

HPLC 测定岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁、 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱

胡芳, 陆兔林*, 毛春芹, 王静
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀及盐酸小檗碱含量的方法, 为完善岩黄连生物总碱的质量评价提供依据。方法: 采用高效液相色谱法, 以 Agilent XDB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液 (18.5:81.5) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 347 nm。结果: 脱氢卡维丁进样量在 15.375~92.25 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) 呈良好的线性关系, 平均加样回收率 96.43%, RSD 1.13%; 盐酸巴马汀进样量在 14.91~89.46 g·L⁻¹ ($r=0.9999$) 呈良好的线性关系, 平均加样回收率 96.28%, RSD 1.22%; 盐酸小檗碱进样量在 3.525~28.2 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$) 呈良好的线性关系, 平均加样回收率为 103.02%, RSD 1.35%。结论: 所建立的方法简便、准确、重复性好, 可以用于控制岩黄连生物总碱的质量。

[关键词] 岩黄连生物总碱; 高效液; 脱氢卡维丁; 盐酸巴马汀; 盐酸小檗碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0068-04

Determination of Dehydrocavidine, Palmatine Hydrochloride and Berberine Hydrochloride in Total Alkaloids of *Corydalis saxicola* Bunting

HU Fang, LU Tu-lin*, MAO Chun-qin, WANG Jing

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneously determining dehydrocavidine, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in total alkaloids of *Corydalis saxicola*. **Method:** An Agilent XDB C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, the acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (18.5:81.5) as mobile phase, the column temperature was at 30 °C, the detection wavelength was set at 347 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The liner range of dehydrocavidine was 15.375-92.25 mg·L⁻¹ ($r=0.9999, n=6$) and the average recovery was 96.43% (RSD 1.13%). The liner range of palmatine hydrochloride was 14.91-89.46 mg·L⁻¹ ($r=0.9999, n=6$) and the average recovery rate was 96.28% (RSD 1.22%). The liner range of berberine hydrochloride was 3.525-28.2 mg·L⁻¹ ($r=0.9997, n=6$). and the average recovery rate was 103.02% (RSD 1.35%). **Conclusion:** The method appeared to be accurate, sensitive and reliable, and can be used to control the quality of the total alkaloids of *C. saxicola*.

[Key words] total alkaloids of *Corydalis saxicola*; HPLC; dehydrocavidine; palmatine hydrochloride; berberine hydrochloride

岩黄连生物总碱是罂粟科紫堇属植物石生黄堇 *Corydalis saxicola* Bunting 的全草^[1] 经过提取分离纯

[收稿日期] 20101111(001)

[第一作者] 胡芳, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量控制及新药开发研制工作, Tel:13675152013, E-mail: huqiu1953@163.com

[通讯作者] * 陆兔林, 教授, 硕士生导师, Tel:025-85811513, E-mail: lutuling2005@126.com

化得到的生物总碱有效部位(有效部位含量占总提取物的55%以上)。岩黄连民间用于肝炎,肝硬化,晚期癌疼痛^[2],现代药理研究表明岩黄连生物总碱具有抗癌、增强免疫功能等作用,在肝炎治疗、抗病排毒及预防疾病方面有独特疗效。岩黄连生物总碱中主要有效成分是以脱氢卡维丁为代表的生物碱类化合物,而这类化合物具有潜在的抗HBV活性和肝保护活性^[3]。其中脱氢卡维丁具有镇静、镇痛、解痉、抗菌和增加肝糖元生成的作用^[4],盐酸巴马汀具有抗心律失常的药理作用^[5],盐酸小檗碱具有抗炎、抗菌、抗肿瘤的药理作用^[6]。

有文献^[7]报道使用高效液相色谱法测定岩黄连药材中脱氢卡维丁的含量。但笔者未见采用高效液相色谱法同时测定岩黄连生物总碱中3种生物碱含量的文献报道。因岩黄连中主要有效成分为脱氢卡维丁、盐酸巴马汀以及盐酸小檗碱,且3者的含量在总提取物中的含量也较高,故本实验考察并建立了岩黄连生物总碱中主要活性成分脱氢卡维丁、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的HPLC测定方法,为提取物的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

FA1104N电子分析天平;Agilent 1100LC型高效液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、柱温箱、真空脱气机、紫外检测器(美国安捷伦科技有限公司);KQ-500E型医用超声清洗器(昆山超声仪器有限公司);Mettler AG285电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多集团)。

岩黄连生物总碱(自制,总部位含量占总提取物的55%以上)。脱氢卡维丁对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号111667-200601)、盐酸巴马汀对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号110732-200506)、盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号110713-200508)。乙腈为色谱纯(TEDIA),水为重蒸水, KH_2PO_4 、磷酸、盐酸、甲醇,皆为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性 以Agilent XDB C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(18.5:81.5)为流动相,柱温30℃,检测波长347 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL ,采样时间50 min。理论板数按脱氢卡维丁计算不低于3 000,见图1。

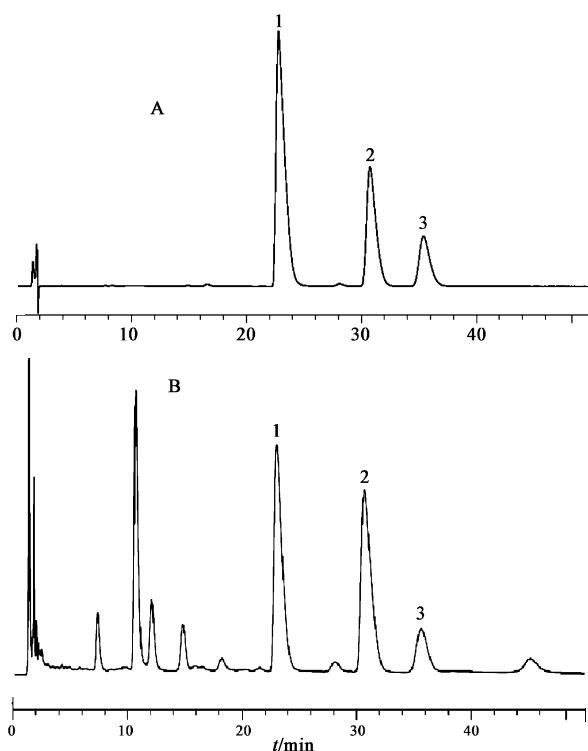


图1 岩黄连生物总碱HPLC

A. 混合对照品;B. 总生物碱;

1. 脱氢卡维丁;2. 盐酸巴马汀;3. 盐酸小檗碱

2.2 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷干燥过夜的脱氢卡维丁对照品、盐酸巴马汀对照品、盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇分别制成每1 mL含脱氢卡维丁1.025 mg、盐酸巴马汀0.994 mg和盐酸小檗碱0.705 mg的溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品约50 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加1%盐酸甲醇至刻度,摇匀,过微孔滤膜0.45 μm ,取续滤液,即得。

2.4 线性范围的考察 分别精密吸取上述对照品溶液,用甲醇配制成混合对照品溶液。其中,脱氢卡维丁浓度为15.375, 30.75, 46.125, 61.5, 76.875, 92.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、盐酸巴马汀浓度为14.91, 29.82, 44.73, 59.64, 74.55, 89.46 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、盐酸小檗碱浓度为3.525, 7.05, 10.575, 14.1, 21.15, 28.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,分别吸取不同浓度对照品溶液10 μL ,进行分析测定。以对照品峰面积为纵坐标,对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线,相关组分的回归方程、相关系数、线性范围见表1。

2.5 精密度试验 精密吸取脱氢卡维丁30.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、盐酸巴马汀29.82 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、盐酸小檗碱7.05

表 1 脱氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的回归方程

组分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
脱氢卡维丁	$Y = 30\ 328.084X + 0.57$	0.999 9	15.375 ~ 92.25
盐酸巴马汀	$Y = 36\ 342.915X + 9.803$	0.999 9	14.91 ~ 89.46
盐酸小檗碱	$Y = 38\ 279.516X + 5.042$	0.999 7	3.525 ~ 28.2

mg·L⁻¹的混合对照品溶液 10 μL,按上述色谱条件,连续进样 6 次。脱氢卡维丁峰面积的 RSD 0.21%,盐酸巴马汀峰面积的 RSD 0.26%,盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.37%。由此结果可得出,进样精密密度结果符合规定,满足脱氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量测定要求。

2.6 重复性试验 精密称取本品粉末(批号 20071014)50 mg,共 5 份,置 100 mL 量瓶中,加 1% 盐酸甲醇溶解定容,摇匀,过微孔滤膜(0.45 μm),取续滤液 10 μL 注入液相色谱仪,并按上述色谱条件测定。测得脱氢卡维丁平均质量分数为 10.19%,RSD 1.16%,盐酸巴马汀平均质量分数为 8.65%,RSD 1.27%,盐酸小檗碱平均质量分数为 2.24%,RSD 1.27%,由以上结果得知,样品的重复性试验结果符合含量测定的方法学要求。

2.7 稳定性试验 取重复性试验的 1 号样品依次于不同时间段(0,3,5,8,13 h)进样测定峰面积值,结果脱氢卡维丁的 RSD 0.8%,盐酸巴马汀的 RSD 0.54%,盐酸小檗碱的 RSD 0.39%。由以上结果得知,脱氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积均未发生大的变化,说明室温放置 13 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 分别精密称取已知含量的岩黄连生物总碱粉末(批号 20071014)25 mg,共 9 份,置 100 mL 量瓶中,分别加入等同于样品中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量 80%,100%,120% 的对照品,加 1% 盐酸甲醇溶解定容,摇匀,过微孔滤膜(0.45 μm),取续滤液 10 μL 注入液相色谱仪,测定含量,结果见表 2。

脱氢卡维丁的平均回收率为 96.43%,RSD 1.13%;盐酸巴马汀的平均回收率为 96.28%,RSD 1.22%;盐酸小檗碱的平均回收率为 103.02%,RSD 1.35%。样品的加样回收率试验结果符合含量测定方法学的要求。

2.9 含量测定 取自制的 3 个批号的岩黄连生物总碱(批号 20071014,20071018,20071022,有效部位

表 2 脱氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱加样回收率实验结果

回收率实验结果							
	取样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回 收率/%	平均值 /%	RSD /%
脱氢卡维丁	24.3	2.476 2	2.05	4.426 9	95.16	96.43	1.13
	24.5	2.496 6	2.05	4.453 9	95.48		
	24.6	2.506 7	2.05	4.463 9	95.47		
	25.1	2.557 7	2.46	4.960 8	97.69		
	25.4	2.588 3	2.46	4.966	96.65		
	24.3	2.476 2	2.46	4.876 9	97.59		
	24.9	2.537 3	2.87	5.264 7	95.03		
	24.3	2.476 2	2.87	5.258 6	96.95		
	25.1	2.557 7	2.87	5.366 6	97.87		
盐酸巴马汀	24.3	2.102	1.590 4	3.6281	95.96	96.28	1.22
	24.5	2.119 3	1.590 4	3.651 2	96.32		
	24.6	2.127 9	1.590 4	3.6627	96.51		
	25.1	2.171 2	1.988	4.08	96.02		
	25.4	2.197 1	1.988	4.0872	95.07		
	24.3	2.102	1.988	3.993 3	95.14		
	24.9	2.153 9	2.220 5	4.267	95.16		
	24.3	2.102	2.220 5	4.266 7	97.49		
	25.1	2.171 2	2.220 5	4.366 7	98.88		
盐酸小檗碱	24.3	0.544 3	0.423	0.970 1	100.66	103.02	1.35
	24.5	0.548 8	0.423	0.979 9	101.92		
	24.6	0.551	0.423	0.986 7	103		
	25.1	0.562 2	0.564	1.150 5	104.3		
	25.4	0.569	0.564	1.157 3	104.32		
	24.3	0.544 3	0.564	1.125	102.96		
	24.9	0.557 8	0.705	1.271 2	101.2		
	24.3	0.544 3	0.705	1.278 5	104.14		
	25.1	0.562 2	0.705	1.300 2	104.67		

含量占总提取物中 55% 以上),每批 3 份,按照“供试品溶液的制备”项下制备成待测溶液,精密吸取 10 μL 注入色谱仪,记录色谱图。外标法计算供试品溶液中的脱氢卡维丁含量。结果见表 3。

3 批样品的含量测定结果表明,指标性成分(脱

氢卡维丁、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱)的含量总和大于20.16%。

表3 3批岩黄连生物总碱中指标性成分的含量测定 %

批号	脱氢卡 维丁	盐酸 巴马汀	盐酸 小檗碱	指标性 成分总量	平均含量	RSD
071014	10.34	8.79	2.18	21.31	21.24	0.83
	10.37	8.83	2.19	21.40		
	10.20	8.65	2.15	20.99		
071018	10.56	7.39	1.92	19.88	20.65	1.42
	10.54	7.51	2.00	20.05		
	10.93	7.77	1.86	20.55		
071022	10.25	8.19	2.09	20.53	20.65	0.44
	10.34	8.29	2.08	20.71		
	10.34	8.29	2.10	20.73		

3 讨论

本试验首次采用HPLC同时测定岩黄连总碱中的3个单体含量,且所建立的方法简便可行、重复性好、结果可靠。为岩黄连生物总碱的质量控制提供了重要的文献依据。

在确定检测波长时,在200~800 nm扫描,对照品及样品在347 nm处均有平坦吸收,故选择347 nm作为含量测定的波长。本实验曾采用乙腈-0.2%磷酸(40:60)流动相体系来分离上述3个化合物,但不能将它们很好地分离,且流动相比中磷酸酸度高,对柱子不利;后改用乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(18.5:81.5)为流动相体系来分离,经反复摸索,确立了文中的流动相。另还比较了Hypersil ODS₂(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱、Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱以及Agilent XDB C₁₈柱,采用相同的流动相条件洗脱。经比较,Agilent XDB C₁₈(4.6 mm×150 mm,5 μm)色谱柱对被测成分的分离效果明显优于其他柱并且出峰时间

短,效率较高。故选用Agilent XDB C₁₈色谱柱用于岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁等指标性成分的含量测定。

由样品高效液相色谱图可知,除了3个主要有效成分外还有很多未知色谱峰,且该3个有效成分的总含量也仅占总提取物的20%左右。为了对其他色谱峰对应的物质进行定性,我们在后续试验中采用了高速逆流色谱对未知成分进行了分离,得到5个单体成分,其中除了已知的3个单体成分外,还得到2个未知成分,我们对未知成分进行了全波长扫描,发现其与已知生物碱成分全波长扫描图非常相似,初步鉴定其拥有同样的母核,即为生物碱类成分。更进一步的结构鉴定还在继续进行。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第3册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:638.
- [2] 柯珉珉,张宪德,吴练中,等. 岩黄连有效成分的研究[J]. 植物学报,1982,24(3):289.
- [3] K. H. Janbaza, A H Gilani. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents [J]. Fitoterapia. 2003, 71(1):25.
- [4] 陈重阳,赵一. 中药岩黄连主要成分脱氢卡维丁的药理研究[J]. 中国中药杂志,1982,2:31.
- [5] 陈超,方达超. 盐酸巴马汀抗心律失常作用[J]. 中国药理学通报,1992,8(5):108.
- [6] 郝乘仪,李妍,张秀荣. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2008,29(5):295.
- [7] 王巧晗,陆兔林,毛春芹,等. 高效液相色谱法测定岩黄连药材中脱氢卡维丁的含量[J]. 中国药师,2008,11(4):434.

[责任编辑 蔡仲德]