

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000102

HPLC-DAD法同时测定延胡索中 4 种生物碱的含量

周 卿¹, 尚京川²

(1. 遵义医学院药学院药物分析教研室, 遵义 563003; 2. 重庆医科大学药学院药物分析教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-diode array detection, HPLC-DAD), 建立同时测定延胡索药材中 4 种生物碱含量的方法, 并比较不同产地中 4 种生物碱含量的差异。**方法:**采用 Agilent Eclipse XDB-C18(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) 色谱柱, 以乙腈-0.05% 磷酸(pH 6.0) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 ml/min, 检测波长分别为巴马亭、紫堇碱 270 nm, 延胡索乙素和四氢小檗碱 280 nm。**结果:**巴马亭在 1~10 μ g/ml、紫堇碱在 10~100 μ g/ml、延胡索乙素在 5~30 μ g/ml, 四氢小檗碱在 1~10 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好, 高、中、低 3 种浓度平均加样回收率在 98.2%~101.3% 之间。**结论:**本方法操作简单、稳定、重复性好, 可用于同时测定延胡索中 4 种生物碱的含量。

【关键词】相色谱-二极管阵列检测器; 延胡索; 巴马亭; 紫堇碱; 延胡索乙素; 四氢小檗碱

【中图分类号】R284.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-23

Determination of four alkaloids in corydalis yanhusuo by HPLC-DAD

Zhou Qing¹, Shang Jingchuan²

(1. Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Zunyi Medical University; 2. Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) method for the simultaneous determination of four alkaloids in corydalis yanhusuo, and to compare the contents of four alkaloids at different production places. **Methods:** Angilent Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) was used as the analytical column. Acetonitrile-0.05% H₃PO₄ (pH 6.0) was used as the mobile phase with gradient elution and the flow rate was 1.0 ml/min. The detection wavelengths were 270 nm for palmatine and corydaline, 280 nm for tetrahydropalmatine and tetrahydroberberine respectively. **Results:** Palmatine, corydaline, tetrahydropalmatine and tetrahydroberberine have a good linear relation within ranges of 1~10 μ g/ml, 10~100 μ g/ml, 5~30 μ g/ml, 1~10 μ g/ml, respectively. Spiked recovery of high, middle and low concentration ranged from 98.2% to 101.3%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible and can be used to determine the above four alkaloids.

【Key words】high performance liquid chromatography-diode array detection; corydalis yanhusuo; palmatine; corydaline; tetrahydropalmatine; tetrahydroberberine

延胡索是罂粟科紫堇属多年生草本的干燥块茎, 其药材中主要活性成分为苕基异喹啉类生物碱, 研究表明其对中枢神经系统、心血管系统和消化系统等均有一定的治疗作用, 其药效主要表现为行气、活血、镇痛、镇静和催眠的作用^[1-4]。近来研究还显示延胡索中左旋延胡索乙素生物碱可治疗阿片类精神依赖^[5], 但其结构相近或相似的其它类生物碱是否有协同作用有待研究, 明确延胡索中所含生物碱的含量是继续研究的基础, 因此本实验研究采用高效液相色谱法测定延胡索中巴马亭、紫堇碱、

延胡索乙素和四氢小檗碱 4 种生物碱的含量, 并比较了各产地中 4 种生物碱含量的差异。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 全自动高效液相色谱仪(DAD 检测器)(美国安捷伦公司); BT125D 十万分之一电子天平(赛多利斯北京有限公司)。

巴马亭(批号 1212601, 含量 > 98%)、紫堇碱(批号 1205002, 含量 > 98%)、四氢小檗碱(批号 12022070, 含量 > 98%)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司, 延胡索乙素(批号 110726-200610)对照品购自中国药品生物制品检定所; 延胡索药材购自遵义中药饮片公司。经遵义医学院杨建文副教授鉴定为延胡索; 甲醇、三乙胺为分析纯, 乙腈(色谱纯, 迪马科

作者介绍: 周 卿, Email: zhouqing_zmc@sina.cn,

研究方向: 药物分析新技术的研究。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000102.html>

技术有限公司);重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

以 Agilent Eclipse XDB-C18(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm) 为色谱柱;流动相为 0.05% 磷酸水溶液(A)(用三乙胺调节 pH=6.0):乙腈(B),采用梯度洗脱:0 min 时 A-B(80:20),8 min 时 A-B(70:30),11 min 时 A-B(60:40),13 min 时 A-B(35:65),18 min 时 A-B(35:65),23 min 时 A-B(80:20);流速为 1 ml/min;检测波长:巴马亭和紫堇碱 270 nm,延胡索乙素和四氢小檗碱 280 nm;柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μl 。在该色谱条件下,巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱与相邻其他组分峰可完全分离,保留时间分别为 11.4、12.5、17.5、20.1 min,理论塔板数均不低于 3 000,色谱图见图 1。

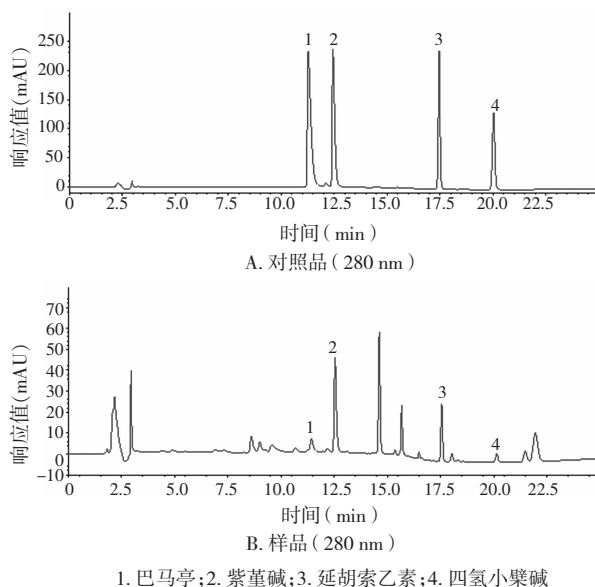


图 1 对照品与样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substance and sample

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱的对照品适量,精密称定,加甲醇溶解定容,制备浓度为 1.0 mg/ml 的巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱对照品溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,待用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取延胡索药材适量,粉碎,过 50 目筛,精密称定 1.0 g,置于圆底烧瓶中,加入 50 ml 浓氨试液-甲醇(1:20),称定质量,冷浸 1 h,加热回流 1 h,放冷,加甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 20 μl 进样分析。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项中所配各对照品溶液适量,用甲醇稀释,配制系列浓度的混合对照品溶液,在上述色谱条件下分别进样,记录色谱峰面积,以峰面积 Y 与对照品浓度 C 进行线性回归,结果见表 1。

表 1 各成分的线性范围及回归方程

Tab.1 Linear ranges and regression equation

成分	线性范围 ($\mu\text{g/ml}$)	线性方程	r值
巴马亭	1~10	$Y=27.50 \times C+4.94$	0.999 0
紫堇碱	10~100	$Y=29.89 \times C-103.61$	0.999 2
延胡索乙素	5~30	$Y=9.54 \times C-6.83$	0.999 1
四氢小檗碱	1~10	$Y=8.17 \times C-1.17$	0.999 1

2.4 精密度实验

配制含巴马亭 4 $\mu\text{g/ml}$ 、紫堇碱 40 $\mu\text{g/ml}$ 、延胡索乙素 15 $\mu\text{g/ml}$ 和四氢小檗碱 4 $\mu\text{g/ml}$ 的混合对照品溶液,分别于 1 d 内连续进样 6 次,6 d 内每天测定 1 次,以峰面积计算巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值,日内分别为 0.51%、0.37%、0.96%、0.94%,日间分别为 0.64%、0.52%、0.89%、1.14%,结果表明方法日间和日内精密度良好。

2.5 重复性实验

取同一批延胡索药材,按“2.2.2”项下制备供试品溶液 6 份,在上述色谱条件下进样,以样品含量计算巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱的 RSD 值分别为 1.74%、2.54%、2.20%、2.03%,结果表明方法的重复性良好。

2.6 稳定性实验

按“2.2.2”项下制备供试品溶液,室温下贮存,分别于 0、2、4、8、12、24 h 内测定样品含量,巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱的 RSD 分别为 0.85%、0.74%、1.24%、1.35%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率实验

称取已知含量的同一批延胡索药材 9 份,每份 0.50 g,分别精密加入巴马亭和四氢小檗碱对照品溶液适量;另取已知含量的同一批延胡索药材 9 份,每份 0.20 g,分别精密加入紫堇碱和延胡索乙素对照品溶液适量,以上溶液均按“2.2.2”项下方法样制成所需溶液,在上述色谱条件下进样分析,计算回收率,结果见表 2。

表 2 4 种生物碱加样回收率测定结果 (n=3)

Tab.2 Recoveries of four alkaloids (n=3)

成分	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	平均加样回收率 (%)	RSD (%)
巴马亭	61	73	101.3	1.76
		61	99.2	2.50
		49	98.9	2.62
		206	100.7	2.51
紫堇碱	171.5	171	99.1	2.37
		137	100.9	1.38
		205	100.9	1.07
		171	98.4	1.01
延胡索乙素	171.1	137	98.3	1.77
		173	100.9	2.53
		144	99.4	2.15
		115	100.4	1.48

表 3 样品含量测定结果 ($n=5$)Tab.3 Results of content determination of four alkaloids ($n=5$)

产地	巴马亭		紫堇碱		延胡索乙素		四氢小檗碱	
	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)
陕西	121.9	0.75	857.8	2.47	855.9	2.01	287.5	1.82
浙江	231.9	1.74	1709.2	2.54	689.1	2.20	181.6	2.03
四川	158.9	1.06	1052.3	1.87	512.6	2.13	132.5	2.12

2.8 样品含量测定

取不同产地延胡索药材,按“2.2.2”项下方法样制成供试品溶液,并在“2.1”项下色谱条件进样分析,按外标法计算延胡索药材中 4 种生物碱成分的含量。结果显示不同产地的延胡索中该 4 种生物碱的含量有明显的差异,提示可根据研究的需要选用不同产地的延胡索,结果见表 3。

3 讨 论

在样品的提取方法的选择中,参照文献方法^[6],比较了超声辅助提取,加热回流,索氏提取等不同方法,并比较了氨试液-甲醇、甲醇、氨试液-氯仿等不同提取溶剂的影响,结果显示采用超声辅助提取方法的提取率最小,加热回流与索氏提取的提取率无明显差异,故最终选择了采用浓氨试液-甲醇(1:20)作为提取剂,加热回流提取延胡索中 4 种生物碱。

在检测波长的选择中,取延胡索中 4 种生物碱对照品溶液在紫外下进行全波长扫描,4 种成分在 270 nm 下均有吸收,但延胡索乙素和四氢小檗碱在 280 nm 下的吸收较强,故选用 DAD,检测波长为 270、280 nm,可满足每个成分检测的需要。

色谱条件的选择比较了 Agilent ZORBAX SB-C18, XDB C18 色谱柱的分离效能,结果发现采用 SB-C18 色谱柱时,巴马亭和紫堇碱间的分离度较差,但采用 XDB C18 色谱柱后,巴马亭和紫堇碱得到完全分离。流动相的选择比较了醋酸与磷酸的分

离效果,选用醋酸时保留时间的重复性较选用磷酸时的差,推测可能是醋酸具有一定的挥发性,故选择磷酸作为流动相,并比较了不同浓度的磷酸,结果显示磷酸的浓度对分离的影响较小,故选择 0.05% 的磷酸(pH 6.0)作为流动相。

本实验建立了同时测定延胡索药材中巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱 4 种生物碱含量的高效液相色谱法,并比较了不同产地的延胡索药材中该 4 种生物碱的含量,方法操作简单,稳定,重复性好,在 20 min 内可完全检测出该 4 种成分,可用于延胡索药材中巴马亭、紫堇碱、延胡索乙素和四氢小檗碱的含量测定。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2010:130-131.
- [2] 王文蜀,肖 巍,喻 蓉.中药延胡索化学成分的研究[J].中央民族大学学报(自然科学版),2007,16(1):80-86.
- [3] 贺 凯,高建莉,赵光树.延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J].中草药,2007,38(12):1909-1913.
- [4] 王 红,田 明,王 森,等.延胡索现代药理及临床研究进展[J].中医药学报,2010,38(6):108-111.
- [5] 罗素元,郭 萍,钱 刚,等.延胡索水提物及左旋延胡索乙素抗吗啡条件性位置偏爱效应机制研究和效果比较[J].中国中药杂志,2012,37(22):3457-3461.
- [6] 林武霖,王如伟,孙柳燕.延胡索质量控制的研究进展[J].中草药,2011,42(2):409-412.

(责任编辑:关蕴良)

《中华医学教育探索杂志》在线投稿
网址: yxjyts.alljournals.ac.cn