密度,峰面积的精密度也相应增加。运行 6 次样品后跟换缓冲液。

本实验利用 HPLC 分离效率高、分析速度快等特点对育亨宾树皮中育亨宾碱进行探讨,相比较 UV 和荧光更快,更方便,通过对其线性、精密度、重复性以及回收率的考察,为控制育亨宾树皮中育亨宾提供一种新的快速、简便方法。

### REFERENCES

- [1] ANNE J, FRANCK A D, TOMOMORI K, *et al*. The indole alkaloids brucine, yohimbine, and hypaphorine are indole-3-acetic acid-specific competitors which do not alter auxin transport[J]. *Physiol Plant*, 2004, 120, 503-508.
- [2] WANG Y, WANG Y F, REN G F. In Situ Identification of Thin-layer Chromatography- Fourier Transform Spectroscopy of Yohimbine in *Rauvolfia Verticillata* Bailin[J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2004, 4(1), 31-34.
- [3] BRIGITTE S K, MARKUS F, HANS U S. Temporary inactivation of the rostral perirhinal cortex induces an anxiolytic-like effect on the elevated plus-maze and on the yohimbine-enhanced startle response[J]. *Behav Brain Res*, 2005, 163, 168 - 173.
- [4] ZHAO Y, YANG X B, LI X H, *et al*. Monosaccharide composition analysis of pumpkin polysaccharides by capillary zone electrophoresis[J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学杂志)*, 2006, 23 (4), 323-326.

收稿日期: 2006-04-14