

## 正相硅胶-反相洗脱系统 HPLC 法同时测定延胡索中 4 种生物碱含量

原永芳 石力夫 胡晋红 郑棣君(上海 200433 第二军医大学长海医院药学部)

**摘要** 目的:建立延胡索及制剂中延胡索乙素、四氢非州防己胺、紫堇碱、海罂粟碱的正相硅胶-反相洗脱系统高效液相色谱分析法。方法:用普通硅胶作固定相,高浓度极性有机溶剂、碱性水相缓冲液为流动相,优奎宁作内标。结果:4 种成分得到了良好的分离,其回收率均在 95% 以上。结论:该法简便、快速、精密度高,也为其他中药及其制剂中生物碱的含量分析建立了一种有效而可行的方法。

**关键词** 延胡索;延胡索乙素;四氢非州防己胺;紫堇碱;海罂粟碱;高效液相色谱法

### Determination of four alkaloids in corydalis yanhusuo W. T. Wang by silica with reversed phase eluents HPLC

Yuan Yongfang(Yuan YF), Shi Lifu(Shi LF), Hu Jinhong(Hu JH), et al(Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** A unmodified silica with reversed phase eluents HPLC method was established for the determination of dl-tetrahydropalmatine, 1-tetrahydrocolumbamine, d-corydaline and d-glucine in corydalis Yanhusuo W. T. Wang and its prescription preparations. **METHOD:** The mixture consisting of methanol and 2.5mmol/L phosphate buffer (pH 7.2) (80:20, v/v) was used as the mobile phase. Equinine was used as internal standard. **RESULT:** The four constituents were separated effectively. Their recoveries were above 95%. **CONCLUSION:** The method is simple, rapid, precise, and so it could be extensively used for the determination of alkaloids in other crude drugs and preparations.

**KEY WORDS** Corydalis Yanhusuo W. T. Wang, dl-tetrahydropalmatine, 1-tetrahydrocolumbamine, d-corydaline, d-glucine, HPLC

延胡索(Corydalis Yanhusuo W. T. Wang)具有止痛、镇静、抗惊挛作用,为一常用中药,主要有效成分为生物碱。有报道采用薄层层析法<sup>[1]</sup>及反相 HPLC 法<sup>[2]</sup>测定其中生物碱的含量。用 RP-HPLC 法分析碱性药物存在着一定的困难,碱性药物的保留时间过长,峰形拖尾。国外有报道<sup>[3]</sup>利用碱性成分与硅醇基的相互作用,在普通硅胶柱上,以高浓度极性有机溶剂、碱性水相缓冲液分析碱性药物,这些碱性药物的碱性及结构都有一定的差异。本文用该色谱系统分离并测定了 4 种结构及碱性均非常相似的生物碱的含量,峰形对称,方法灵敏度高,分辨率好。

#### 1 仪器和试剂

ISCO 超临界流体萃取器(美国 ISCO 公司),Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。延胡索乙素对照

品(中国药品生物制品检定所);四氢非州防己胺、紫堇碱、海罂粟碱(自制,均经理化及光谱方法鉴定);优奎宁(内标)由 EMERK 公司(进口)提供;药材及成方制剂购自医药公司,药材由长海医院全山丛副教授鉴定。其余试剂均为分析纯。

#### 2 方法和结果

##### 2.1 色谱条件

色谱柱 Waters  $\mu$ Porasil<sup>TM</sup>(300 × 3.9mm, ID)。流动相为甲醇-2.5mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2)(80:20, v/v),室温(20 ± 20)℃,流速 1.0ml/min,检测波长 280nm,进样量 5 $\mu$ l。

##### 2.2 流动相选择

碱性药物在硅胶固定相上的保留行为是离子交换机理,只有呈离子状态的药物才能用此系统进行分离,

所以当分离碱性药物时流动相的 pH 值不能太高,同时只有当 pH 值较高时,硅胶表面的弱酸性硅醇基的离子化程度才较大,才有足够的离子交换容量。因而流动相的 pH 值应该选择适宜。另外,由于碱性成分的非解离部分与硅胶表面的硅氧烷存在着疏水性作用,所以流动相的溶剂强度、溶剂组成对碱性药物的保留也有影响。试用了不同比例的甲醇、乙腈,不同 pH 值及浓度的缓冲液作流动相,当流动相为甲醇-2.5mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2)(80:20,v/v)时,延胡索中 4 种生物碱与内标及杂质的分离效果最好。同时进一步考察了不同的甲醇含量、不同的缓冲液浓度、不同的 pH 值对生物碱容量因子(k)的影响。结果见图 1~3。

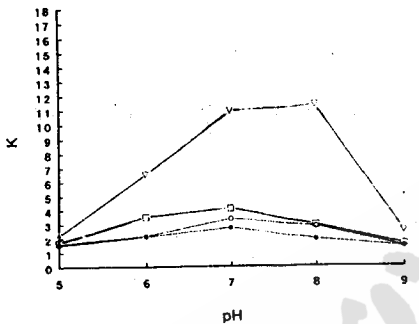


图 1 pH 对容量因子的影响(80% 甲醇, 2.5mmol/L)

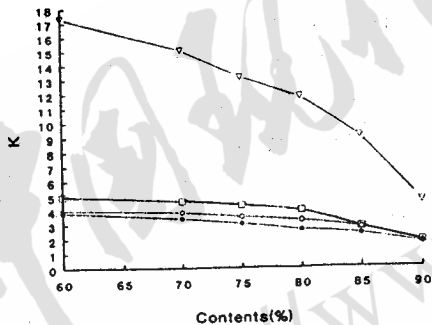


图 2 甲醇含量对容量因子的影响(pH 7.2, 2.5 mmol/L)

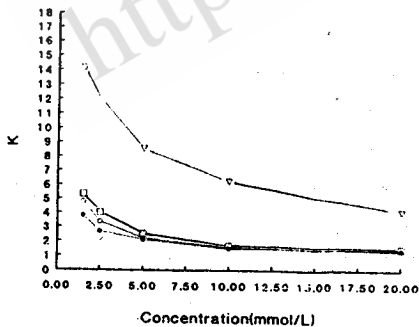


图 3 缓冲液浓度对容量因子的影响(80% 甲醇, pH 7.2)

### 2.3 内标物的选择

内标物应在 280nm 处有吸收,保留时间要适当,且不与样品组分和杂质峰重叠。通过对多种弱碱性化合物的测试,证实优奎宁符合上述要求,见图 4。

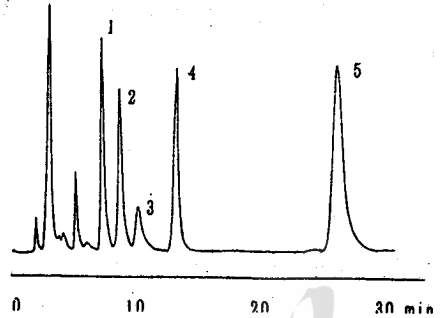


图 4 延胡索药材的色谱图

1-紫堇碱;2-四氢非州防己胺;3-延胡索乙素;4-优奎宁;5-海罂粟碱

### 2.4 标准液的配制

精密称取延胡索乙素、四氢非州防己胺、紫堇碱、海罂粟碱对照品各 10.5, 9.8, 10.1 和 9.7mg 于 25ml 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。

### 2.5 内标液的配制

精密称取优奎宁标准品 7.2mg 于 25ml 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。

### 2.6 标准曲线的制备

精密量取上述标准液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 3.0ml, 分别置于 25ml 量瓶中,再各精密加入上述优奎宁内标液 2ml,用甲醇稀释至刻度,混匀后直接进样测定。以各标准品与内标的峰面积(Y)对进样浓度(X,  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )进行回归,并绘制标准曲线。回归方程为:延胡索乙素  $Y = 45.51X + 0.03204, r = 0.9993$ ;四氢非州防己胺  $Y = 39.85X + 0.05056, r = 0.9992$ ;紫堇碱  $Y = 41.38X - 0.01789, r = 0.9998$ ;海罂粟碱  $Y = 80.92X + 0.04116, r = 0.9997$ 。

### 2.7 样品分析

2.7.1 提取条件 精密称取样品适量与 0.1g 氢氧化钙混匀,装入萃取槽中,加苯 0.2ml 作改性剂,甲醇为吸收液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ , 6000Psi 压力下,二氧化碳超临界流体静态萃取 5min,动态萃取 3ml。

2.7.2 中药材的测定 精密称取延胡索粉(40 目, 55 $^{\circ}\text{C}$  干燥恒重)约 0.1g,精密称定,按照上述提取方法进行提取,提取液中加入上述内标液 0.4ml,定容至 5ml,直接进样分析。

2.7.3 制剂阴性对照试验 按舒肝丸处方组成配阴性对照液(不含延胡索),分别取与制剂含量测定时相同的量,按样品分析同样操作(不加内标)。从色谱图

上可见,舒肝丸的阴性对照液不干扰内标峰和4种生物碱峰。

2.7.4 制剂的测定 精密称取一定量舒肝丸(由11味中药组成),加一定量硅藻土研匀,与中药材样品分析同样操作进行含量测定。

## 2.8 加样回收率及精密度

精密称取一定量延胡索粉,精确加入一定量延胡索乙素、四氢非州防己胺、紫堇碱、海罂粟碱标准液,按样品分析同样操作,进行回收率测定。实验结果见表1。对同一标准品重复进样8次,相对标准偏差为1.7%。

表1 4种生物碱的加样回收率/ $n=5$

生物碱	平均回收率/%	RSD/%
延胡索乙素	97.02	1.8
四氢非州防己胺	95.31	2.0
紫堇碱	95.82	1.5
海罂粟碱	98.13	2.3

## 2.9 结果

延胡索及舒肝丸中生物碱的含量见表2。

## 3 讨论

中药及其制剂中生物碱的HPLC法测定大多是在ODS柱上进行的,中药中的其他脂溶性成分可能会对

表2 延胡素及制剂中生物碱含量/ $n=4$

生物碱	延胡索/%	RSD/%	舒肝丸/%	RSD/%
延胡索乙素	0.08983	1.5	0.001730	0.8
四氢非州防己胺	0.05282	2.0	0.001267	2.3
紫堇碱	0.1159	1.6	0.002766	1.8
海罂粟碱	0.09826	1.8	0.002229	2.1

生物碱的分离有干扰,因而常常要进行繁琐的预处理。另外,用反相HPLC法分析碱性药物时,以硅胶为基质的反相填料键合不完全,碱性成分常常与残留硅醇基发生缔合作用,致使保留时间变长,峰形拖尾,同时也影响了柱效及柱的使用寿命。用正相硅胶-反相洗脱系统分析碱性成分,其保留时间较RP-HPLC法缩短,峰形对称,且方法灵敏度高,分辨率好,酸性及中性成分可在极短的时间内出柱,对碱性成分的分离无干扰,不必进行预处理。因而,该法也同样适合其它中药及其制剂中生物碱的定量分析。

## 参考文献

- 1 傅小勇,等.药物分析杂志,1985,5:194.
- 2 虞清,等.中国药科大学学报,1988,19:4.
- 3 Brian Law. Trends in Analysis Chemistry, 1990, 9:31.