

RP-HPLC 测定白屈菜药材中白屈菜碱的含量

曲中原¹, 王嘉琪², 邹晓祺², 刘影², 石鑫¹, 邹翔^{3*}

¹哈尔滨商业大学药学院; ²国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心;

³哈尔滨商业大学药物所博士后科研工作站, 哈尔滨 150076

摘要: 选用超声波、热回流和索氏 3 种提取方法, 甲醇、丙酮和氯仿 3 种提取溶剂提取白屈菜中的白屈菜碱, 考察最佳提取方法和提取溶剂, 采用高效液相色谱法测定白屈菜碱含量。采用 Diamonsil C₁₈ 反相色谱柱为分析柱, 以乙腈-1% 三乙胺溶液 (20: 80) (三乙胺用磷酸调节 pH 至 3.0) 为流动相, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 290 nm。获得最佳提取方法为索氏提取法, 最佳提取溶剂为丙酮, 测得白屈菜中白屈菜碱的含量为 0.118%。白屈菜碱在 0.01 ~ 0.10 mg/mL 范围内呈良好线性关系, $r = 0.9999$ ($n = 6$), 通过方法学考察, 回收率为 $97.48\% \pm 1.46\%$, RSD 为 1.50%。实验结果表明丙酮索氏提取法能较全面的提取白屈菜中的白屈菜碱, 利用高效液相色谱法含量测定, 简便快速, 准确可靠, 可用于白屈菜药材及其制剂的质量控制。

关键词: 白屈菜; 白屈菜碱; 提取方法; 提取溶剂; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.019

Determination of Chelidone in *Chelidonium majus* Using Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography

QU Zhong-yuan¹, WANG Jia-qi², ZOU Xiao-qi², LIU Ying², SHI Xin¹, ZOU Xiang^{3*}

¹ College of Pharmacy, Harbin University of Commerce; ² Engineering Research Center of Natural Antineoplastic Drugs, Ministry of Education; ³ Post Doctoral Research Center of material Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: In order to select the best extraction method and extraction solvent, the extraction methods including ultrasonic, hot reflux and soxhlet and the extraction solvents including methanol, acetone and chloroform were used to extract chelidone from *Chelidonium majus*. The content of chelidone was determined by HPLC. Diamonsil C₁₈ reverse phase column was used as chromatographic analysis column. The mobile phase was acetonitrile-1% triethylamine (20: 80) (adjusted pH to 3 using phosphoric acid) and the UV detection wavelength was 290 nm. The best extraction method was determined to be soxhlet extraction and the best extraction solvent was acetone. The content of chelidone in *C. majus* was 0.118%. The linear range of chelidone was 0.01-0.10 mg/mL ($r = 0.9999$, $n = 6$). The average recovery was $97.48\% \pm 1.46\%$, RSD was 1.50%. Experimental results showed that acetone soxhlet extraction method can more comprehensively extract chelidone in *C. majus*. The developed HPLC method was simple, rapid and accurate. It can be used for quality control of *C. majus* and its preparations.

Key words: *Chelidonium majus*; chelidone; extraction method; extraction solvent; HPLC

中药白屈菜为罂粟科植物白屈菜 (*Chelidonium majus* L.) 的带花干燥全草, 始载于《救荒本草》^[1]。在夏秋季采割, 阴干或鲜用都可入药。性凉, 味苦; 有毒。归肺、胃经。解痉止痛, 止咳平喘。临床上多用于胃脘疼痛, 咳嗽气喘, 百日咳。白屈菜的主要有

效成分是生物碱类物质, 包括白屈菜碱、白屈菜红碱、血根碱、原阿片碱、隐品碱、黄连碱等^[2]。目前, 中药白屈菜收载于《中国药典》(2010 版, 一部), 其质量标准是通过高效液相测定白屈菜红碱的含量来评价药材的质量^[3]。白屈菜红碱具有抗菌、抑菌、清热解毒、抗菌消炎的作用, 白屈菜碱具有镇痛^[4]、抑制各种平滑肌等作用^[5], 从现代药理学研究来看, 白屈菜碱与白屈菜“解痉止痛, 止咳平喘”的功效更加相印证。所以白屈菜中白屈菜碱含量的高低也是反映药材质量的一个重要指标。本文建立白屈

收稿日期: 2014-05-29 接受日期: 2014-08-20

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81102858); 中国博士后科学基金 (2013M531060); 黑龙江省博士后科研基金 (LBH-Z11103); 黑龙江省骨干教师项目 (1154G35); 黑龙江省自然科学基金 (D200817)

* 通讯作者 Tel: 86-451-84865483; E-mail: zou8663202@163.com

菜药材中白屈菜碱 HPLC 含量测定方法,为进一步完善白屈菜质量评价方法奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 (Agilent 公司);Diamondsil C₁₈ 反相色谱柱 (200 × 4.6 mm, 5 μm);T6 新世纪紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司);FW100 型高速万能粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅 (江苏省常州市恒久仪器制造有限公司);BSA124S 分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司];KQ5200DB 型数显超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司);JM-B2002 型电子天平 (余姚市纪铭称重校验设备有限公司)。

1.2 试剂

乙腈 (赛默飞世尔科技有限公司, 色谱纯)、三乙胺 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 色谱纯)、甲醇 (色谱纯)、丙酮 (色谱纯)、氯仿 (色谱纯)、磷酸 (天津市天力化学试剂有限公司), 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团)。

1.3 药材、标准品

白屈菜中药饮片 (购自安徽亳州本草药业, 批号 20130420, 经哈尔滨商业大学药学院金哲雄教授鉴定)。白屈菜碱对照品 (深圳市美荷生物科技有限公司, 纯度 98%)。

2 方法与结果

2.1 提取方法的筛选

2.1.1 甲醇超声提取法

取白屈菜粉末 (过三号筛) 5.00 g, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇水溶液 (4:1, V:V) 200 mL, 称定重量, 超声震荡 40 min, 放冷, 在称定重量, 用甲醇水溶液 (4:1, V:V) 混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 100 mL, 蒸干, 残渣加 50% 甲醇使溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.2 甲醇热回流法

取白屈菜粉末 (过三号筛) 5.00 g, 置圆底烧瓶中, 精密加甲醇水溶液 (4:1, V:V) 200 mL, 称定重量, 加热回流 1.5 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇水溶液 (4:1, V:V) 混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 100 mL, 蒸干, 残渣加 50% 甲醇使

溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.3 甲醇索式提取法

取白屈菜粉末 (过三号筛) 5.00 g, 滤纸包裹, 放置索式提取器中, 平底烧瓶精密加甲醇水溶液 (4:1, V:V) 200 mL, 称定重量, 第一次虹吸开始计时, 加热回流 8h, 提至无色, 放冷, 再称定重量, 用甲醇水溶液 (4:1, V:V) 混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 100 mL, 蒸干, 残渣加 50% 甲醇使溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2 提取溶剂的筛选

称取 3 份白屈菜粉末 (过三号筛) 5.00 g, 1 号和 2 号粉末用滤纸包裹好放到索式提取器中, 3 号粉末加入氨水 5 mL, 浸泡 30 min 后用滤纸包裹好放到索式提取器中。在 3 个平底烧瓶里分别装入甲醇水溶液 (4:1, V:V), 丙酮水溶液 (4:1, V:V), 氯仿溶液 (3 号粉末) 200 mL, 称定重量, 放到水浴锅中加热回流。从第 1 次虹吸开始计时, 提取至溶剂无色, 提取时间分别是 8、4、4 h, 放冷, 再称定重量, 分别用提取溶剂补足减失重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 100 mL, 蒸干, 残渣加 50% 甲醇使溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 RP-HPLC 法测定白屈菜中白屈菜碱含量

2.3.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-1% 三乙胺溶液 (磷酸调 pH 值至 3.0) (20:80) 为流动相;检测波长为 290 nm (见图 1)。理论板数按白屈菜碱峰计算应不低于 2000。

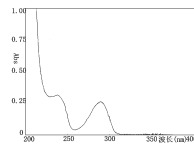


图 1 白屈菜碱紫外光谱图

Fig. 1 UV spectrum of chelidone

2.3.2 对照品溶液的制备

精密称取 5.0 mg 白屈菜碱对照品, 置于 50 mL 容量瓶中, 用 50% 乙腈溶解并定容, 制成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

取“2.1”和“2.2”项下样品溶液各 2 mL, 分别转移至 10 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇定容, 摇匀, 即

得。将所得溶液以 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,作为供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察

精密吸取白屈菜碱对照品溶液 1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 分别置 10 mL 容量瓶中,加 50% 乙腈定容,0.45 μm 微孔滤膜过滤后分别进样 20 μL ,测定吸收峰面积。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为: $Y = 11363X + 85.656$ ($r = 0.9999$),白屈菜碱在 0.01 ~ 0.10 mg/mL 范围内呈良好线性关系。

2.3.5 方法学考察

2.3.5.1 精密度试验

按“2.3.1”项下色谱条件,精密吸取白屈菜丙酮索氏提取溶液 20 μL ,测定白屈菜碱色谱峰峰面积,连续测定 6 次,RSD 为 0.38% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.3.5.2 稳定性试验

按“2.3.1”项下色谱条件,取白屈菜丙酮索氏提取溶液,分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样 20 μL ,测定白屈菜碱色谱峰峰面积,RSD 为 0.62% ($n = 6$),表明对照品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.3.5.3 重复性试验

取白屈菜粉末 6 份,按丙酮索氏提取方法平行

制备,取白屈菜丙酮索氏提取溶液,分别进样 20 μL ,按上述色谱条件测定白屈菜碱色谱峰峰面积,RSD 为 1.82% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

2.3.5.4 回收率试验

精密量取白屈菜粉末(白屈菜碱含量为 0.118%) 6 份,每份 1.00 g,分别加入白屈菜碱对照品 1.0 mg,按丙酮索氏提取方法处理,按上述色谱条件测定白屈菜碱含量,计算回收率为 $97.48 \pm 1.46\%$,RSD 为 1.50% ($n = 6$),表明该含量测定结果准确。

2.3.6 样品测定

取供试品溶液,按上述色谱条件测定样品中白屈菜碱色谱峰峰面积,以标准曲线计算白屈菜碱的含量。

2.3.6.1 不同提取方法对白屈菜中白屈菜碱影响

选用甲醇为提取溶剂,考察了超声、热回流和索氏三种提取方法对白屈菜中白屈菜碱含量的影响。结果如表 1,图 2(B ~ D)所示,索式提取白屈菜中的白屈菜碱比超声法和热回流法要完全,根据测定结果计算含量为 0.112%。超声法提取含量为 0.080%,热回流法提取含量最低,仅为 0.100%,故最优提取方法选择索式提取法。

表 1 不同提取方法对白屈菜中白屈菜碱含量的影响

Table 1 Effects of different extraction methods on the content of chelidonium in *C. majus*

方法 Method	峰面积(mAU) Peak area	浓度(mg/mL) Concentration	含量(%) Content
甲醇超声提取 Methanol ultrasonic extraction	537.0	0.040	0.080
甲醇热回流提取 Methanol heat reflux extraction	695.5	0.050	0.100
甲醇索式提取 Methanol soxhlet extraction	719.8	0.056	0.112

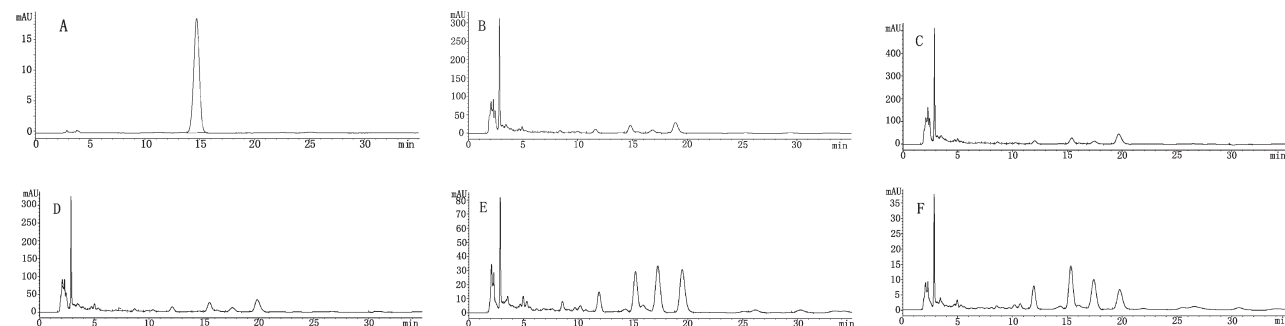


图 2 白屈菜碱对照品与供试品高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of chelidonium reference and samples

注:A:对照品;B:甲醇超声提取供试品;C:甲醇热回流提取供试品;D:甲醇索式提取供试品;E:丙酮索式提取供试品;F:氯仿索式提取供试品

Note: A: Reference; B: methanol ultrasonic extraction sample; C: methanol heat reflux extraction sample; D: methanol soxhlet extraction sample; E: acetone soxhlet extraction sample; F: chloroform soxhlet extraction sample

2.3.6.2 不同提取溶剂对白屈菜中白屈菜碱含量的影响

选用索氏提取法,考察了甲醇、丙酮和氯仿三种提取溶剂对白屈菜中白屈菜碱含量的影响。结果如表 2,图 2(D~F)所示,丙酮提取白屈菜中的白屈菜

碱比甲醇和氯仿要完全,根据测定结果计算含量为 0.118%。甲醇索氏提取含量为 0.112%,氯仿索氏提取含量最低,仅为 0.052%,故最优提取溶剂选择丙酮。

表 2 不同提取溶剂对白屈菜中白屈菜碱含量的影响

Table 2 Effects of different extraction solvents on the content of chelidonium in *C. majus*

溶剂 Solvent	峰面积 Peak area (mA)	浓度 Concentration (mg/mL)	含量 Content (%)
甲醇索式提取 Methanol soxhlet extraction	719.8	0.056	0.112
丙酮索式提取 Acetone soxhlet extraction	753.7	0.059	0.118
氯仿索式提取 Chloroform soxhlet extraction	375.8	0.026	0.052

3 讨论

3.1 关于对照品溶液的制备

白屈菜碱对照品用纯乙腈溶解,进样后主峰前面出现肩峰,当改用 50% 乙腈溶解,制成的对照品溶液的峰形得到改善。

3.2 关于流动相的制备

以乙腈-1% 三乙胺溶液(磷酸调 pH 值至 3.0)作为流动相,三乙胺和磷酸都具有挥发性,所以流动相最好当天配制,否则会影响出峰时间。

3.3 关于白屈菜碱的提取方法选择

白屈菜溶于甲醇、乙醇、氯仿及戊醇,几乎不溶于水。目前有很多关于白屈菜生物碱提取的报道。董晶晶等^[6]研究表明以丙酮为提取溶剂索式法提取白屈菜,提取物中白屈菜碱含量较高,而其他生物碱含量较少。夏成才等^[7]采用氯仿为提取溶剂碱化法索式提取白屈菜总生物碱。《中国药典》收录的白屈菜质量标准是以白屈菜红碱为评价指标,供试品溶液选用甲醇热回流进行制备^[3]。综合考虑,本研究采用甲醇、丙酮和氯仿 3 种溶剂,超声波、热回流和索氏 3 种提取方法提取白屈菜中白屈菜碱,系统分析白屈菜碱适宜的提取方法和提取溶剂。实验结果表明丙酮为最适提取溶剂,索氏提取为最适提取方法,丙酮索氏提取法可作为白屈菜质量评价供试品的制备方法。丙酮沸点低、易燃,安全性较差,实验室小量提取尚好控制,而对于大规模提取危险性较大。而且由表 2 可知,甲醇与丙酮提取白屈菜碱含量相差不大,因此,在保证白屈菜碱稳定、提取率高而并适用于大规模提取的前提下,溶剂建议选用甲醇。从表 1 可知,索式提取法与热回流提取

法所得白屈菜碱含量相差不大,且热回流法耗时短,提取方便,从此角度考虑选用热回流法提取白屈菜中白屈菜碱更适宜一些。

参考文献

- 1 Nanjing University of Traditional Chinese Medicine(南京中医药大学). The Dictionary of Chinese Herbal Medicine, 2nd Edition(中药大辞典, 第二版). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers(上海科学技术出版社), 2006. 1000.
- 2 Huang S(黄松), Du FL(杜方麓). Research progress on *Papaveraceae chelidoniaeae* chemical component and phytochemistry classification basis. *Hunan Guiding J TCMP*(湖南中药导报), 2002, 8: 582-584.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 100-101.
- 4 He ZM(何志敏), Tong JM(佟继铭), Gong FC(宫凤春). Study on the analgesic effect of *Chelidonium majus* L. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2003, 34: 837-838.
- 5 Gu Y(顾悦). Studies on quality valuation of *Chelidonium majus* L. Zhenjiang, Jiangsu University(江苏大学), MSc. 2010.
- 6 Dong JJ(董晶晶), Guo ZF(郭志峰), Wu XY(武晓阳), et al. A simple method for separation of chelidonium from herbal *Chelidonium majus* L. *Chin J Anal Lab*(分析实验室), 2013, 32(6): 90-92.
- 7 Xia CC(夏成才), Xiao YL(肖玉良), Wang CY(王彩云), et al. Study on the extraction process of total alkaloids of *Chelidonium majus* L. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21: 3216-3217.