

微乳液相色谱法测定夏天无中生物碱的含量

窦丽丽, 岳媛, 王新, 薛晖, 偶志红, 徐丹丹*

(山西医科大学药学院, 太原 030001)

[摘要] **目的:**建立微乳液相色谱同时测定夏天无中药根碱、巴马汀、小檗碱、延胡索乙素、原阿片碱含量的方法。**方法:**以微乳为流动相,通过对影响分离度和保留时间的因素进行考察,优化微乳组成体系,得到最佳的微乳体系组成为2% SDS-0.5% 正辛醇-4.0% 正丁醇-磷酸氢二钠(磷酸调pH至4.0)。选择Sinochrom ODS-BP色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温25℃,流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长280 nm。**结果:**在优化条件下,5种生物碱类成分在20 min内达到基线分离,分离度及峰形良好。其中,药根碱、巴马汀、小檗碱、延胡索乙素和原阿片碱分别在0.800 9~16.01, 0.800 9~16.01, 0.200 2~4.004, 8.013~160.3, 12.09~240.7 mg·L⁻¹线性关系良好,相关系数均>0.999 5,检出限(S/N=3)分别为0.201, 0.254, 0.053, 1.27, 1.05 mg·L⁻¹,平均加样回收率为97.34%~99.51%。**结论:**所建立的微乳液相色谱法简单、快速、准确,可用于夏天无中5种生物碱类成分的含量测定,为中药的质量控制提供了新选择。

[关键词] 微乳液相色谱; 夏天无; 药根碱; 巴马汀; 小檗碱; 延胡索乙素; 原阿片碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0064-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130064

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1537.021.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:37

Simultaneous Determination of Five Alkaloids in *Corydalis Decumbentis* Rhizoma by Microemulsion Liquid Chromatography

DOU Li-li, YUE Yuan, WANG Xin, XUE Hui, OU Zhi-hong, XU Dan-dan*

(College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the accurate and rapid method for determination of jatrorrhizine, palmatine, berberine, tetrahydropalmatine and protopine in *Corydalis Decumbentis* Rhizoma by microemulsion liquid chromatography (MELC). **Method:** The mobile phase was microemulsion that was optimized by inspecting the influence factors of separation and retention time. The optimized microemulsion was 2% sodium dodecyl sulfate-0.5% n-octyl alcohol-4% n-butanol-phosphate buffer (pH was adjusted by phosphoric acid to 4.0). Sinochrom ODS-BP Chromatography columns (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was selected, with the column temperature of 25℃. The contents of five alkaloids in *Corydalis Decumbentis* Rhizoma were determined simultaneously at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 280 nm. **Result:** Under the optimized conditions, baseline separation of five alkaloids was achieved in 20 min, and the resolution is well. The calibration curves of jatrorrhizine, palmatine, berberine, tetrahydropalmatine and protopine were linear in the ranges of 0.800 9-16.01, 0.800 9-16.01, 0.200 2-4.004, 8.013-160.3 and 12.09-240.7 mg·L⁻¹, respectively, with correlation coefficients of 0.999 5. Their limits of detection (LOD, S/N=3) were 0.201, 0.254, 0.053, 1.27 and 1.05 mg·L⁻¹, respectively. The spiked recoveries of three compounds ranged from 97.34% to 99.51%. **Conclusion:**

[收稿日期] 20131208(002)

[基金项目] 山西省科技厅社会发展项目(20120313016-4)

[第一作者] 窦丽丽, 硕士生, 从事药物分析、中药药效物质基础研究, Tel: 15653993289, E-mail: happy1128@126.com

[通讯作者] * 徐丹丹, 副教授, 硕士, 从事药物相互作用及机理研究, Tel: 13834045856, E-mail: 13834045856@163.com

The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the quality control of five alkaloids in *Corydalis Decumbentis Rhizoma*.

[Key words] microemulsion liquid chromatography (MELC); *Corydalis Decumbentis Rhizoma*; jatrorrhizine; palmatine; berberine; tetrahydropulmatine; protopine

夏天无具有活血通络、行气止痛、祛风除湿之功效,主要用于治疗中风半身不遂、跌仆损伤、肝阳头痛、风湿痹痛、关节拘挛等^[1]。其主要化学成分为生物碱类化合物,包括药根碱(jatrorrhizine)、巴马汀(palmatine)、小檗碱(berberine)、延胡索乙素(tetrahydropulmatine)、原阿片碱(protopine)等,被认为是具有活血通络功能的有效成分^[2],因此通过测定生物碱含量来控制药材及其制剂质量。目前夏天无及其制剂有效成分的分析方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、液质联用法等^[3-7],但由于夏天无有效成分复杂且极性差异很大,其分离条件采用常规的色谱法难以达到理想效果。微乳液相色谱(microemulsion liquid chromatography, MELC)是一种液相色谱新技术,与常规高效液相色谱(HPLC)相比,具有分离效率高和分离速度快的优点^[8-9],以其独特的分离选择性和广泛适用性受到了越来越多的关注。McEvoy等^[10]报道了用MELC方法测定栓剂中扑热息痛及相关杂质,所有样品只经过简单的溶解和稀释后进样,均得到准确重现的测定结果;Sherbiny等^[11]报道微乳液相色谱法同时测定氯雷他定和地氯雷他定,由于微乳体系对亲脂性和亲水性化合物均有较强的溶解能力,其适用于复杂混合物的分离;Walash等^[12]报道了用微乳液相色谱法测定生物体液中盐酸尼卡地平,所建方法满足FDA生物样品分析方法确证的要求。对于MELC的应用,主要涉及多组分化学药物的分离、药物制剂、以及生物样品的分析^[13-16],而用于中药成分的分析较少。本文采用MELC法测定夏天无中5种生物碱成分,通过对微乳溶液分离影响因素表面活性剂、助表面活性剂、油相的类型和浓度以及pH等进行全面优化,使药根碱、巴马汀、小檗碱、延胡索乙素和原阿片碱得到基线分离,为夏天无等中药的质量控制方法提供了新选择。

1 仪器与试剂

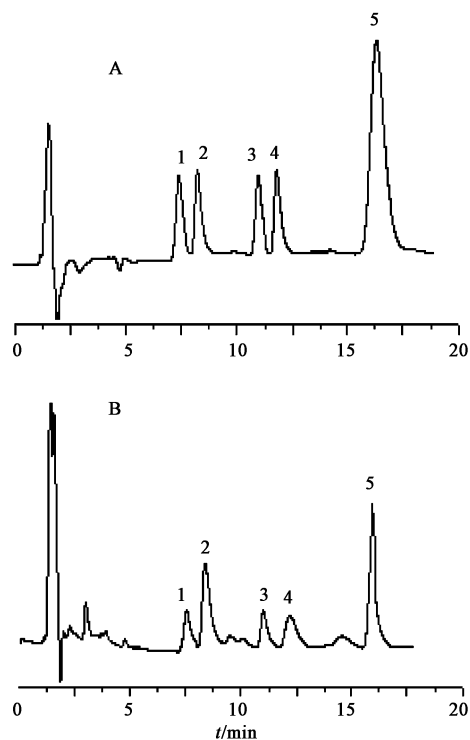
10A型高效液相色谱仪(LC-10ATVP泵、SPD-10AVP紫外检测器,日本SHIMADZU公司),FA1104N型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。

夏天无药材均购自当地药店,经本校生药学教研室高建平教授鉴定为罂粟科伏生紫堇 *Corydalis*

decumbens (Thunb.) Pers. 的干燥块茎;药根碱(批号Y-052-110315)、巴马汀(批号Z-013-110403)、小檗碱(批号110713-200401)、延胡索乙素(批号110726-201011)、原阿片碱(批号110853-200402)对照品均购自中国食品药品检定研究院,甲醇和乙醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Sinochrom ODS-BP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 2% (m:V) SDS-0.5% 正辛醇-4.0% 正丁醇-磷酸氢二钠(磷酸调 pH 至 4.0),流速 0.8 mL · min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 25 °C,进样量 20 μL。取对照品溶液、供试品溶液,在上述色谱条件下进样,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品;

1. 药根碱; 2. 巴马汀; 3. 小檗碱; 4. 延胡索乙素; 5. 原阿片碱

图 1 夏天无样品 HPLC

2.2 对照品储备液的制备 取药根碱、巴马汀、小檗碱、延胡索乙素、原阿片碱对照品 6.1, 6.0, 6.1, 7.6, 7.5 mg, 精密称定, 分别置 5 mL 量瓶中, 用甲醇

溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 1.22, 1.20, 1.22, 1.52, 1.50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药根碱、巴马汀、小檗碱、延胡索乙素、原阿片碱对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取干燥后的夏天无粉末约 0.25 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加适量 70% 乙醇冷浸 2 h,超声提取 45 min,冷却后用 70% 乙醇定容至刻度,微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 微乳流动相的制备 取 SDS 8 g,加适量水溶解,分别加入正丁醇 2 mL 与正辛醇 16 mL,搅拌至溶液澄清后,加水相定容至 400 mL,即得透明稳定的微乳溶液,磷酸调 pH 至 4.0,经 0.45 μm 有机膜

过滤后,超声 30 min,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系、检测限及定量限 分别取 2.2 项下对照品储备液 1.31, 1.33, 0.33, 10.5, 16.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀。精密量取 0.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10 mL 分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度对照品溶液。在 2.1 项下的色谱条件下进样测定,以平均峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,进行线性回归,得出夏天无中 5 种生物碱类成分的线性回归方程,见表 1。

表 1 夏天无中 5 种生物碱成分的线性关系、检测限及定量限

| 化合物 | 线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 线性方程 | r | LOD/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | LOQ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|-------|---------------------------------------|-------------------------|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 药根碱 | 0.800 9 ~ 16.01 | $Y = 22\ 550X + 1\ 800$ | 0.999 5 | 0.201 | 0.611 |
| 巴马汀 | 0.800 9 ~ 16.01 | $Y = 21\ 136X - 1\ 091$ | 0.999 6 | 0.254 | 0.676 |
| 小檗碱 | 0.200 2 ~ 4.004 | $Y = 34\ 232X - 1\ 538$ | 0.999 6 | 0.053 | 0.167 |
| 延胡索乙素 | 8.013 ~ 160.3 | $Y = 23\ 560X + 1\ 798$ | 0.999 5 | 1.27 | 3.89 |
| 原阿片碱 | 12.09 ~ 240.7 | $Y = 20\ 314X + 1\ 001$ | 0.999 6 | 1.05 | 3.05 |

2.5.2 精密度试验 日内精密度:取 2.2 项下的中浓度混合对照品溶液,在 2.1 项下的色谱条件下重复进样 6 次,记录峰面积,计算 RSD。

日间精密度 以中浓度混合对照品溶液重复进样 6 次,计算 RSD。日内精密度在 1 d 内测定,日间精密度试验 3 d 内测完。结果表明精密度良好,见表 2。

表 2 精密度、重复性、稳定性试验 %

| 化合物 | 精密度 RSD | | 重复性 | | 稳定性 |
|-------|---------|------|-------|------|------|
| | 日内 | 日间 | 含量 | RSD | RSD |
| 药根碱 | 0.66 | 2.07 | 0.013 | 0.46 | 1.52 |
| 巴马汀 | 0.85 | 1.21 | 0.140 | 1.64 | 1.76 |
| 小檗碱 | 0.69 | 1.32 | 0.004 | 0.88 | 0.88 |
| 延胡索乙素 | 0.52 | 0.76 | 0.143 | 0.35 | 0.62 |
| 原阿片碱 | 1.06 | 0.81 | 0.433 | 0.59 | 0.49 |

2.5.3 重复性试验 取夏天无样品,按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,依法进样测定。结果表明方法重复性良好,见表 2。

2.5.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放置,分别在 0, 8, 16, 24, 32, 48 h 测定峰面积,计算各成分的 RSD。结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定,见表 2。

2.5.5 回收率试验 分别取已知含量的夏天无药材粗粉 0.12 g,精密称定,精密加入高、中、低 3 个剂量的药根碱、巴马汀、小檗碱、延胡索乙素、原阿片碱

对照品,共 9 份,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,在 2.1 项下的色谱条件下进样分析,计算各成分的平均加样回收率和 RSD,结果见表 3。

表 3 夏天无中 6 种成分加样回收率试验

| 化合物 | 样品 中量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均 回收率 /% | RSD /% |
|-------|-----------------|------------|------------|-----------|-----------------|-----------|
| 药根碱 | 0.012 0 | 0.007 5 | 0.019 4 | 98.67 | 98.31 | 1.17 |
| | 0.011 5 | 0.012 0 | 0.023 2 | 97.50 | | |
| | 0.013 0 | 0.018 9 | 0.031 7 | 98.94 | | |
| 巴马汀 | 0.153 6 | 0.096 0 | 0.248 4 | 98.75 | 97.54 | 1.12 |
| | 0.144 0 | 0.150 0 | 0.289 7 | 97.13 | | |
| | 0.148 8 | 0.217 0 | 0.358 7 | 96.73 | | |
| 小檗碱 | 0.003 6 | 0.002 3 | 0.005 8 | 95.65 | 98.37 | 1.14 |
| | 0.003 7 | 0.003 9 | 0.007 5 | 97.44 | | |
| | 0.003 6 | 0.005 2 | 0.008 6 | 96.15 | | |
| 延胡索乙素 | 0.124 8 | 0.078 0 | 0.202 8 | 100.00 | 99.34 | 1.08 |
| | 0.134 4 | 0.140 0 | 0.274 2 | 99.86 | | |
| | 0.129 6 | 0.189 0 | 0.315 0 | 98.10 | | |
| 原阿片碱 | 0.374 4 | 0.234 0 | 0.609 3 | 100.38 | 99.52 | 1.06 |
| | 0.379 2 | 0.395 0 | 0.773 4 | 99.80 | | |
| | 0.374 4 | 0.546 0 | 0.911 4 | 98.35 | | |

2.6 样品测定 取 5 批不同产地的夏天无样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,通过回归方程计算所含生物碱含量,结果见表 4。

表4 不同产地夏天无中5种生物碱成分的含量测定($n=3$)

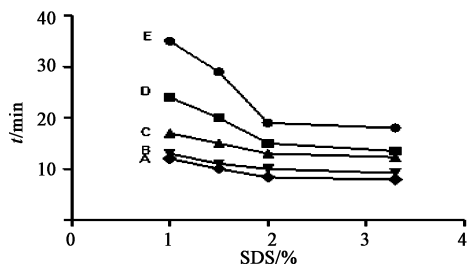
 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

| 产地 | 药根碱 | RSD/% | 巴马汀 | RSD/% | 小檗碱 | RSD/% | 延胡索乙素 | RSD/% | 原阿片碱 | RSD/% |
|----|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|
| 贵州 | 0.11 | 0.09 | 1.22 | 0.16 | 0.03 | 0.01 | 1.07 | 0.32 | 3.18 | 0.52 |
| 江苏 | 0.13 | 0.07 | 1.39 | 0.25 | 0.03 | 0.01 | 1.48 | 0.01 | 4.67 | 0.12 |
| 安徽 | 0.04 | 0.01 | 1.78 | 0.10 | 0.03 | 0.02 | 1.01 | 0.37 | 4.96 | 0.16 |
| 四川 | 0.12 | 0.07 | 1.37 | 0.31 | 0.04 | 0.02 | 1.29 | 0.73 | 4.79 | 0.16 |
| 江西 | 0.14 | 0.04 | 1.89 | 0.23 | 0.03 | 0.01 | 1.69 | 0.38 | 4.96 | 0.10 |

3 讨论

3.1 表面活性剂类型对分离的影响 文献^[17]报道,O/W型微乳流动相通常使用阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)或非离子型表面活性剂Brij35等。本实验考察了SDS,Brij35表面活性剂对5种生物碱成分的分离效果。结果表明,在流动相中加入SDS,可使5种药物在较短时间内达到基线分离,而加入Brij35,样品的分析时间较长,5种物质不能分开,故选择SDS作为表面活性剂。

3.2 表面活性剂浓度对分离的影响 在微乳稳定浓度范围内,考察SDS质量浓度(1.0%,1.5%,2.0%,3.3%)对分离选择性的影响,见图2。随着SDS浓度增加,5种成分的保留时间相应缩短。当SDS质量浓度达到2%时,保留时间基本不发生变化,故确定SDS质量浓度为2%。



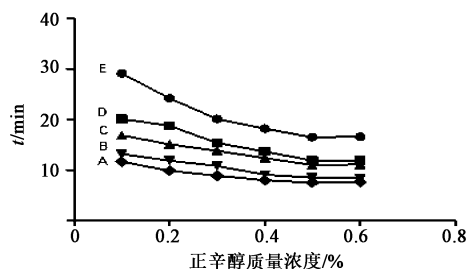
A. 药根碱;B. 巴马汀;C. 小檗碱;D. 延胡索乙素;E. 原阿片碱

图2 SDS质量浓度对成分分离的影响

3.3 助表面活性剂的类型及浓度对分离的影响 助表面活性剂一般为短链醇,常用的有丙醇、丁醇、戊醇和丙二醇等。本实验采用正戊醇作为助表面活性剂时,在质量浓度2.0%~7.0%5种成分均未达到较好的分离,而且质量浓度越高,分离度越差。采用正丁醇作为助表面活性剂时,分离情况良好。当正丁醇浓度在2.0%~7.0%变化时,随着正丁醇浓度的增加,保留时间相应缩短,综合考虑组分分离度和保留时间,选择4.0%正丁醇。

3.4 油相类型及浓度对分离的影响 在微乳稳定浓度范围内,调节正辛醇浓度,考察其浓度分别为

0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%及0.6%时对各组分保留时间的影响,结果见图3。随着正辛醇浓度增加,5种成分的保留时间相应缩短。当正辛醇浓度达到0.5%时,保留时间基本不发生变化,故确定正辛醇浓度为0.5%。



A. 药根碱;B. 巴马汀;C. 小檗碱;D. 延胡索乙素;E. 原阿片碱

图3 正辛醇质量浓度对成分分离的影响

3.5 pH对分离的影响 调节流动相pH在2.5~7.0发现,改变pH,主要是影响组分的保留时间和峰形。随着pH减小,保留时间相应缩短。当pH为4.0时,5种组分可以完全分开,无峰拖尾现象。

本文对微乳流动相中表面活性剂、助表面活性剂、油相种类及其浓度,pH进行了全面考察,探讨了应用微乳液相色谱法同时测定中药多组分的可行性及优越性,同时测定夏天无药材中5种生物碱类成分含量。在优化条件下,5种生物碱类成分在20min内达到基线分离,分离度和峰形都很好,并测定不同产地夏天无中生物碱的含量。实验发现不同产地夏天无中生物碱的含量有差异,可能由于气候、种植条件、加工工艺或炮制等原因所导致,但其平均含量均较高。结果表明,采用微乳流动相可以分离成分复杂、性质相近的中药中多种成分,而且有机溶剂用量少,毒性低,相对的费用和污染较少,该方法准确、快速、重复性好,为中药的质量控制提供了新选择。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

- 京:中国医药科技出版社,2010:173.
- [2] 曾文亮,张玲,尚立霞.夏天无化学成分的研究[J]. 中草药,2005,36(5):665.
- [3] 罗跃华,熊蔚,许妍,等.薄层扫描法测定夏天无中原阿片碱的含量[J]. 中草药,2000,31(9):669.
- [4] 沈燕,韩超,夏碧琪,等.高效液相色谱法测定夏天无中4种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2110.
- [5] 龙项,胡还甫.高效液相色谱法测定不同产地夏天无药材中5种生物碱的含量[J]. 中国医院药学杂志,2013,36(15):1.
- [6] Shen Y, Han C, Jiang Y et al. Rapid quantification of four major bioactive alkaloids in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. by pressurised liquid extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2011, 84(4):1026.
- [7] 姜舜尧,宋景政,周明昊,等.高效毛细管电泳测定夏天无药材中延胡索乙素的含量[J]. 中国药学杂志,2000,35(5):336.
- [8] 张守尧,姚育法.微乳液相色谱法及其研究进展[J]. 中国药师,2009,12(7):884.
- [9] 刘建芳,孙进,何仲贵.微乳液相色谱法及其应用进展[J]. 分析化学,2007,35(10):1529.
- [10] E. McEvoy, S Donegan, J Power, et al. Application of MELC and MEEKC for the analysis of paracetamol and related impurities in suppositories [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(1/2):49.
- [11] D T El-Sherbiny, N El-Enany, F F Belal, et al. Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with a microemulsion as eluent [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(4):1236.
- [12] M Walash, F Belal, N El-enany, et al. Microemulsion liquid chromatographic determination of nicardipine hydrochloride in pharmaceutical preparations and biological fluids. application to stability studies [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2007, 30(5/8):1015.
- [13] 江洁,杨若因,任晶波,等.微乳液相色谱法同时测定氨酚曲麻片中5种成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(6):456.
- [14] M S Althanyan, K H Assi, B J Clark, et al. Microemulsion high performance liquid chromatography (MELC) method for the determination of terbutaline in pharmaceutical preparation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(3):397.
- [15] 李宁,侯璇珠,杨雯,等.水包油型微乳液相色谱分离激素类药物的影响因素[J]. 色谱,2009,27(3):323.
- [16] 吴婵娟,黄碎锦,杨科,等.微乳液相色谱法测定地喹氯铵喷雾剂中地喹氯铵的含量[J]. 广东药学院学报,2010,26(1):51.
- [17] 刘朝亮,程轩轩.微乳色谱在药物分析中的应用[J]. 中药材,2010,33(1):143.

[责任编辑 顾雪竹]