

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.020

反相高效液相色谱法测定蒙药材灰绿黄堇中原阿片碱含量*

郭宝凤^{1,2}, 周雪梅^{1,2Δ}

(1. 内蒙古自治区药品检验研究院, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古自治区中蒙药标准研究重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要:目的 建立测定蒙药材灰绿黄堇中原阿片碱含量的反相高效液相色谱法。方法 采用色谱柱 Alltima C₁₈-ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 6.0, 15:85, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 289 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。结果 原阿片碱进样量在 107.44~1 611.55 ng 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999$); 平均回收率为 97.05%, RSD 为 2.11% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、快速, 可用于蒙药材灰绿黄堇中原阿片碱的含量测定。

关键词: 灰绿黄堇; 反相高效液相色谱法; 原阿片碱; 含量测定

中图分类号: R932; R291.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)19-0069-04

Content Determination of Protopine in Mongolian Medicinal Herb *Corydalis Adunca* by RP-HPLC

GUO Baofeng^{1,2}, ZHOU Xuemei^{1,2}

(1. Inner Mongolia Autonomous Region Drug Inspection and Research Institute, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, China 010010; 2. Inner Mongolia Autonomous Region, China - Mongolia Medicine Standard Research Key Laboratory, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, China 010010)

Abstract: Objective To establish a reverse phase-high performance liquid chromatography(RP-HPLC) method for the determination of protopine in Mongolian medicinal herb *Corydalis adunca*. **Methods** The chromatographic column was Alltima C₁₈ ODS column(250 mm×

*基金项目: 内蒙古自治区蒙医药标准化项目[2017-[46]]。

第一作者: 郭宝凤, 女, 蒙古族, 硕士研究生, 研究方向为中蒙药标准及质量, (电子信箱) guobaofengzf@163.com。

Δ通信作者: 周雪梅, 女, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为中蒙药标准及质量, (电子信箱) zhouxm726@sina.com。

2015年版《中国药典(一部)》中黄连的盐酸小檗碱、黄柏的盐酸小檗碱、甘草的甘草苷、甘草酸、苦参的苦参碱、氧化苦参碱等指标成分的检测波长, 曾分别于 230, 265, 340 nm 波长处进行预试验, 结果甘草苷、甘草酸峰高较低, 分离度差, 基线噪音影响大, 定量不准确。盐酸小檗碱峰高相对较高, 样品干扰少, 分离度好, 且基线平稳, 适合作为含量测定指标成分, 故选择盐酸小檗碱最大吸收波长 265 nm 作为喉蛾散中盐酸小檗碱含量测定的紫外检测波长。

3.2 流动相选择^[7-10]

曾选择乙腈-1.5% 磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸溶液、甲醇-水等流动相系统进行预试验, 结果显示, 采用乙腈-0.05% 磷酸溶液作为流动相梯度洗脱, 供试品溶液中盐酸小檗碱与其他峰分离较好, 故选其作为流动相。

3.3 提取溶剂选择^[11-12]

在原供试品溶液制备方法基础上考察了不同提取溶剂(70% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇、30% 乙醇、水)对含量测定指标成分的影响, 以水为溶剂进行提取时, 盐酸小檗碱的含量明显降低, 70% 甲醇和 70% 乙醇的差异不大, 因甲醇具有中枢神经系统毒性, 故选用乙醇体系的溶剂。分别对不同比例的乙醇提取溶剂进行比较, 发现 70% 乙醇为提取溶剂时得到的盐酸小檗碱的含量最高, 故最终选择 70% 乙醇为提取溶剂。

参考文献:

- [1] 蒋秀燕, 王丛丛. MECC-AD 法测定黄连和黄柏中小檗碱、巴马汀和药根碱的含量[J]. 山东化工, 2014, 43(4): 83-86.
- [2] 车景超, 田英, 徐平, 等. 银桂抗炎合剂质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(8): 961-964.
- [3] 唐斌斌, 杜书君, 苑学明, 等. 复原再造合剂质量标准研究[J]. 中国药业, 2018, 27(24): 28-31.
- [4] 吴珊珊, 胡麟, 樊晓猛, 等. HPLC 法同时测定不同等级黄柏饮片多指标成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(15): 2135-2137.
- [5] 吕长淮. 盐酸小檗碱含量测定方法概述[J]. 中国医药导报, 2010, 7(32): 141-142.
- [6] 席桂同, 陈述. 复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定[J]. 世界中医药, 2015, 10(2): 252-257.
- [7] 李红玲, 莫炫永. HPLC 法同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2662-2664.
- [8] 陈天朝, 翟来超. HPLC 梯度洗脱测定黄柏中盐酸小檗碱与盐酸黄柏碱的含量[J]. 中医研究, 2011, 24(4): 23.
- [9] 陈珂, 黄锐, 蒲清荣, 等. 高效液相色谱法测定肠炎灌肠液中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业, 2019, 28(10): 26-28.
- [10] 王建, 李正国, 刘琳琳, 等. 清热神芩丸中黄连质量控制方法研究[J]. 中国药业, 2018, 27(12): 9-12.
- [11] 张咏梅, 杨锐. 肠尔舒结肠定位释药胶囊中黄柏、黄连提取工艺优选[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 21-23.
- [12] 张中华, 赵亚兰. 黄连总生物碱的提取纯化及含量测定[J]. 西部中医药, 2018, 31(4): 49-52.

(收稿日期: 2020-01-17)

4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution (adjusted the pH to 6.0 with triethylamine, 15 : 85, V/V) with a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 289 nm, the column temperature was 35 $^{\circ}$ C, and the injection volume was 10 μ L. **Results** The injection volume of protopine showed a good linear relationship with the peak area in the range of 107.44 - 1 611.55 ng ($r=0.999\ 9$), the average recovery rate was 97.05% and the RSD was 2.11% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple and quick, which is suitable for the determination of protopine in Mongolian medicinal herb *Corydalis adunca*.

Key words: *Corydalis adunca*; reverse phase-high performance liquid chromatography; protopine; content determination

蒙医常用灰绿黄堇作“地格达”使用,效果较好,但作为蒙药材,现暂无质量标准,未能对该产品的质量进行监控。灰绿黄堇(蒙医名为柴布日-萨巴乐干纳),为罂粟科紫堇属植物灰绿黄堇 *Corydalis adunca* Maxim. 的干燥全草,功能主治为清热解毒、消炎、凉血、解毒、利尿,用于治疗时疫感冒、咽喉肿痛、疔疮肿痛等^[1-5]。灰绿黄堇主要含有紫堇碱、去氢紫堇碱、二氢血根碱、延胡索乙素等多种生物碱类成分^[3-5],有镇痛、止咳、松弛平滑肌、平喘、抗菌的作用^[6-7]。本研究中采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对蒙药材灰绿黄堇中原阿片碱含量进行了测定,为灰绿黄堇的质量控制提供了定量检测方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DionexU-3000型双三元型高效液相色谱仪(带二极阵列检测器,美国Thermo公司);Sartorius ME5型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为百万分之一);Mettler AE-100型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为万分之一);AS 5150A型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为50 kHz)。

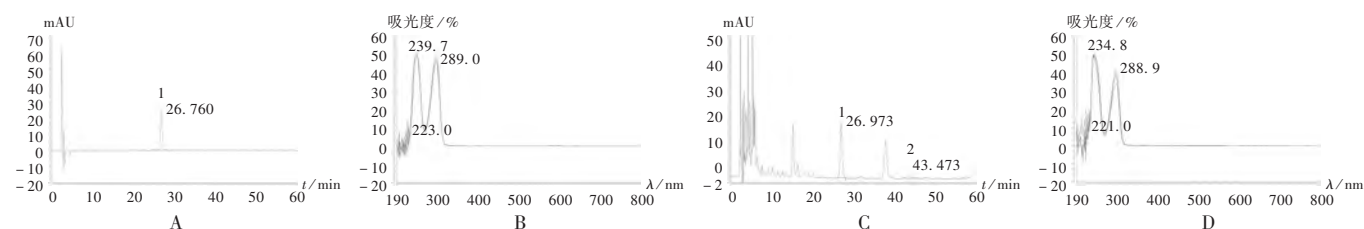
1.2 试剂

紫堇灵对照品(批号为111734-200601),延胡索乙素对照品(批号为110726-201213),盐酸巴马汀对照品(批号为110732-200506),原阿片碱对照品(批号为110853-201404),盐酸黄连碱对照品(批号为112026-201601),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为离子交换高纯水;10批灰绿黄堇为蒙医医院提供或自采样品,样品信息见表1。所有样品均由内蒙古自治区药品检验研究院主任药师周雪梅鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Alltima C₁₈-ODS柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);



1. 原阿片碱

A. 供试品溶液色谱图 B. 供试品溶液光谱图 C. 对照品溶液色谱图 D. 对照品溶液光谱图

图1 灰绿黄堇反相高效液相色谱图及光谱图

表1 样品信息来源

样品	来源	样品	来源
S1	采于内蒙古巴彦淖尔市(1)	S6	内蒙古巴盟乌拉特后旗蒙医院
S2	采于内蒙古巴彦淖尔市(2)	S7	采于内蒙古巴盟乌拉特后旗
S3	采于内蒙古巴彦淖尔市(3)	S8	采于内蒙古包头市
S4	采于内蒙古巴彦淖尔市(4)	S9	采于内蒙古阿拉善(春季)
S5	采于内蒙古巴彦淖尔市(5)	S10	采于内蒙古阿拉善(秋季)

流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(三乙胺调pH至6.0, 15 : 85, V/V);检测波长:289 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

取原阿片碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含60 μ g的溶液,即得对照品溶液。取样品粉末(过3号筛)约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为250 W,频率为50 kHz)60 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取上述2种溶液各10 μ L,分别注入色谱仪,按拟订色谱条件进样测定。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同的色谱峰且光谱图一致。理论板数以原阿片碱峰计为10732,分离度为6.7。理论板数以原阿片碱峰计不小于4000。详见图1。

线性关系考察:取原阿片碱对照品(含量为99.77%)5.388 mg,置50 mL容量瓶中,加甲醇使溶解,并稀释至刻度,精密吸取2, 5, 10, 15, 20 μ L注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,以进样量(C)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A=0.020\ 8\ C-0.026\ 60\ 040\ 8$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,原阿片碱进样量在107.44~1 611.5 ng范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液10 μ L,重

复进样5次,计算原阿片碱峰面积积分值。结果的 RSD 为 0.68% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于2,4,6,8,12,24 h时进样 10 μL ,依法测定,计算原阿片碱峰面积积分值。结果的 RSD 为 0.75% ($n=2$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取同一供试品(S1)6份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定原阿片碱含量。结果原阿片碱平均含量为 1.588 mg/g, RSD 为 1.75% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一供试品(S1),含量为 1.588 mg/g) 6份,各1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入对照品溶液 25 mL(质量浓度为 0.058 6 mg/mL),精密加甲醇 25 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定原阿片碱含量,计算回收率。结果见表2。

表2 原阿片碱加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.006 6	1.598 4	1.465 0	2.991 1	95.06	97.05	2.11
1.005 1	1.596 0	1.465 0	3.001 0	95.90		
1.005 0	1.595 9	1.465 0	3.064 5	100.25		
1.002 3	1.591 6	1.465 0	3.044 2	99.15		
1.002 2	1.591 4	1.465 0	3.002 8	96.34		
1.000 7	1.589 1	1.465 0	2.990 0	95.62		

耐用性试验:换不同厂家、不同型号的色谱柱,按拟订色谱条件进样测定,色柱谱为 Alltima C₁₈, Phenomenex C₁₈, Agilent C₁₈, Shimadzu C₁₈, 色谱柱分离度均大于 1.5, 测得平均含量分别为 1.59, 1.61, 1.60, 1.57 mg/g。与本研究采用的 Alltima C₁₈ 柱测得平均含量(1.59 mg/g) 相对误差分别为 0.62%, 0.32%, 0.64%。不同厂家、不同型号的色谱柱对测定结果无影响。

2.4 样品含量测定

取10批供试品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进行测定。结果见表3。

表3 原阿片碱含量测定结果(mg/g, $n=2$)

样品	含量	平均含量(按干燥品计)	样品	含量	平均含量(按干燥品计)
S1	1.617 7	1.62	S6	1.889 7	1.89
	1.617 8			1.899 1	
S2	1.387 1	1.40	S7	0.847 2	0.85
	1.403 0			0.847 0	
S3	1.525 7	1.54	S8	1.571 0	1.56
	1.554 9			1.556 3	
S4	1.364 5	1.38	S9	0.434 4	0.43
	1.391 0			0.434 2	
S5	1.249 9	1.24	S10	1.517 9	1.51
	1.224 7			1.500 5	

3 讨论

3.1 色谱条件选择

本研究中对流动相[甲醇-0.1%磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 6.0)、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 6.0)、乙腈-0.1%磷酸溶液]、柱温(30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$)进行考察。结果柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 、流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 6.0)的色谱条件下等度洗脱时,各色谱峰与相邻峰分离较好,且基线平稳。

3.2 检测波长选择

通过二极管阵列检测器对对照品在 800~190 nm 波长范围内进行光谱扫描,结果原阿片碱在 289.3 nm 波长处有最大吸收峰,参照文献[2,6-7]。故选择测定波长为 289 nm。

3.3 指标成分选择

本研究采用 RP-HPLC 法建立蒙药材灰绿黄堇的含量测定,曾摸索盐酸罂粟碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、延胡索乙素、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、原阿片碱的含量测定方法^[8-14]。结果灰绿黄堇色谱图中没有与盐酸罂粟碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、延胡索乙素、盐酸药根碱保留时间一致的色谱峰,或虽保留时间一致,但光谱图不同,供试品色谱图中有与原阿片碱和盐酸黄连碱保留时间一致的色谱峰,且光谱图一致,分离效果较好,盐酸黄连碱含量较低,故以原阿片碱为指标成分建立含量测定方法。

3.4 提取方法选择

比较了甲醇加热回流和超声提取2种方法,结果差异不明显,因超声提取更简便、易行,故选择超声提取法。分别比较了甲醇浸泡1 h后超声和直接超声提取2种方法,结果差异不大,故选择甲醇超声提取。比较了超声处理(功率为 250 W,频率为 50 kHz)30,60,120 min,进行试验,按拟订色谱条件测定,结果超声处理 60 min 后原阿片碱的含量不再增加,故确定超声时间为 60 min。

3.5 方法评价

本研究建立了测定原阿片碱含量的 RP-HPLC 法,该方法,简便、准确,可作为灰绿黄堇质量控制的定量方法。

参考文献:

- [1] 高燕萍,杜小浪,幕泽迺,等. 藏药“帕蒙丝哇”灰绿黄堇的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2015(12):14-17.
- [2] 尚伟庆,陈月梅,高小力,等. 紫堇属藏药的化学与药理学研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(7):1190-1193.
- [3] 张莉,张芳,王继生,等. 灰绿黄堇生物总碱抗炎镇痛作用的研究[J]. 中国药房,2007,18(12):888-889.
- [4] 赵东保,唐艳丽,汪汉卿. 灰绿黄堇生物碱化学成分的研究Ⅲ[J]. 中国中药杂志,2005,30(22):1756-1757.
- [5] 梁俊玉,张继,刘阿萍,等. 灰绿黄堇生物碱的研究[J]. 中药材,2007,43(5):1386-1387.