

高效液相色谱法测定夏天无中4种生物碱的含量

沈燕^{1*}, 韩超², 夏碧琪², 周永芳², 刘翠平², 刘爱丽¹

(1. 温州大学 化学与材料工程学院, 浙江 温州 325035;

2. 温州出入境检验检疫局, 浙江 温州 325027)

【摘要】 目的: 建立同时分离测定夏天无中原阿片碱、盐酸巴马亭、比枯枯灵、四氢巴马亭4种生物碱含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 ZORBAX Eclipse-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm) 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-乙腈 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果: 在本实验条件下 4 种生物碱有很好的分离, 原阿片碱、盐酸巴马亭、比枯枯灵、四氢巴马亭的质量浓度与峰面积分别在 1.44~46.0 (r=0.999 4), 1.26~40.2 (r=0.999 8), 1.37~44.0 (r=0.999 9), 1.36~43.6 mg·L⁻¹ (r=0.999 9) 呈良好的线性关系, 平均回收率依次为 98.2%, 101.9%, 102.8%, 98.8%, RSD 为 2.7%, 2.5%, 3.5%, 3.1%。结论: 该方法简便易行、准确、重复性好, 可用于夏天无中原阿片碱、盐酸巴马亭、比枯枯灵、四氢巴马亭 4 种生物碱含量测定。

【关键词】 高效液相色谱法; 夏天无; 生物碱

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎, 具有活血通络、行气止痛的功效, 主要用于治疗中风偏瘫、风湿性关节炎、坐骨神经痛等^[1]。原阿片碱 (protopine)、盐酸巴马亭 (palmatine hydrochloride)、比枯枯灵 (bicuculline)、四氢巴马亭 (tetrahydropalmatine) 是夏天无中所含有的 4 种重要的生物碱^[2]。因此建立能准确测定夏天无中这 4 种生物碱组分的方法, 对于其质量控制和确保疗效具有重要的意义。已经报道的原阿片碱等生物碱的含量测定方法有薄层扫描法^[3]、高效液相色谱法^[4]及毛细管电泳法^[5]等。但对夏天无中该 4 种生物碱的高效液相色谱同时测定方法, 国内外尚未见报道。本研究在以往文献的基础上, 首次建立了测定夏天无中原阿片碱、盐酸巴马亭、比枯枯灵、四氢巴马亭 4 种组分含量的高效液相色谱方法, 在实际样品的分析中取得了满意的结果。

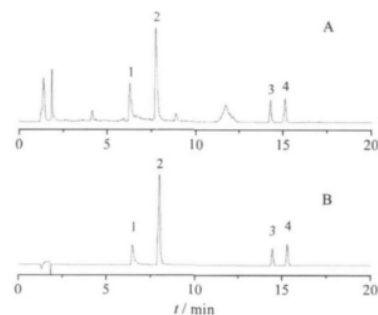
1 材料

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)、P300H 超声波清洗器(德国 Elma 公司)、Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯(德国 MERCK 公司), 其他试剂均为分析纯。原阿片碱、四氢巴马亭、盐酸巴马亭、比枯枯灵(纯

度≥98% 均购自上海诗丹德生物技术有限公司), 夏天无样品购自温州和杭州各大药店, 经温州大学化学与材料工程学院高文霞讲师鉴定为罂粟科植物伏生紫堇 *C. decumbens*。

2 方法

2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 A 为 20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵, 流动相 B 为乙腈。梯度洗脱 0~25 min; 流动相 A-B 的比例为 80:20~20:80; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL, 柱温 30 ℃, 检测波长为 280 nm, 见图 1。



A. 药材; B. 对照品; 1. 原阿片碱; 2. 盐酸巴马亭;
3. 比枯枯灵; 4. 四氢巴马亭。

图1 夏天无药材和对照品的高效液相色谱图

2.2 对照品与供试品溶液配制 精确称取适量原阿片碱、盐酸巴马亭、比枯枯灵、四氢巴马亭对照品,

【稿件编号】 20101009020

【通信作者】 * 沈燕, Tel: (0577) 86689601, E-mail: shenyan@wzu.edu.cn

分别用甲醇溶解并定容于50 mL量瓶,摇匀,配得质量浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准储备液。使用时,用甲醇稀释上述标准储备液,配制不同浓度的混合标准工作溶液。取夏天无粉末0.5 g,室温下分别用30 mL甲醇超声提取2次,每次30 min,超声频率为37 kHz,合并提取液,50 °C减压蒸发,经 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤,滤液定容至50 mL。所有供试品溶液保存于4 °C冰箱中备用。

2.3 线性范围与定量限确定 分别取系列对照品混合液10 μL 进样,按照2.1节色谱条件测定,以各组分峰面积A对相应的质量浓度C回归制备标准曲线。当信噪比(S/N)为10时,确定4种化合物的定量限。结果见表1,表明4种组分的峰面积与进样浓度之间线性关系良好,灵敏度高。

表1 4种组分的回归方程、相关系数、线性范围与定量限(S/N=10)

化合物	线性方程	R^2	线性范围 /mg · L ⁻¹	定量限 /mg · L ⁻¹
原阿片碱	$A = 9.958 \times C - 6.709$	0.999 4	1.44 ~ 46.0	0.69
盐酸巴马亭	$A = 32.428 \times C - 3.925$	0.999 8	1.26 ~ 40.2	0.08
比枯枯灵	$A = 5.665 \times C - 0.229$	0.999 9	1.37 ~ 44.0	0.38
四氢巴马亭	$A = 7.479 \times C - 1.487$	0.999 9	1.36 ~ 43.6	0.31

2.4 精密度试验 在上述色谱条件下,对同一对照品溶液,重复测定6次后证实4种物质在此测定方法下,峰保留时间波动小于0.1 min,测得峰面积的RSD为原阿片碱0.021%;盐酸巴马亭0.025%;比枯枯灵0.014%;四氢巴马亭0.063%,表明精密度良好。

2.5 稳定性试验 取混合对照品以甲醇配制成对照品储备液,置冰箱4 °C保存。在上述色谱条件下,对同一供试品,在保存0, 6, 12, 24, 48 h后,用当日新配制的对照品溶液按外标法测定,并计算其RSD均小于1.8%,说明供试品在48 h内稳定。

2.6 重复性试验 对同一批样品按供试品溶液的制备方法平行制备6份测定,各测定成份含量的RSD依次为1.2%, 1.1%, 0.83%, 1.3%,表明重复性良好。

2.7 回收率试验 精密称取已知4种生物碱含量的夏天无粉末6份,约0.5 g,精密称定,按已知含量的100%水平加入混合标准溶液,按优化的条件进行前处理和测定,计算平均回收率和相对标准偏差

(RSD),所得结果列于表2。

表2 4种生物碱的平均回收率及相对标准偏差

化合物	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
原阿片碱	0.744 6	0.736 2	1.454 3	96.4	2.7
盐酸巴马亭	0.532 7	0.480 5	1.032 9	104.1	2.5
比枯枯灵	0.629 6	0.528 3	1.190 7	106.2	3.5
四氢巴马亭	0.561 6	0.523 2	1.072 2	97.6	3.1

2.8 样品测定 在上述色谱条件下,对2.2所制备的供试品溶液进行检测,所得结果列于表3。本方法定量准确、迅速、重复性好。

表3 不同夏天无样品中4组分的含量 g · kg⁻¹

No.	原阿片碱	盐酸巴马亭	比枯枯灵	四氢巴马亭
1	1.48	1.06	1.25	1.12
2	1.64	1.23	1.04	0.91
3	1.45	1.10	0.84	0.82
4	1.38	1.06	1.12	0.85
5	1.42	1.25	1.07	0.94
6	1.50	1.33	1.17	0.97

3 讨论

本实验中先采用保留时间对照法进行初步定性,进而用二极管阵列紫外检测技术在200 ~ 400 nm范围内采集4种生物碱对照品色谱峰所对应的紫外光谱图,表明原阿片碱、盐酸巴马亭、比枯枯灵、四氢巴马亭在280 nm的时候有最大吸收,故选用280 nm作为检测波长。将所得样品图谱的形状、吸收带位置及相对强度与标准品图谱比较对照定性。

分别采用乙腈-水、甲醇-0.2%乙酸水溶液、乙腈-20 mmol · L⁻¹乙酸铵缓冲液作为流动相,比较4种组分的分离情况,结果发现选用乙腈-20 mmol · L⁻¹乙酸铵缓冲液能使4种生物碱得到很好的分离,且峰形良好。

[参考文献]

[1] 王岱杰,刘建华,耿岩玲,等. 夏天无生物碱的高速逆流色谱分离纯化[J]. 分析化学, 2010, 38(6): 783.
 [2] Liao J, Liang W Z, Tu G T. Isolation and identification of eleven tertiary alkaloids in *Corydalis decumbens* [J]. Chin J Pharmaceutical Sci, 1995, 4(2): 57.
 [3] 罗跃华,熊蔚,吴朝阳. 薄层扫描法测定夏天无片中原阿片碱的含量[J]. 中成药, 1999, 21(10): 531.
 [4] 文怀秀,邵赞,陶燕锋,等. RP-HPLC法测定藏药细果角茴香

- 中原阿片碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 1: 137. 中延胡索乙索的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(5): 336.
[5] 姜舜尧, 宋景政, 周明昊, 等. 高效毛细管电泳测定夏天无药材

Determination of four alkaloids in *Corydalis decumbens* by HPLC

SHEN Yan^{1*}, HAN Chao², XIA Biqu², ZHOU Yongfang², LIU Cuiping², LIU Aili¹

(1. College of Chemistry and Materials Engineering, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China;

2. Wenzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Wenzhou 325027, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative HPLC method for determination of protopine, palmatine hydrochloride, bicuculline and tetrahydropalmatine, in *Corydalis decumbens*. **Method:** The separation was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ using mixtures of two solvents [A(20 mmol · L⁻¹ ammonium acetate)-B(acetonitrile)]: with a gradient elution. The column oven temperature was 30 °C and the detection wavelength was set at 280 nm. **Result:** The 4 alkaloids were well separated by this HPLC method. Linearities of protopine, palmatine hydrochloride, bicuculline and tetrahydropalmatine were good in the ranges of 1.44-46.0 ($r=0.9994$), 1.26-40.2 ($r=0.9998$), 1.37-44.0 ($r=0.9999$), and 1.36-43.6 mg · L⁻¹ ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries were 98.2% with RSD 2.7% for protopine, 101.9% with RSD 2.5% for palmatine hydrochloride, 102.8% with RSD 3.5% for tetrahydropalmatine, and 98.8% with RSD 3.1% for tetrahydropalmatine. **Conclusion:** This method is proved to be convenient, reliable and accurate, and it can be used for quality control of *C. decumbens*.

[Key words] High performance liquid chromatography (HPLC); *Corydalis decumbens*; alkaloids

doi: 10.4268/cjcm20111522

[责任编辑 丁广治]

本刊重要启事

本刊已开通在线支付功能,作者请登录本刊网站 www.cjcm.com.cn “作者中心”,点击在线充值,可以选择网上银行(没开通网银功能的帐户可以选择信用卡充值)和手机充值卡2种充值方式,充值成功后系统会显示您的账号余额。然后您可以根据稿件状态和编辑部邮件通知来缴纳相应的费用,如审稿费,发表费等。如有疑问请咨询周驰编辑:13810178861 21310385@qq.com。