

· 化学与分析 ·

延胡索中生物碱类成分的质量控制

杨敏^{1,2}, 李春², 冯伟红², 张永欣², 林丽美³, 陈安家^{1*}, 杨立新^{2*}

(1. 山西医科大学, 太原 030001; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;
3. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 同步测定延胡索中 11 种生物碱成分的方法, 为该药材的质量控制提供参考。方法: Kromasil Eternity C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(每 1 L 溶液中加冰乙酸 0.5 mL)(B) 梯度洗脱(0~50 min, 20%~55% A; 50~55 min, 55%~65% A; 55~60 min, 65% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL。结果: 11 种待测成分的线性关系良好, 相关系数均 > 0.999; 精密度试验 RSD 0.1%~2.0%, 稳定性试验 RSD 0.2%~2.1%, 重复性试验 RSD 1.7%~4.1%, 平均加样回收率 98.2%~100.8% (RSD 1.6%~3.5%), 均符合中药质量分析要求。结论: 建立的 RP-HPLC 灵敏、简便、可靠, 可用于延胡索药材中多种生物碱成分的同步测定。

[关键词] 延胡索; 生物碱; 原阿片碱; 四氢非洲防己胺; 脱氢紫堇碱; 四氢黄连碱; 海罂粟碱

[中图分类号] R284.1; R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)06-0022-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060022

Simultaneous Determination of Eleven Major Alkaloids in Corydalis Rhizoma by RP-HPLC

YANG Min^{1,2}, LI Chun², FENG Wei-hong², ZHANG Yong-xin²,
LIN Li-mei³, CHEN An-jia^{1*}, YANG Li-xin^{2*}

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** An efficient method using RP-HPLC was developed for simultaneous determination of eleven major active alkaloids in Corydalis Rhizoma. **Method:** Chromatographic separation was achieved on a Kromasil Eternity C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient mobile phase of acetonitrile-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution (added 0.5 mL of glacial acetic acid per 1 L) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength was set at 280 nm and column temperature was at 25 °C. **Result:** Eleven major alkaloids showed a good linearity with $r > 0.999$ and good precision (RSD of 0.1%-2.0%), stability (RSD of 0.2%-2.1%), repeatability (RSD of 1.7%-4.1%); average recovery was 98.2%-100.8% with RSD of 1.6%-3.5%. **Conclusion:** This established method is sensitive, convenient and reliable for determining eleven major components in Corydalis Rhizoma.

[Key words] Corydalis Rhizoma; alkaloids; protopine; tetrahydrocolumbamine; dehydrocorydaline; tetrahydrocoptisine; glaucine

[收稿日期] 20151223(005)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(201407003);北京市自然科学基金项目(7132152)

[第一作者] 杨敏, 在读硕士, 从事药物分析学研究, Tel:13691537484, E-mail: yangmin7836@163.com

[通讯作者] * 陈安家, 博士, 教授, 从事药物分析学研究, Tel:15835108120, E-mail: chenanjia888@163.com;

* 杨立新, 副研究员, 从事中药分析研究, Tel:010-64021008, E-mail: ayblcx@126.com

延胡索具有活血、行气、止痛作用,用于治疗胸胁、脘腹疼痛,胸痹心痛,经闭痛经,产后瘀阻,跌扑肿痛^[1]。其道地产区为浙江,与白术、芍药、贝母等并称为“浙八味”。但是,受工业发展和其他经济作物冲击,浙江磐安等主产区的种植面积逐渐萎缩,现在国内基本形成浙江磐安和陕西城固为中心的两大生产区。随着延胡索种植区域的变化和扩大,以及其产量的不断增加,市场对延胡索药材的质量控制提出了更高要求。

延胡索中主要活性成分为生物碱类,按结构类型可以分为叔胺和季胺型生物碱 2 类,至今已从中分离鉴定了 46 种生物碱类化合物^[2-3]。2015 年版《中国药典》中仅规定了延胡索乙素含量不得低于 0.05%。有报道采用 RP-HPLC, HPLC-MS 等技术对延胡索中多个生物碱类成分进行同步测定^[4-7],但这些研究有的只关注了延胡索中的季胺型生物碱而忽略了其中的叔胺型生物碱成分^[3];有的虽然同时关注了延胡索中的这两大类成分,但流动相梯度变化过细,实验重复性较差。本实验采用 RP-HPLC 同步测定延胡索中 11 个主要生物碱类(7 个叔胺类和 4 个季胺类)成分的含量,为延胡索药材质量控制水平的提升提供方法依据。

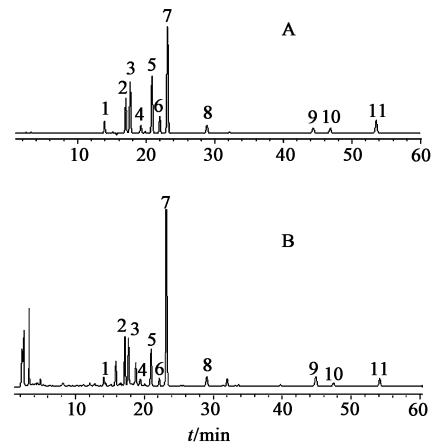
1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(LC-20AT 型溶液传输单元, SIL-20A 型自动进样器, SPD-M20A 型二极管阵列检测器, Labsolutions 色谱工作站, 日本岛津公司), XS105 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。原阿片碱、盐酸黄连碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为 Y-050-131227, Y-024-131109, S-118-130815, H-015-130803, 0713-9906, T-033-131010, y-005-131216, Y-158-130706, s-113-130926, T-040-131010), 海罂粟碱对照品(自制,经 HPLC 面积归一化法测定,纯度 > 98%)。甲醇、乙腈为色谱纯,水为屈臣氏纯净水,其他试剂均为分析纯。14 批延胡索药材购自不同药材市场或产地,经中国中医科学院中药资源中心金艳助理研究员鉴定为延胡索 *Corydalis yanhusuo* 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil Eternity C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(每 1 L 溶液中加冰乙酸 0.5 mL)(B)梯

度洗脱(0 ~ 50 min, 20% ~ 55% A; 50 ~ 55 min, 55% ~ 65% A; 55 ~ 60 min, 65% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 原阿片碱; 2. 盐酸黄连碱; 3. 海罂粟碱; 4. 四氢非洲防己胺; 5. 盐酸巴马汀; 6. 盐酸小檗碱; 7. 脱氢紫堇碱; 8. 延胡索乙素; 9. 延胡索甲素; 10. 四氢黄连碱; 11. 脱氢海罂粟碱

图 1 延胡索 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Corydalis Rhizoma*

2.2 供试品溶液的制备 精密称取延胡索药材粉末(过 3 号筛)约 1.0 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入浓氨试液-甲醇(1:20)混合液 20 mL, 称定, 置水浴锅中加热回流 1 h, 取出, 放冷, 加浓氨试液-甲醇(1:20)混合液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取原阿片碱、盐酸黄连碱、海罂粟碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱对照品适量, 置棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 0.238, 0.510, 0.238, 0.580, 0.293, 0.101, 1.865, 0.273, 0.248, 0.212, 0.204 g·L⁻¹ 的混合对照品储备液。分别精密吸取该储备液 20, 50, 100, 150, 200, 250 μL 置 1 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.3 项下系列混合对照品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 用最小二乘法进行线性回归, 得各成分的回归方程及线性范围, 见表 1。

2.5 定量限考察 将 2.3 项下混合对照品溶液逐级稀释, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算信噪比(S/N), 将 S/N = 10 的对照品溶液中各成分的量确定为定量限, 结果见表 1。

2.6 精密度试验 取同一份延胡索(14 号)供试品

表 1 延胡索中 11 种生物碱类成分的线性关系、线性范围和定量限

Table 1 Linear regressions and limits of quantification of eleven alkaloids in *Corydalis Rhizoma*

成分	回归方程	r	线性范围/ μg	定量限/ ng
原阿片碱	$Y = 1.00 \times 10^6 X - 1.26 \times 10^2$	0.999 9	0.047 6 ~ 0.595	21.0
盐酸黄连碱	$Y = 1.38 \times 10^6 X - 1.64 \times 10^4$	0.999 4	0.102 ~ 1.280	10.7
海罂粟碱	$Y = 5.08 \times 10^6 X - 1.22 \times 10^3$	0.999 9	0.047 6 ~ 0.595	11.2
四氢非洲防己胺	$Y = 3.44 \times 10^5 X - 48.10$	0.999 9	0.116 ~ 1.450	20.6
盐酸巴马汀	$Y = 3.94 \times 10^6 X - 1.06 \times 10^2$	0.999 9	0.058 6 ~ 0.733	10.7
盐酸小檗碱	$Y = 3.47 \times 10^6 X - 3.59 \times 10^2$	0.999 9	0.020 2 ~ 0.253	20.6
脱氢紫堇碱	$Y = 1.17 \times 10^6 X - 1.39 \times 10^3$	0.999 9	0.373 ~ 4.660	10.4
延胡索乙素	$Y = 8.41 \times 10^5 X - 1.67 \times 10^3$	0.999 9	0.054 6 ~ 0.683	21.4
延胡索甲素	$Y = 7.25 \times 10^5 X - 5.63 \times 10^2$	0.999 9	0.049 6 ~ 0.620	20.0
四氢黄连碱	$Y = 7.97 \times 10^5 X - 7.17 \times 10^2$	0.999 9	0.042 4 ~ 0.530	20.8
脱氢海罂粟碱	$Y = 1.99 \times 10^6 X - 8.16 \times 10^2$	0.999 9	0.040 8 ~ 0.510	8.5

溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算原阿片碱、盐酸黄连碱、海罂粟碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.3%, 2.0%, 0.1%, 0.3%, 0.1%, 0.2%, 1.2%, 0.2%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一份延胡索(14 号)供试品溶液,分别于制备后 0,1,2,4,6,8,24 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果原阿片碱、盐酸黄连碱、海罂粟碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.2%, 0.9%, 2.1%, 0.2%, 0.2%, 0.2%, 0.3%, 1.2%, 0.3% 和 1.8%, 表明 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.8 重复性试验 取同一批延胡索(14 号)样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件测定,计算原阿片碱、盐酸黄连碱、海罂粟碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱平均质量分数分别为 0.032%, 0.131%, 0.037%, 0.094%, 0.035%, 0.008%, 0.574%, 0.058%, 0.088%, 0.027%, 0.022%; RSD 分别为 4.1%, 2.5%, 3.5%, 2.2%, 2.1%, 1.9%, 2.1%, 2.3%, 2.6%, 1.7%, 3.3%, 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收试验 分别精密称取原阿片碱、盐酸黄连碱、海罂粟碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐

酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱对照品 1.9, 9.4, 2.4, 5.7, 2.2, 0.5, 32.0, 3.2, 5.0, 1.7, 1.2 mg, 置于 250 mL 棕色量瓶中,加入浓氨试液-甲醇(1:20)混合液溶解并定容至刻度,摇匀,备用。精密称取已知含量的延胡索药材(14 号)粉末约 0.5 g,分别按指标成分与对照品质量比近 1:1 的比例加入上述混合对照品溶液 20 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下条件测定,计算原阿片碱、盐酸黄连碱、海罂粟碱、四氢非洲防己胺、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素、四氢黄连碱、脱氢海罂粟碱的平均加样回收率分别为 98.2%, 100.8%, 100.8%, 100.3%, 99.4%, 99.1%, 98.6%, 100.1%, 99.2%, 100.6%, 100.3%, RSD 分别为 1.9%, 3.0%, 3.5%, 1.8%, 1.6%, 2.0%, 2.5%, 1.8%, 3.1%, 3.2% 和 3.5%, 表明该方法准确度良好。

2.10 样品测定 取不同来源的延胡索样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下条件测定,计算各样品中指标成分的含量,结果见表 2。

3 讨论

预试验比较了乙腈-0.1% 冰乙酸,乙腈-0.2% 甲酸,乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵 3 种流动相系统,结果显示乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液梯度洗脱时 11 个生物碱类成分的分离度最好。考察不同流动相乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(pH 分别为 6.0, 5.8, 5.6, 5.4),不同柱温(20, 25, 30, 35, 40 °C)和不同色谱柱(Capcell PAK C₁₈, Tskgel ODS-100V, Thermo

表 2 14 批延胡索药材中 11 种生物碱类成分的含量测定

Table 2 Contents of eleven alkaloids in fourteen batches of *Corydalis Rhizoma*

批次	来源	原阿片碱	盐酸 黄连碱	海罂粟碱	四氢非洲 防己胺	盐酸 巴马汀	盐酸 小檗碱	脱氢 紫堇碱	延胡索 乙素	延胡索 甲素	四氢 黄连碱	脱氢海 罂粟碱
1	亳州	0.039	0.078	0.031	0.022	0.033	0.005	0.106	0.092	0.164	0.042	0.013
2	亳州	0.043	0.102	0.037	0.092	0.020	0.012	0.255	0.073	0.066	0.019	0.013
3	亳州	0.027	0.057	0.022	0.038	0.019	0.006	0.156	0.059	0.104	0.020	0.006
4	亳州	0.028	0.048	0.021	0.063	0.012	0.008	0.201	0.041	0.060	0.014	0.006
5	亳州	0.046	0.103	0.035	0.064	0.018	0.008	0.210	0.080	0.110	0.027	0.009
6	长沙	0.033	0.078	0.039	0.024	0.029	0.005	0.107	0.094	0.192	0.037	0.001
7	成都	0.043	0.128	0.047	0.061	0.023	0.011	0.189	0.078	0.064	0.023	0.006
8	昆明	0.041	0.059	0.019	0.083	0.039	0.014	0.176	0.067	0.086	0.183	0.014
9	西安	0.036	0.070	0.025	0.099	0.019	0.009	0.117	0.107	0.195	0.043	0.007
10	咸阳	0.036	0.067	0.034	0.096	0.018	0.008	0.113	0.101	0.195	0.044	0.008
11	汉中	0.031	0.061	0.032	0.096	0.016	0.008	0.108	0.094	0.179	0.040	0.008
12	杭州	0.039	0.051	0.028	0.095	0.021	0.009	0.149	0.090	0.137	0.035	0.007
13	金华	0.054	0.065	0.040	0.124	0.028	0.011	0.192	0.117	0.171	0.044	0.008
14	安国	0.032	0.131	0.037	0.094	0.035	0.008	0.574	0.058	0.088	0.027	0.022

synchronis C₁₈, Kromasil Eternity C₁₈) 下生物碱类成分的分度, 结果发现随 pH 减小, 盐酸黄连碱和海罂粟碱的色谱峰合二为一, 四氢非洲防己胺的色谱峰前移, 优选 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液的 pH 5.8; 随柱温升高, 四氢非洲防己胺色谱峰后移, 而延胡索甲素与四氢黄连碱的色谱峰合并, 优选柱温 25 °C; 除 Kromasil Eternity C₁₈ 色谱柱外, 其他 3 个品牌的色谱柱均不能使 11 个生物碱全部实现基线分离。

海罂粟碱和脱氢海罂粟碱均具有明确的抗炎镇痛作用, 是延胡索药材发挥镇痛作用的重要物质基础, 但因为对照品制备有很大难度, 因此至今为止尚未见到延胡索中这 2 种成分的含量测定研究, 本文建立了这 2 种成分的 HPLC 含量测定方法, 为延胡索药材的质量控制、体内代谢等研究提供了方法依据。延胡索中生物碱类成分结构极其相似, 彼此之间的分离度受柱温、流动相 pH 和梯度变化的影响很大, 虽然有很多文献报道了延胡索中生物碱成分的 HPLC 分析, 但由于流动相梯度变化过细, 且流动相 pH 未固定等原因, 往往难以重复出来。本文通过细致的方法学研究, 固定了色谱柱、流动相 pH 和柱温, 而且流动相梯度变化范围较大, 建立的方法重复性良好, 可广泛用于延胡索药材、饮片及相关制剂的含量测定。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 139-140.

[2] 杨鑫宝, 杨秀伟, 刘建勋. 延胡索物质基础研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 20-27.

[3] 冯静, 于宗渊, 杨洪军, 等. 延胡索中生物碱成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 124-127.

[4] Cheng X Y, Shi Y, Zhen S L, et al. HPLC-MS analysis of ethanol extract of *Corydalis yanhusuo* and simultaneous determination of eight protoberberine quaternary alkaloids by HPLC-DAD[J]. J Chromatogr Sci, 2010, 48(6): 441-444.

[5] Ding B, Zhou T G, Hong Z, et al. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD[J]. J Pharmaceut Biomed, 2007, 45(2): 219-226.

[6] Li K T, Xing D M, Jin W, et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of the medicinal extract of *Corydalis yanhusuo* by HPLC-UV and HPLC-MS methods[J]. Asian J Chem, 2011, 23(2): 723-728.

[7] Wu H W, Waldbauer K, Tang L Y, et al. Influence of vinegar and wine processing on the alkaloid content and composition of the traditional Chinese medicine *Corydalis Rhizoma* (*Yanhusuo*) [J]. Molecules, 2014, 19(8): 11487-11504.

[责任编辑 刘德文]