

高效液相色谱法测定延胡索药材中 7 种异喹啉类生物碱的含量

赵新娟¹, 沈梅², 石俊敏³, 韩伟立^{2*}

¹山西省晋中市第一人民医院药剂科, 晋中 030600; ²南方医科大学公共卫生与热带医学学院 卫生检测中心, 广州 510515; ³华南师范大学药物研究院, 广州 510632

摘要: 本文建立了同时测定延胡索中巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱 7 种主要异喹啉生物碱含量的高效液相色谱方法, 并考察了不同来源延胡索中异喹啉生物碱的含量。采用 Agilent SB C₁₈ 柱色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 的醋酸水溶液 (三乙胺调 pH 至 5.0), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm。巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱在 2.0 ~ 40.1、2.0 ~ 39.5、5.1 ~ 101.3、5.0 ~ 99.8、2.1 ~ 41.2、5.0 ~ 100.1 μg/mL 和 2.0 ~ 39.7 μg/mL 浓度范围内线性良好, 平均加样回收率分别为 95.6%、96.1%、96.5%、101.4%、101.9%、97.3% 和 102.3%, RSD 分别为 2.77%、2.50%、3.33%、4.18%、2.93%、2.86% 和 2.60%。不同来源延胡索样品中 7 种异喹啉类生物碱含量差异较大, 研究表明该方法准确、可靠, 可用于延胡索原药材质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 异喹啉类生物碱; 延胡索; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.015

Simultaneous Determination of 7 Isoquinoline Alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by High Performance Liquid Chromatography

ZHAO Xin-juan¹, SHEN Mei², SHI Jun-min³, HAN Wei-li^{2*}

¹Department of Pharmacy, The first people's Hospital of Jinzhong city in Shanxi Province, Jinzhong 030600, China;

²Hygiene Detection Center, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

³Southern Institute of Pharmaceutical Research, South China Normal University, Guangzhou 510632, China

Abstract: In this paper, a HPLC method was established for the simultaneous determination of palmatine, berberine, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, isocorybulbine, corydaline and tetrahydrocoptisine in *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang, and to investigate content of 7 isoquinoline alkaloids in *C. yanhusuo* samples from different resources. The chromatographic separation was carried out on an Agilent SB C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% acetic acid aqueous solution (adjusted pH to 5.0 by triethylamine) as mobile phases, flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 280 nm. Good linearities of palmatine, berberine, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, isocorybulbine, corydaline and tetrahydrocoptisine were achieved within the range of 2.0-40.1, 2.0-39.5, 5.1-101.3, 5.0-99.8, 2.1-41.2, 5.0-100.1 and 2.0-39.7 μg/mL, respectively. The average recoveries were 95.6%, 96.1%, 96.5%, 101.4%, 101.9%, 97.3% and 102.3%; The RSD were 2.77%, 2.50%, 3.33%, 4.18%, 2.93%, 2.86% and 2.60%, respectively. The content of 7 isoquinoline alkaloids in *C. yanhusuo* samples was distinct difference from different resources. The developed method was accurate and can be used for quality control of *C. yanhusuo*.

Key words: HPLC; isoquinoline alkaloids; *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang; content determination

延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的干燥块茎, 其具有活血、利气和止痛的功效。临床上主要用于治疗胸胁、脘腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻和跌打肿痛等症^[1]。在 2010 年版《中国药典》中, 接近 30% 的复方制剂中

使用了延胡索^[2]。建立全面有效的延胡索药材质量评价方法, 直接关系到延胡索相关药品及临床处方使用安全及疗效。

现代药理研究表明, 延胡索中主要活性成分为异喹啉类生物碱, 目前延胡索的质量控制多以异喹啉类生物碱四氢巴马汀作为主要指标, 具体方法包括化学发光法、紫外分光光度法、高效液相色谱法及

质谱法等^[3-6]。然而,延胡索中除四氢巴马汀外,其它异喹啉类生物碱也具有显著的生理活性且含量较大,如小檗碱具有抗肿瘤作用^[7],四氢黄连碱具有抗焦虑作用^[8]等。显然用单一成分(四氢巴马汀)很难全面控制延胡索药材的内在质量。延胡索多组分质量控制在国内亦有相关报道,其中周卿^[9]等对延胡索中四种生物碱,高建莉^[10]等对延胡索中五种生物碱的含量进行了多组分质量控制研究的尝试,而针对更多活性组分的质量控制研究,在国内文献上报道相对较少。因此,本课题组在前期对延胡索化学成分研究的基础上^[11],利用高效液相色谱法对延胡索药材中含量较大的7种异喹啉生物碱类成分(巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱及四氢黄连碱)进行了定性及定量分析,并分别考察了不同购买地延胡索药材中7种生物碱的含量,以期对延胡索原药材较为合理的质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪(Waters Corp., USA),包括2695型分离色谱系统和2996型光电二极管阵列检测器。加热回流装置BUCHI Syncore系统(BUCHI Corp., German)。所用乙腈、冰醋酸和三乙胺均为色谱纯(Merck Corp., USA),水为超纯去离子水(Millipore Corp., USA)。巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱对照品均为自制^[11],纯度均高于96%。市售延胡索药材分别购于浙江、安徽、陕西及广东,由山西中医药大学中药鉴定室王兵鉴定为延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

取0.5 g干燥延胡索药材粉末(过60目筛),精密称定,加入浓氨试液-甲醇(1:20)混合溶液50 mL,称定重量,冷浸1 h后加热回流1 h,放冷,再称定重量,用浓氨试液-甲醇(1:20)混合溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液25 mL,旋转蒸发仪回收溶剂,残渣加甲醇溶解,定容至5 mL。用0.45 μm滤膜过滤,取续滤液备用。

2.2 标准品溶液的制备

分别精密称取巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱标准品4.01、3.95、10.13、9.98、4.12、10.01和3.97 mg,置于10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得浓度为0.401 mg/mL的巴马汀,0.395 mg/mL的小檗碱、1.013 mg/mL的去氢紫堇碱、0.998 mg/mL的四氢巴马汀、0.412 mg/mL的异紫堇球碱、1.001 mg/mL的紫堇碱和0.397 mg/mL的四氢黄连碱混合对照品储备溶液。

2.3 液相色谱条件

色谱柱:Agilent SB C₁₈柱(4.6 × 250 mm, 5 μm);保护柱:Agilent SB C₁₈柱(4.6 × 12.5 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A),0.1%的醋酸水溶液(三乙胺调pH至5.0)(B),采用梯度洗脱方式:0~18 min,30% A;18~35 min,30%~80% A;35~40 min,80% A;40~42 min,80%~30% A;42~45 min,30% A。流速为1.0 mL/min,检测波长为280 nm,进样量10 μL,柱温30℃。药材样品中各定量成分与标准品生物碱成分色谱峰保留时间一致,紫外谱图一致。色谱图见图1。

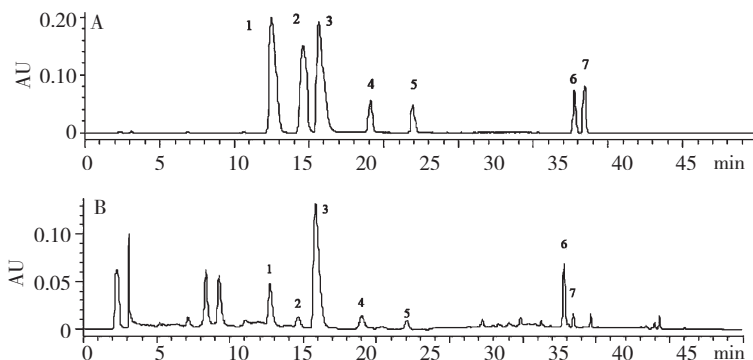


图1 混合对照品(A)和延胡索样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mix standard (A) and *C. yanhusuo* sample (B)

1. 巴马汀 palmatine; 2. 小檗碱 berberine; 3. 去氢紫堇碱 dehydrocorydaline; 4. 四氢巴马汀 tetrahydropalmatine; 5. 异紫堇球碱 isocorybulbine; 6. 紫堇碱 corydaline; 7. 四氢黄连碱 tetrahydrocoptisine

2.4 线性关系考察

吸取“2.2”项中混合对照品储备溶液, 甲醇分别稀释 10、20、40、80、100、200 倍, 按照 2.3 项下色

谱条件进行分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行回归分析, 结果见表 1。

表 1 7 个异喹啉生物碱的线性方程

Table 1 Calibration curve and linear ranges of the 7 investigated isoquinoline alkaloids

| 异喹啉生物碱 Isoquinoline alkaloids | 线性方程 Regression equation | 相关系数 <i>r</i> | 线性范围 linear range ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------|---|
| 巴马汀 Palmatine | $y = 36934x + 21.879$ | 0.9999 | 2.0 ~ 40.1 |
| 小檗碱 Berberine | $y = 25544x + 19.908$ | 0.9999 | 2.0 ~ 39.5 |
| 去氢紫堇碱 Dehydrocorydaline | $y = 34669x + 23.367$ | 0.9999 | 5.1 ~ 101.3 |
| 四氢巴马汀 Tetrahydropalmatine | $y = 9219.9x + 4.6115$ | 0.9998 | 5.0 ~ 99.8 |
| 异紫堇球碱 Isocorybulbine | $y = 8559.0x - 5.7501$ | 0.9998 | 2.1 ~ 41.2 |
| 紫堇碱 Corydaline | $y = 9143.3x + 8.3281$ | 0.9999 | 5.0 ~ 100.1 |
| 四氢黄连碱 Tetrahydrocoptisine | $y = 10847x + 8.4022$ | 0.9990 | 2.0 ~ 39.7 |

2.5 精密度试验

2.5.1 日内精密度试验

取混合对照品溶液, 按样品测定项下色谱条件进行 HPLC 分析, 重复进样 6 次, 结果显示巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.17%、0.24%、0.24%、0.70%、0.45% 和 0.17%。

2.5.2 日间精密度试验

取混合对照品溶液, 连续 3 日, 每日连续进样 2 针, 测定结果显示巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱峰面积的 RSD 分别为 0.45%、0.29%、0.37%、0.27%、1.83%、0.33% 和 0.28%。以上结果表明色谱系统稳定, 仪器精密度良好。

2.6 重复性实验

精密称取 6 份相同的延胡索样品粉末, 按照样品测定项下方法进行测定, 得到相应的峰面积并计算含量, 结果显示巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱成分含量

的 RSD 分别为 3.41%、3.51%、3.59%、2.88%、3.75%、1.60% 和 3.48%, 结果表明该方法重现性好。

2.7 稳定性实验

取混合对照品溶液, 进样量为 10 (μL), 分别于 0、2、4、6、8、10 h 在样品测定项下方法进行测定, 计算峰面积 RSD, 结果显示巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱和四氢黄连碱样品峰面积 RSD 分别为 0.23%、0.14%、0.18%、0.34%、0.56%、0.59% 和 0.26%。表明试样溶液在 10 h 内具有良好的稳定性。

2.8 加样回收率实验

精密称取 0.50 g 的 9 份已知含量的延胡索药材粉末, 加入低、中、高 3 个浓度的混合标准品溶液 (其中中浓度相当于 7 种待测生物碱在药材中的实际含量), 具体数据见表 1, 按“2.1”项中方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项中色谱条件进样测定, 计算含量及加样回收率结果见表 2。

表 2 加样回收率 ($n=3$)

Table 2 Results of recovery tests ($n=3$)

| 异喹啉生物碱 Isoquinoline alkaloids | 样品含量 Original amount (μg) | 加入量 Added amount (μg) | 测量值 Detected amount (μg) | 回收率 Recovery (%) | 平均回收率 Average recovery (RSD) (%) |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|--|---------------------|-------------------------------------|
| 巴马汀 Palmatine | 73.4 | 60.2 | 131.2 | 96.0 | 95.6(2.77) |
| | 73.5 | 72.2 | 142.1 | 95.1 | |
| | 73.4 | 88.2 | 157.9 | 95.7 | |
| 小檗碱 Berberine | 29.8 | 23.7 | 52.6 | 96.7 | 96.1(2.50) |

| | | | | | |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| | 29.8 | 29.6 | 57.9 | 95.2 | |
| | 29.8 | 35.6 | 64.0 | 96.4 | |
| 去氢紫堇碱 Dehydrocorydaline | 399.2 | 319.1 | 708.1 | 96.8 | 96.5(3.33) |
| | 398.6 | 405.2 | 792.5 | 97.2 | |
| | 399.4 | 476.1 | 853.0 | 95.4 | |
| 四氢巴马汀 Tetrahydropalmatine | 234.5 | 199.6 | 435.0 | 100.5 | 101.4(4.18) |
| | 234.5 | 234.5 | 481.9 | 105.5 | |
| | 234.6 | 284.4 | 522.6 | 101.3 | |
| 异紫堇球碱 Isocorybulbine | 28.1 | 22.7 | 50.8 | 99.9 | 101.9(2.93) |
| | 28.4 | 28.8 | 57.8 | 103.1 | |
| | 27.8 | 35.0 | 63.9 | 102.7 | |
| 紫堇碱 Corydaline | 343.2 | 275.3 | 610.5 | 97.1 | 97.3(2.86) |
| | 343.5 | 350.3 | 682.4 | 96.7 | |
| | 343.1 | 410.4 | 746.1 | 98.2 | |
| 四氢黄连碱 Tetrahydrocoptisine | 55.9 | 44.7 | 101.7 | 102.4 | 102.3(2.60) |
| | 55.8 | 56.6 | 114.5 | 103.5 | |
| | 56.1 | 69.5 | 126.2 | 100.9 | |

2.9 样品测定

取不同来源[安徽合肥(A)、浙江杭州(B)、陕西宝鸡(C)、广东珠海(D)]延胡索药材制备定量供试品溶液,按标准曲线外标法计算供试品中各生物

碱含量,结果见表3。

$$\text{样品含量}(\text{mg/g}) = \frac{(\text{峰面积} - \text{截距}) \times 5 \times 2}{\text{斜率} \times \text{药材重量} \times 1000}$$

表3 不同购买地延胡索中7种异喹啉生物碱的含量

Table 3 Determination 7 isoquinoline alkaloids in *C. yanhusuo* from different purchase places

| 来源 Resources | 含量 Content (mg/g) (n=3) | | | | | | |
|-----------------|-------------------------|------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------------|
| | 巴马汀 Palmatine | 小檗碱 Berberine | 去氢紫堇碱 Dehydrocorydaline | 四氢巴马汀 Tetrahydropalmatine | 异紫堇球碱 Isocorybulbine | 紫堇碱 Corydaline | 四氢黄连碱 Tetrahydrocoptisine |
| A | 0.147 | 0.060 | 0.798 | 0.469 | 0.056 | 0.686 | 0.112 |
| B | 0.431 | 0.109 | 1.747 | 0.588 | 0.189 | 0.889 | 0.161 |
| C | 0.263 | 0.081 | 1.582 | 1.015 | 0.070 | 1.615 | 0.354 |
| D | 0.238 | 0.084 | 1.295 | 0.858 | 0.056 | 0.987 | 0.203 |

3 讨论与结果

本文在优化流动相过程中,考察了甲醇-水和乙腈-水系统,分别加入醋酸、醋酸铵、醋酸和三乙胺等;同时还对不同pH值(pH 4.5、5和6)及不同醋酸浓度(0.1%和0.2%)的分离效果进行了测试。其中乙腈-0.1%的醋酸水溶液(三乙胺调pH至5.0)系统效果最好,此外,等度洗脱不能达到7种异喹啉生物碱的基线分离,故采用了梯度洗脱。从色谱图看,各个色谱峰均能得到很好的分离。

本文利用建立的分析方法对不同购买地市场延胡索药材中巴马汀、小檗碱、去氢紫堇碱、四氢巴马汀、异紫堇球碱、紫堇碱及四氢黄连碱的含量进行了测定。实验结果显示,《中国药典》2010版中延胡索含量测定的指标化合物四氢巴马汀所占药材生物碱含量在不同购买药材中并非含量最高(去氢紫堇碱及紫堇碱含量较四氢巴马汀高),此外不同市场药材中7种异喹啉生物碱的含量存在较大的差异。因此单一使用四氢巴马汀作为延胡索的质量控制指标是不妥的,建议对延胡索药材采用多指标质量控制。

参考文献

- 1 National Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中国药典). Beijing: China Science and Technology Press, 2010. Vol I, 130.
 - 2 He K (贺凯), Gao JL (高建莉), Zhao GS (赵光树). Advances in studies on chemistry, pharmacology, and quality control of *Corydalis yanhusuo*. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 1909-1911.
 - 3 Li LQ (李丽清), Zhou YM (周艳梅), Feng ML (封满良), et al. Study on chemiluminescence system of potassium permanganate-sodium thiosulfate-tetrahydropalmatine. *J Shandong Univ* (山东大学学报), 2002, 37: 78-83.
 - 4 Wang J (王捷), Liu ZH (刘宗河), Jiao AJ (焦爱军), et al. Content determination of dl-tetrahydropalmatine of compound Jin Pu tablet by ultraviolet spectrophotometry. *Guangxi Med J* (广西医学), 2004, 26: 1770-1772.
 - 5 Liu H (刘泓), Yang YL (杨亚莉), Fan B (范斌). Content determination of protopine and tetrahydropalmatine in *Rhizoma Corydalis* by HPLC. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2007, 13(7): 9-10.
 - 6 Cheng ZH, Guo YL, Wang HY, et al. Qualitative and quantitative analysis of quaternary ammonium alkaloids from *Rhizoma Fourier* transform mass spectrometry coupled with a selective precipitation reaction using reinecke salt. *Anal Chim Acta*, 2006, 555: 269-227.
 - 7 Jantova S, Cipak L, Letasiova S. Berberine induces apoptosis through a mitochondrial/caspase pathway in human promonocytic U937 cells. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21: 25-31.
 - 8 Wai CL, Hui Z, Michael H, et al. Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze. *Prog Neuro-Psycho Pharmacol Biol Psychiat*, 2003, 27: 775-779.
 - 9 Zhou Q (周卿), Shang JC (尚京川). Determination of four alkaloids in *Corydalis yanhusuo* by HPLC-DAD. *J Chongqing Med Univ* (重庆医科大学学报), 2014, 39: 1017-1019.
 - 10 Gao JL (高建莉), Chen ZF (陈兆飞), Shi JM (石俊敏), et al. Content determination of 5 kinds of alkaloids in *Corydalis yanhusuo* and stability study. *J China Pharm* (中国药房), 2012, 23: 1386-1388.
 - 11 Shi JM (石俊敏), Han WL (韩伟立), Ye WC (叶文才), et al. Phytochemical investigation of *Corydalis yanhusuo*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 647-651.
-
- (上接第 2049 页)
- 10 Yang L, Qiao L, Xie D, et al. 2-(2-phenylethyl) chromones from Chinese eaglewood. *Phytochemistry*, 2012, 76: 92-97.
 - 11 Mei QX (梅全喜), Li HN (李红念), Lin HZ (林焕泽), et al. Comparative study of hypoglycemic activity between Chinese eaglewood and Chinese eaglewood leaves. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2013, 24: 1606-1607.
 - 12 Naef R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species; a review. *Flavour Fra J*, 2011, 26(2): 73-87.
 - 13 Yang JS (杨峻山), Wang YL (王玉兰), Su YL (苏亚伦). Studies on the chemical constituents of *Aquilarria sinensis* (Lour.) Gilg. V isolation and characterization of three 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1990, 25: 186-190.
 - 14 Mei WL (梅文莉), Liu J (刘俊), Li XN (李小娜), et al. Study on the chemical constituents from Chinese eaglewood in Hainan. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2010, 18: 573-576.
 - 15 Li W, Cai CH, Dong WH, et al. 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from Chinese agarwood induced by artificial holling. *Fitoterapia*, 2014, 98: 117-123.
 - 16 Hashimoto K, Nakahara S, Inoue T, et al. A new chromone from agarwood and pyrolysis products of chromone derivatives. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33: 5088-5091.
 - 17 Konishi T, Konoshima T, Shimada Y, et al. Six new 2-(2-phenylethyl) chromones from agarwood. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50: 419-422.
 - 18 Liu JM (刘军民), Gao YH (高幼衡), Xu HH (徐鸿华), et al. Chemical constituents of *Lignum Aquilariae Resinatum* (II). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 1138-1140.
 - 19 Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7(2): 88-95.
 - 20 Mei WL, Yang DL, Wang H, et al. Characterization and determination of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood by GC-MS. *Molecules*, 2013, 18: 12324-12345.