

双波长 HPLC 同时测定延胡索中 3 种生物碱的含量

赵静宜, 陆洋, 杜守颖*, 白洁, 武慧超, 赵雪姣, 黎迎
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立同时测定延胡索中巴马汀、脱氢紫堇碱和延胡索乙素的 HPLC 方法。方法: 采用 C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 nm, 5 μ m), 以乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (加三乙胺调节 pH 6.0, B) 进行梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 25% A; 20 ~ 30 min, 25% ~ 55% A; 30 ~ 45 min, 55% A; 45 ~ 50 min, 55% ~ 25% A; 50 ~ 55 min, 25% A); 检测波长为 270, 280 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果: 巴马汀在 $2.12 \times 10^{-2} \sim 1.59 \mu$ g 呈良好的线性关系 ($r = 0.9999$); 脱氢紫堇碱在 $4.10 \times 10^{-2} \sim 3.07 \mu$ g 呈良好的线性关系 ($r = 0.9999$); 延胡索乙素在 $2.10 \times 10^{-2} \sim 1.57 \mu$ g 呈良好的线性关系 ($r = 0.9999$); 加样回收率分别为 100.10%, 100.03%, 97.47%。结论: 该方法准确、稳定、分离效果好, 可用于测定延胡索药材中巴马汀、脱氢紫堇碱和延胡索乙素的含量。

[关键词] 巴马汀; 脱氢紫堇碱; 延胡索乙素; 双波长法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0107-04

Determination of Three Active Components in Rhizoma Corydalis by Dual Wavelength HPLC

ZHAO Jing-yi, LU Yang, DU Shou-ying*, BAI Jie, WU Hui-chao, ZHAO Xue-jiao, LI Ying
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a new method for determination of palmatine hydrochloride, dehydrocorydaline nitrate and tetrahydropalmatine in Rhizoma Corydalis by HPLC. **Method:** The HPLC was adopted performing on a C_{18} column (4.6 mm × 250 nm, 5 μ m) with a mobile phase of acetonitrile (A) -0.1%

[收稿日期] 20111219(012)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008); 国家自然科学基金面上项目(81073057); 国家自然科学基金青年基金项目(81102816); 教育部博士点基金(20010013110007); 北京中医药大学自主选题项目(JYBZZ-JS021); 北京中医药大学创新团队发展计划项目(2011-CXTD-13)

[第一作者] 赵静宜, 硕士在读, 从事中药新剂型与新技术研究

[通讯作者] * 杜守颖, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738645, E-mail: dushouying@263.net

本实验建立以芦丁为对照品, 以亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠作为显色剂, 用紫外分光光度法测定广西不同产地倒地铃总黄酮含量的方法, 结果表明本法操作简便快速, 结果稳定、可靠, 可用于测定倒地铃总黄酮含量。由实验结果可知, 广西不同产地倒地铃中总黄酮的含量有明显差异。这对倒地铃全草的化学成分进行更深入的研究, 尤其是为今后对黄酮类成分的提取与分离, 药效等研究, 进一步开发和利用倒地铃提供一定依据和基础。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版

社, 1977.

[2] 《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

[3] Ahmed I, Krishnamoorthy G. Probing of coenzyme quinone binding site of mitochondrial NADH: CoQ reductase by fluorescence dynamics [J]. Biochemistry, 1994, 33(32): 9675.

[4] Chandra T, Sadique J. Anti-inflammatory effect of the medicinal plant *Cardiospermum hilicacabum* Linn *in vitro* study [J]. Arogya, 1984, 100(1): 57.

[5] 韦建华, 蔡少芳, 陈君. 倒地铃化学成分预实验 [J]. 时珍国医国药, 2001, 22(3): 754.

[责任编辑 顾雪竹]

phosphoric acid (B). The gradient elution program was as follows: 0-20 min, 25% A; 20-30 min, 25% -55% A; 30-45 min, 55% A; 45-50 min, 55% -25% A; 50-55 min, 25% A; The detection wavelength was set at 270 nm and 280 nm. The column temperature was at 30 °C. **Result:** Palmatine hydrochloride was linear in the range of 2.12×10^{-2} -1.59 μg ($r=0.9999$); dehydrocorydaline nitrate was linear in the range of 4.10×10^{-2} -3.07 μg ($r=0.9999$); tetrahydropalmatine was linear in the range of 2.10×10^{-2} -1.57 μg ($r=0.9999$). The average recovery was 100.10%, 100.03% and 97.47%. **Conclusion:** The method was accurate and had satisfactory efficacy; it can determine palmatine hydrochloride, dehydrocorydaline nitrate and tetrahydropalmatine in *Rhizoma Corydalis*.

[**Key words**] palmatine hydrochloride; dehydrocorydaline nitrate; tetrahydropalmatine; dual wavelength; content determination

延胡索为罂粟科植物延胡索的干燥块茎,具有活血、行气、止痛的功效,用于胸胁、脘腹疼痛,胸痹心痛,经闭痛经,产后瘀阻,跌扑肿痛等^[1]。延胡索中主要含生物碱,主要为叔胺型生物碱(延胡索乙素、四氢黄连碱等)和季胺型生物碱(脱氢紫堇碱、巴马汀、黄连碱、非洲防己碱等)^[2-3]。其中延胡索乙素是延胡索镇痛的主要活性成分,《中国药典》2010年版及成方制剂中均采用延胡索乙素为对照品进行评价。对于季胺型生物碱成分的含量测定文献报道很少,研究表明,季胺型生物碱在治疗心血管疾病中起到了主要疗效^[4]。本实验建立了一种快速、简便、同时测定延胡索中延胡索乙素、巴马汀、脱氢紫堇碱的方法,更有助于对延胡索药材进行质量控制。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT型高效液相色谱仪(SPD-20AVWD检测器,四元低压梯度泵,柱温箱,自动进样器,日本岛津公司),LC Solution色谱工作站。METTLER AE 240型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),Sartorius BS110S型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 试药 延胡索药材购自以岭中药饮片有限公司,经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,延胡索乙素对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号为 110726-201011),巴马汀对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号为 110732-200907),脱氢紫堇碱对照品(购自伊普瑞斯科技术有限公司,批号为 042-30751,纯度 >98%),乙腈(色谱纯,北京迈瑞达科技有限公司),娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯(北京化工厂)。

2 方法

2.1 混合对照品溶液配制 精密称定巴马汀对照

品、脱氢紫堇碱对照品、延胡索乙素对照品适量,置同一量瓶中,加甲醇溶解并稀释成浓度分别为 0.106, 0.205, 0.105 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,过 0.45 μm 的滤膜,备用。

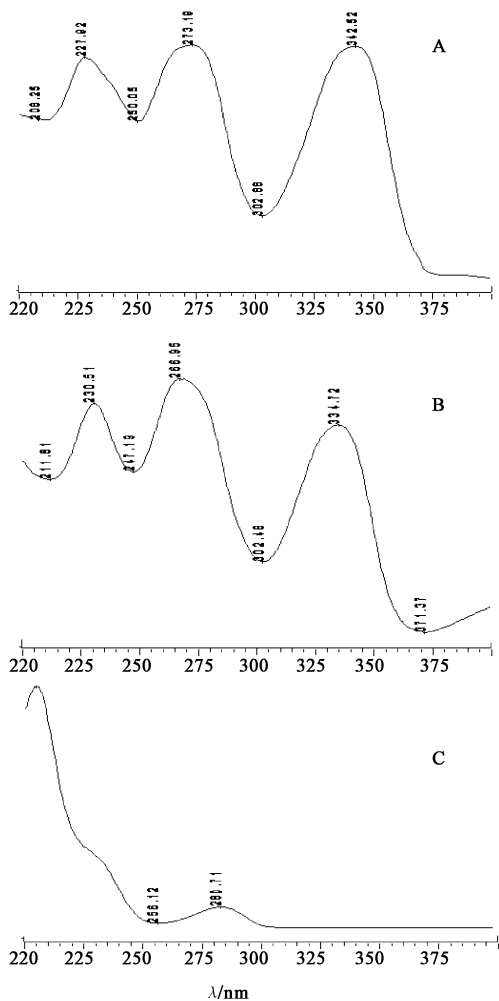
2.2 检测波长的确定^[5] 精密吸取混和对照品溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪,待出现色谱峰时,立即停泵进行 200~400 nm 紫外全波长扫描。

由图 1 可知,延胡索乙素在 280 nm 有最大吸收,巴马汀和脱氢紫堇碱在 270 nm 处均有最大吸收,为了保证测定的准确性,所以采用双波长测定法,巴马汀和脱氢紫堇碱的检测波长 270 nm,延胡索乙素的检测波长 280 nm。

2.3 色谱条件 Phenomenex C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1% 磷酸(加三乙胺调节 pH 6.0),梯度洗脱,洗脱程序(0~20 min, 25% A, 20~30 min, 25%~55% A, 30~45 min, 55% A, 45~50 min, 55%~25% A, 50~55 min, 25% A),柱温 30 °C,巴马汀和脱氢紫堇碱检测波长为 270 nm,延胡索乙素检测波长为 280 nm,流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。见图 2。

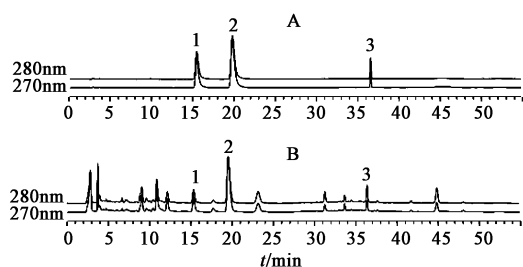
2.4 供试品溶液的制备 取延胡索粉末(过 50 目筛)0.5 g,精密称定,置平底烧瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合溶液 50 mL,称定质量,冷浸 1 h 后,加热回流 1 h,放冷,在称定质量,用盐酸-甲醇(1:100)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取 25 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即为供试品溶液。

2.5 系统适用性考察 吸取混合对照品溶液、延胡索药材供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定。由谱图和色谱参数可知,供试品溶液在对照品相应的保留时间出现巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素的色谱峰,理论塔板数、分离度、拖尾因子均达到含量



A. 巴马汀; B. 脱氢紫堇碱; C. 延胡索乙素

图 1 延胡索 3 种生物碱紫外扫描



A. 混合对照品; B. 药材供试品;

1. 巴马汀; 2. 脱氢紫堇碱; 3. 延胡索乙素

图 2 延胡索药材 HPLC

测定要求,说明该色谱条件适用于上述 3 种成分的含量测定。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 分别吸取混合对照品溶液 0.2, 1.0, 2.0, 6.0, 10.0, 15.0 μL , 按 2.3 项下色谱条件进行测定,以对照品的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得到各对照品的回归方程及线性范围。结果表明 3 种成分在各自的线性范围

内与其峰面积呈良好的线性关系。见表 1。

表 1 延胡索中 3 种成分的 HPLC 标准曲线

测定成分	回归曲线	r	线性范围/ μg
巴马汀	$Y=4.00 \times 10^6 X - 6.03 \times 10^4$	0.999 9	$2.12 \times 10^{-2} \sim 1.59$
脱氢紫堇碱	$Y=4.00 \times 10^6 X - 1.03 \times 10^5$	0.999 9	$4.10 \times 10^{-2} \sim 3.07$
延胡索乙素	$Y=8.58 \times 10^5 X - 9.62 \times 10^3$	0.999 9	$2.10 \times 10^{-2} \sim 1.57$

2.6.2 精密度考察 取混合对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件,连续进样 6 次,计算各峰面积和 RSD。结果巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 0.95%, 0.62%, 1.29%。表明仪器的精密度良好。

2.6.3 稳定性考察 取同一批延胡索药材制备成供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件分别在 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h 进样 1 次。巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 0.62%, 0.88%, 1.75%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.4 重复性考察 取同一批延胡索药材,按 2.4 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.3 项下色谱条件测定。巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素的含量分别为 0.049 1%, 0.224 5%, 0.067 9%, RSD 分别为 1.44%, 2.06%, 0.01%。表明该方法的重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 取已知含量的延胡索药材粉末 6 份,分别精密加入一定量的对照品溶液,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,结果见表 2~4。

2.7 含量测定 选取 7 个不同产地的延胡索药材,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,含量测定结果见表 5。由测定结果可知,各个地区的延胡索中 3 种成分的含量差别较大,除浙江东阳所产的延胡索,其他产地的延胡索均符合药典要求。

3 总结与讨论

本实验建立了延胡索药材中 3 种成分的高效液相色谱测定方法,可使其获得基线分离,具有准确简便、重复性好等特点。测定成分选取了叔胺型生物碱延胡索乙素和季胺型生物碱脱氢紫堇碱、巴马汀,较全面的反应了不同产地的延胡索的药材质量。

实验前对对照品溶液进行了紫外全波长扫描。由紫外图谱可知,巴马汀和脱氢紫堇碱在 270 nm 有最大吸收,延胡索乙素在 280 nm 有最大吸收,因此本实验采用双波长检测法,使 3 种成分在所测波长处有最大吸收,比单波长测定法更为准确。

表 2 巴马汀加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.250 4	122.909 5	119.659 1	245.904 6	102.79	100.10	1.70
2	0.249 9	122.664 1	119.659 1	240.634 2	98.59		
3	0.250 3	122.860 4	119.659 1	242.583 8	100.05		
4	0.249 9	122.664 1	119.659 1	243.546 0	101.02		
5	0.250 0	122.713 2	119.659 1	240.077 0	98.08		
6	0.250 5	122.958 6	119.659 1	242.690 8	100.06		

表 3 脱氢紫堇碱加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.250 4	562.184 9	469.250 3	1 030.702 7	99.84	100.03	2.27
2	0.249 9	561.062 4	469.250 3	1 042.511 2	102.60		
3	0.250 3	561.960 4	469.250 3	1 014.430 9	96.42		
4	0.249 9	561.062 4	469.250 3	1 023.408 6	98.53		
5	0.250 0	561.286 9	469.250 3	1 035.485 0	101.05		
6	0.250 5	562.409 5	469.250 3	1 039.655 6	101.70		

表 4 延胡索乙素加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.250 4	169.964 9	173.793 6	340.061 3	97.87	97.47	1.39
2	0.249 9	169.625 5	173.793 6	340.954 0	98.58		
3	0.250 3	169.897 1	173.793 6	335.295 7	95.17		
4	0.249 9	169.625 5	173.793 6	337.777 7	96.75		
5	0.250 0	169.693 4	173.793 6	339.170 9	97.52		
6	0.250 5	170.032 8	173.793 6	341.908 7	98.90		

在预实验过程中,比较了 Phenomenex C₁₈ 色谱柱和 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱对 3 种成分的分离效能,Dikma Diamonsil C₁₈ 对 3 种成分基本能实现基线分离,但拖尾较严重,改用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱

表 5 不同产地延胡索药材中 3 种成分的含量测定 %

产地	巴马汀	脱氢紫堇碱	延胡索乙素
河北以岭	0.049 1	0.224 5	0.067 9
山西汉中	0.018 5	0.091 7	0.093 3
浙江磐安	0.041 4	0.178 8	0.055 0
河北安国	0.031 4	0.140 6	0.074 0
浙江东阳	0.029 2	0.132 7	0.034 7
陕西	0.021 9	0.100 2	0.052 4
山东	0.047 8	0.202 0	0.067 9

后,能够满足基线分离的要求,而且峰形较好,因此,选用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱。

在预实验过程中,发现流动相不同 pH 对延胡索乙素的分离影响较大,对巴马汀和脱氢紫堇碱的影响较小。当流动相 pH 在 4.0 时,延胡索乙素未出现色谱峰,原因可能为流动相酸性较强,使其酸化成盐而未检出;巴马汀和脱氢紫堇碱出现色谱峰。当流动相 pH 在 5.0 时,延胡索乙素出现色谱峰,但峰形较差。当流动相 pH 6.0 时,3 种成分的色谱峰均能符合要求。所以将流动相的 pH 定为 6.0。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:130.
 [2] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:345.
 [3] 邹薇,张鹤,孟宪生,等. 毛细管电泳法测定延胡索中 2 种生物碱含量电泳条件优化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):59.
 [4] 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.
 [5] 张惠娟,杜守颖,陆洋. HPLC 同时测定丹参水溶性及脂溶性 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(15):34.

[责任编辑 顾雪竹]