

HPLC 同时测定苦地丁中 6 种生物碱的含量

郑建芳¹, 荆云², 秦民坚^{3*}

(1. 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003;
3. 中国药科大学中药资源研究室, 南京 210009)

[摘要] 目的: 建立同时测定苦地丁中 6 种生物碱成分的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液-甲醇为流动相梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 289 nm, 柱温为室温。结果: 6 种生物碱在一定范围内线性关系良好($r > 0.999$), 平均回收率为 98.26% ~ 102.10%, RSD 均 < 3.0%。结论: 该方法可以同时测定苦地丁中 6 种生物碱的含量, 为苦地丁的质量评价提供参考。

[关键词] 苦地丁; 生物碱; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0121-04

Simultaneous Determination of Six Alkaloids in *Corydalis bungeana* by HPLC

ZHENG Jian-fang¹, JING Yun², QIN Min-jian^{3*}

(1. Sanquan Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 3. Department of Resources Science of Traditional Chinese Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the simultaneous determination of six alkaloids (dehydrocheilanthifoline, protopine, corynoline, acetylcorynoline, oxysanguinarine, dihydrosanguinarine) in *Corydalis bungeana*. **Method:** The chromatographic separation was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at room temperature with the 0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄-methanol as the mobile phase in gradient elution. The detection wavelength was set at 289 nm and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **Result:** All the compounds were linear ($r > 0.999$) in the range of the test concentrations, and the average recovery of the method was between 98.26% and 102.10%, RSD < 3.0%. **Conclusion:** The method established by this paper can be used to determine six alkaloid components in *C. bungeana* simultaneously, and provides a scientific basis for the quality evaluation of *C. bungeana*.

[Key words] *Corydalis bungeana*; alkaloids; content determination; HPLC

苦地丁为罂粟科紫堇属植物紫堇的干燥带根全草, 具有清热解毒、活血消肿作用, 对感冒发热、肝炎等多种炎症有较好疗效。药理研究表明, 苦地丁水

提液对多种动物模型有明显的抗炎、镇痛作用^[1]。苦地丁中含多种生物碱成分, 其主要生物碱紫堇灵、乙酰紫堇灵、原阿片碱对肝损伤有保护作用^[2]。对苦地丁中生物碱的定量分析, 文献报道的有薄层光密度扫描法^[3]、高效液相色谱法^[4-6], 本实验建立了苦地丁中去氢碎叶紫堇碱(dehydrocheilanthifoline)、普托品(protopine)、紫堇灵(corynoline)、乙酰紫堇灵(acetylcorynoline)、氧化血根碱(oxysanguinarine)、二氢血根碱(dihydrosanguinarine)等 6 种生物碱同时测定的高效液相色谱分析方法, 并对 5 个不同地

[收稿日期] 20111209(002)

[第一作者] 郑建芳, 硕士, 助教, 从事生药资源及品质评价研究, Tel: 15090075581, E-mail: qui-sheep@sohu.com

[通讯作者] * 秦民坚, 教授, 博士, 从事中药资源与质量研究, Tel: 025-86185130, E-mail: minjianqin@163.com

区苦地丁药材中这 6 种成分的含量进行了测定,为苦地丁质量标准的制定提供参考。

1 材料

惠普 HP-1100 型高效液相色谱仪、紫外检测器, HS 色谱数据工作站(杭州英谱科技开发有限公司), FA2104 型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司), SK2200HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

去氢碎叶紫堇碱、普托品、紫堇灵、乙酰紫堇灵、氧化血根碱、二氢血根碱对照品均自制,经¹H-NMR,¹³C-NMR 鉴定结构,高效液相色谱检测,面积归一化法计算各对照品的质量分数均 >98%。甲醇为色谱纯,水为乐百氏纯净水,其余试剂均为分析纯。

苦地丁药材分别购自河北、山西、山东、北京,经作者鉴定,中国药科大学秦民坚教授复核为罂粟科植物紫堇 *Corydalis bungeana* Turcz. 的干燥全草。

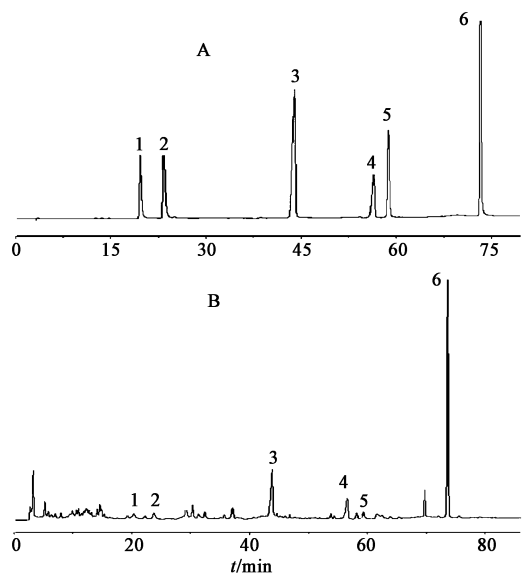
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液, B 为甲醇,梯度洗脱,洗脱程序见表 1;流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 289 nm,柱温为室温,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,各组分理论塔板数均不低于 3 000,样品中各待测组分与相邻峰分离度均 >1.5,色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	80	20
4	75	25
10	62	38
23	62	38
27	52	48
35	52	48
40	30	70
50	22	78
60	22	78
65	8	92
80	8	92

2.2 对照品溶液的制备 精密称取去氢碎叶紫堇碱 14.50 mg、普托品 29.00 mg、紫堇灵 59.00 mg、乙酰紫堇灵 21.00 mg、氧化血根碱 4.20 mg、二氢血根碱 15.50 mg,分别置 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,质量浓度分别为 0.29,0.58,1.18,0.42,0.084,0.31 g·L⁻¹。上述溶液作为对照品储备液,



A. 对照品; B. 供试品; 1. 去氢碎叶紫堇碱; 2. 普托品; 3. 紫堇灵; 4. 乙酰紫堇灵; 5. 氧化血根碱; 6. 二氢血根碱

图 1 苦地丁 HPLC

避光保存。

2.3 供试品溶液的制备 取苦地丁药材粉末(过 60 目筛)约 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,热回流提取 1 h,放冷至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密量取各对照品储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中混合,甲醇稀释至刻度,摇匀。再分别量取混合液 0.2,0.4,0.8,1.6,2.0 mL 至 2 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀,作为对照品溶液。分别进样 20 μL,记录色谱峰面积。以对照品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,峰面积积分为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线,结果见表 2。

表 2 苦地丁中 6 种生物碱的回归方程与线性范围

成分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
去氢碎叶紫堇碱	$Y = 3\ 721\ 037X + 2\ 007.86$	0.999 4	2.9 ~ 29
普托品	$Y = 2\ 751\ 681X + 2\ 141.09$	0.999 6	5.8 ~ 58
紫堇灵	$Y = 2\ 834\ 356X + 8\ 156.51$	0.999 1	11.8 ~ 118
乙酰紫堇灵	$Y = 2\ 372\ 448X + 1\ 984.94$	0.999 5	4.2 ~ 42
氧化血根碱	$Y = 17\ 082\ 448X - 10\ 062$	0.999 1	0.84 ~ 8.4
二氢血根碱	$Y = 11\ 263\ 564X + 10\ 223.82$	0.999 4	3.1 ~ 31

2.5 精密度试验 取一定浓度的混合对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,按 2.1 色谱条件测定峰面积,去氢碎叶紫堇碱、普托品、紫堇灵、乙酰紫堇灵、氧化血根碱、二氢血根碱的峰面积 RSD 分别为 0.77%,

1.67% ,1.61% ,0.74% ,1.27% ,2.04% 。

2.6 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在 0, 2,4,8,16,32,48 h,进样 20 μL ,记录峰面积,去氢碎叶紫堇碱、普托品、紫堇灵、乙酰紫堇灵、氧化血根碱、二氢血根碱峰面积的 RSD 分别为 2.14% , 2.49% ,2.38% ,1.49% ,2.71% ,0.25% ,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一产地的苦地丁药材 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进样分析,测得去氢碎叶紫堇碱、普托品、紫堇灵、乙酰紫堇灵、氧化血根

碱、二氢血根碱含量的 RSD 分别为 0.94% ,2.61% , 2.22% ,1.33% ,1.11% ,1.46% 。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的苦地丁粉末 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密量取 0.29 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的去氢碎叶紫堇碱 0.18 mL, 0.58 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的普托品 0.11 mL,1.18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的紫堇灵 0.44 mL,0.42 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酰紫堇灵 0.78 mL,0.084 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氧化血根碱 0.14 mL,0.31 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二氢血根碱 1.25 mL,其余操作同 2.3 项下方法制备供试品溶液。进样 20 μL ,测定各成分的含量,计算回收率,结果见表 3。

表 3 苦地丁中 6 种生物碱的加样回收率试验

成分	称样量/g	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
去氢碎叶紫堇碱	0.251 7	51.89	52.20	102.75	97.43	98.57	1.16
	0.250 2	51.58		103.12	98.73		
	0.251 3	51.81		102.93	97.93		
	0.250 5	51.64		104.18	100.64		
	0.251 1	51.77		102.87	97.90		
	0.252 3	52.02		103.60	98.82		
普托品	0.251 7	64.81	63.80	127.83	98.77	101.05	2.83
	0.250 2	64.43		131.17	104.61		
	0.251 3	64.71		130.62	103.31		
	0.250 5	64.50		130.05	102.74		
	0.251 1	64.66		126.94	97.62		
	0.252 3	64.97		128.29	99.25		
紫堇灵	0.251 7	523.96	519.20	1 039.21	99.24	102.10	1.66
	0.250 2	520.83		1 048.35	101.60		
	0.251 3	523.12		1 052.77	102.01		
	0.250 5	521.46		1 062.81	104.27		
	0.251 1	522.71		1 053.63	102.26		
	0.252 3	525.20		1 061.14	103.22		
乙酰紫堇灵	0.251 7	330.57	327.60	656.79	99.58	98.26	1.73
	0.250 2	328.60		652.03	98.73		
	0.251 3	330.04		648.39	97.18		
	0.250 5	328.99		650.11	98.02		
	0.251 1	329.78		643.18	95.67		
	0.252 3	331.35		660.27	100.40		
氧化血根碱	0.251 7	11.75	11.76	23.92	103.52	98.92	2.78
	0.250 2	11.68		23.34	99.18		
	0.251 3	11.73		22.97	95.60		
	0.250 5	11.69		23.08	96.85		
	0.251 1	11.72		23.29	98.40		
	0.252 3	11.77		23.53	99.97		

续表 3

成分	称样量/g	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
二氢血根碱	0.251 7	389.30	387.50	775.37	99.63	98.30	1.89
	0.250 2	386.98		772.19	99.41		
	0.251 3	388.68		769.55	98.29		
	0.250 5	387.44		763.71	97.10		
	0.251 1	388.37		757.38	95.23		
	0.252 3	390.22		778.25	100.14		

表 4 不同产地苦地丁中 6 种生物碱的含量测定

来源	去氢碎叶紫堇碱	普托品	紫堇灵	乙酰紫堇灵	氧化血根碱	二氢血根碱	总量
河北玉田	0.024	0.031	0.209	0.121	0.005	0.150	0.54
河北安国	0.035	0.029	0.193	0.110	0.007	0.055	0.43
山西	0.074	0.283	0.580	0.076	0.009	0.017	1.04
山东	0.142	0.057	0.251	0.159	0.028	0.096	0.73
北京	0.085	0.073	0.219	0.142	0.017	0.092	0.63

2.9 样品测定 取不同产地的苦地丁粉末 0.5 g, 精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进样分析,计算各个产地苦地丁中 6 中生物碱的含量,结果见表 4。

3 讨论

曾参照药典方法^[7]对样品先冷浸后超声提取,并与热回流提取进行比较,发现去氢碎叶紫堇碱和普托品含量相差较大,以热回流提取效率较高,其余生物碱用两种方法所测含量差别不大,故采用热回流提取。回流 1 h 与回流 2 h 结果基本相同,较 0.5 h 测得含量高,以热回流 1 h 为宜。

在流动相的选择试验中,比较了多种流动相对样品的分离效果,结果表明用甲醇-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液系统为流动相梯度洗脱,能改善峰形,抑制色谱峰的拖尾现象,各色谱峰分离情况良好。

从含量测定结果看,不同地区的苦地丁,其生物碱总量有一定差别,各生物碱成分的含量也参差不齐,普托品和紫堇灵在山西中的含量明显高于其他地区,二氢血根碱以河北玉田的含量最高,因样品较少,未能作更广泛比较,此方面工作有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王廷慧,赵润芝,陈兵,等. 苦地丁抗炎、镇痛作用的实验研究[J]. 延安大学学报:自然科学版,1997,16(4):81.
- [2] 魏怀玲,刘耕陶. 紫堇灵、乙酰紫堇灵及原鸦片碱对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 药理学,1997,32(5):331.
- [3] 何丽一,张亚斌. 苦地丁中六种异喹啉生物碱的薄层分离和光密度法测定[J]. 药学学报,1985,20(5):377.
- [4] Zeng Weiguang,Liang Wenzao,Tu Guoshi. Assay of five corynoline-type alkaloids in *Corydalis bungeana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1987,408:426.
- [5] 徐晓莹,李宝明,何丽一,等. 苦地丁中异喹啉生物碱的反相离子对高效液相色谱分析法[J]. 药学学报,1994,29(10):785.
- [6] 黄阁,杨红娟,李发美. 苦地丁中紫堇灵和乙酰紫堇灵的制备和 HPLC 测定[J]. 中国中药杂志,2003,28(4):346.
- [7] 中国药典.一部[S]. 2010:187.

[责任编辑 顾雪竹]