

HPLC 同时测定猫豆中左旋多巴及其衍生物含量

邓霖芳¹, 谭蓓蓓¹, 窦冕^{1,2}, 郝丽莉¹, 刘江云^{1*}, 杨世林¹ (1.苏州大学医学部药学院, 苏州 215123; 2.滨州医学院附属医院, 山东 滨州 256603)

摘要: 目的 建立同时测定猫豆中左旋多巴(2)及其3种衍生物含量的高效液相色谱法。方法 从猫豆中分离获得3-羧基-6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉(1)、1-甲基-3-羧基-6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉(3)、1,1-二甲基-3-羧基-6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉(4)等3种成分;含量测定采用Cosmosil C₁₈-PAQ色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相1%乙酸等度洗脱,流速0.5 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长280 nm。结果 左旋多巴(2)和3个化合物色谱分离良好,分别在0.298 4~5.968 μg (1), 6.554~131.1 μg (2), 0.262 6~5.252 μg (3), 0.256 8~5.136 μg (4)线性关系良好($r>0.999$),平均加样回收率依次为97.7%, 99.1%, 98.7%, 97.9%。结论 本方法简便、准确,可用于同时测定猫豆中的左旋多巴及其四氢异喹啉类衍生物含量,为其质量控制方法提供参考。

关键词: 猫豆; 左旋多巴; 四氢异喹啉; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)07-0845-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.003

Simultaneous Determination of L-dopa and Its Derivates in Seeds of *Mucuna Pruriens* Var. *Utilis* by HPLC

DENG Linfang¹, TAN Beibei¹, DOU Mian^{1,2}, HAO Lili¹, LIU Jiangyun^{1*}, YANG Shilin¹ (1.College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2.The Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of both L-dopa(2) and its derivates in seeds of *Mucuna pruriens* var. *utilis* Burck by HPLC. **METHODS** Three ingredients, 3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline(1), 1-methyl-3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline(3) and 1,1-dimethyl-3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline(4) were isolated from the herb. Chromatographic separation was performed on a Cosmosil C₁₈-PAQ analytical column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with 1% acetic acid as the mobile phase at 30 °C. The detection wavelength was 280 nm and the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. **RESULTS** The 4 components were separated with satisfaction. Their linearity ranges were between 0.298 4–5.968 μg (1), 6.554–131.1 μg (2, L-dopa), 0.262 6–5.252 μg (3) and 0.256 8–5.136 μg (4), respectively with their correlation coefficients all >0.999. Their average recovery rates were 97.7%, 99.1%, 98.7% and 97.9%. **CONCLUSION** The method is accurate and selective for simultaneous determination of 4 ingredients in seeds of *Mucuna pruriens*, which could be applied for the quality control of this herb.

KEY WORDS: *Mucuna pruriens* var. *utilis*; L-dopa; tetrahydroisoquinoline; HPLC

猫豆系豆科藜豆属植物龙爪藜豆(*Mucuna pruriens* var. *utilis* Burck)的干燥种子。藜豆属植物在全球热带、亚热带地区均有分布,印度阿育吠陀传统医学中广泛采用藜豆用于治疗帕金森病、毒蛇咬伤、男性不育等病症,左旋多巴(L-dopa, LD)是其中主要有效成分^[1]。猫豆主产于我国广西、贵州等地区,具有温中益气、治疗腰脊酸痛的功效,同时也作为生产天然LD的主要原药材^[1]。

LD作为治疗帕金森病的一线药物,其来源有合成和天然提取2种。目前LD及其合成过程中产

生的3-甲氧基多巴等有关物质的测定方法一般采用C₁₈柱和低比例甲醇有机相(5%~10%)等度洗脱^[2-3],但这些有关物质在天然来源的LD中并不存在^[4]。传统医学经验和现代药理研究表明^[5-6],服用藜豆提取物可延缓由于长期服用LD导致的运动功能障碍(异动症),其相关药效物质尚不清楚。文献[7-8]报道藜豆中存在LD衍生的简单异喹啉类成分,但该类组分极性大、容易氧化变性,分离难度大,因此对其潜在功效和含量测定方法研究少见。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274190)

作者简介: 邓霖芳,女,硕士生 Tel: (0512)65884301 E-mail: liujiangyun@suda.edu.cn

E-mail: 461168333@qq.com

*通信作者: 刘江云,男,博士,副教授 Tel:

(0512)65884301 E-mail: liujiangyun@suda.edu.cn

本课题前期研究表明,大鼠多次灌胃给药猫豆提取物后可增大 LD 的生物利用度,其中的 LD 衍生物可能是其有效成分之一^[9]。本研究对猫豆中该类 LD 衍生物进行分离鉴定,并建立该类药材中 LD 及其衍生物 HPLC 含量测定方法,为猫豆及藜豆属植物药材及提取物的质量控制提供依据,并为天然来源的 LD 及有关物质测定方法提供参考。

1 仪器、材料与试剂

猫豆 MD-1(20091101,白色种皮,广西百色)、猫豆 MD-2(20111212,黑色种皮,广西南宁)经苏州大学药学院陆叶博士鉴定为豆科藜豆属植物龙爪藜豆(*Mucuna pruriens* var. *utilis* Burck)的种子;藜豆(20090501,购自印度)由俄亥俄州立大学药学院李君山博士馈赠,并鉴定为豆科藜豆属植物藜豆(*Mucuna pruriens*)的种子。LD 对照品(2010123644;峰纯度 98.8%,南京泽朗植提公司)。

硅胶 H(青岛海洋化工有限公司);反相 C₁₈ 硅胶(75 μm,日本 Cosmosil 公司);色谱甲醇(色谱纯,上海化学试剂有限公司);色谱纯净水(杭州娃哈哈公司);去离子水(自制);其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

Agilent 1260 高效液相色谱仪系统(美国 Agilent 公司);C₁₈-PAQ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm,日本 Cosmosil 公司);BP-Purifier-100 制备中压液相系统(苏州利穗有限公司);4000 QTRAP[®] 线性离子阱四级杆质谱(加拿大 MDS-AB SCIEX 公司);UNITY-INOVA 400M 超导核磁共振谱仪(美国瓦里安公司);CPA225D Sartorius 电子天平(上海中殷医疗设备有限公司);SB-5200DTDN 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的猫豆 1.57 kg,粉碎成粗粉,采用 5 倍量丙酮回流提取 2 h×2 次,过滤,药渣续用 5 倍量甲醇回流提取 2 h×2 次,浓缩获得甲醇提取物(104 g);取其中 50.5 g,采用中压硅胶柱 H 柱色谱分离,以氯仿-甲醇(含 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸)梯度(7:3:0.5~5:5:0.5)洗脱,TLC 检识合并为馏分 F1~F8,其中 F2 再经中压硅胶柱 H 和氯仿-甲醇(含 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸)梯度(7:3:0.5~6.5:3.5:0.5)洗脱、Sephadex LH-20 纯化,得到化合物 4(43 mg,按液相分析时色谱峰面积归一化法计,峰纯度

97.2%);同法由 F3 经硅胶柱色谱等分离得到化合物 1(28 mg,峰纯度 98.1%);F5 经 Sephadex LH-20 纯化,得到化合物 3(35 mg,峰纯度 99.74%);由 F6 得到化合物 2(350 mg),经与对照品 HPLC 比对,鉴定为 LD。

2.2 含量测定

2.2.1 液相分析条件 采用 Agilent 1260 高效液相色谱系统,DAD 检测器;色谱柱 Cosmosil C₁₈-PAQ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 1%醋酸,流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 30 °C;检测波长 280 nm,进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定对照品 1~4 适量,置于 50 mL 棕色量瓶中,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解并定容,制成浓度分别为 0.298 4, 6.554, 0.262 6, 0.256 8 mg·mL⁻¹ 的混合对照品储备液。精密吸取上述混合对照品溶液储备液 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 5.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸液溶解并定容,制成 5 个不同浓度的混合对照溶液 RS-1~5。

2.2.3 供试品溶液的制备 猫豆或藜豆药材粉碎为粗粉,各取 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 20 mL,称定重量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)60 min,放冷,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸补足重量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

3 结果与分析

3.1 对照品结构鉴定

化合物 1:白色粉末,ESI-MS: *m/z* 210 ([M+H]⁺),相应分子式 C₁₀H₁₁O₄N。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 3.02 (1H, dd, *J* = 4.8, 16.4 Hz, H-4α), 3.27 (1H, dd, *J* = 12.8, 16.4 Hz, H-4β), 3.98 (1H, dd, *J* = 4.8, 12.8 Hz, H-3α), 4.47 (1H, br d, *J* = 16.0 Hz, H-α), 4.60 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-1β), 6.62 (1H, s, H-8), 6.73 (1H, s, H-5)。以上数据经与文献[7]比较基本一致,鉴定为 3-羧基-6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉。

化合物 3:白色粉末,ESI-MS: *m/z* 224 ([M+H]⁺),相应分子式 C₁₁H₁₃O₄N。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 1.70 (3H, d, *J* = 8.0 Hz, CH₃-1), 2.98 (1H, dd, *J* = 5.6, 16.0 Hz, H-4), 3.20 (1H, dd, *J* = 12.4, 16.0 Hz, H-4), 4.16 (1H, dd, *J* = 5.6, 12.4 Hz, H-3), 4.52 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1), 6.68 (1H, s, H-8), 6.75 (1H, s, H-5)。以上数据经与文献[7]比较基本一致,鉴定为 1-甲基-

3-羧基-6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉。

化合物 4: 白色粉末, ESI-MS: m/z 238 ($[M+H]^+$), 相应分子式 $C_{12}H_{15}O_4N$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.61 (3H, s, CH_3 -1), 1.73 (3H, s, CH_3 -1), 3.01 (1H, dd, $J=5.2, 16.0$ Hz, H-4), 3.20 (1H, dd, $J=12.8, 16.0$ Hz, H-4), 3.93 (1H, dd, $J=5.2, 12.8$ Hz, H-3), 6.58 (1H, s, H-8), 6.69 (1H, s, H-5)。以上数据经与文献[7]

比较基本一致, 鉴定为 1,1'-二甲基-3-羧基-6,7-二羟基-1,2,3,4-四氢异喹啉。

3.2 分析方法学考察

3.2.1 系统适用性和专属性 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各 20 μ L, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 在上述分析条件下, 化合物 1~4 与杂质峰分离度良好, 各成分色谱峰与相邻峰的分度均 >1.5 , 色谱图见图 1。

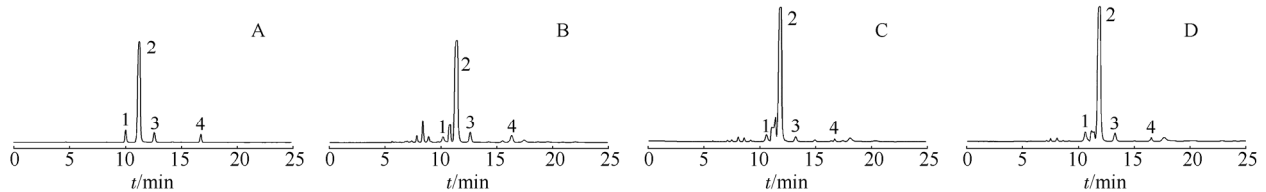


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液 RS-2; B-猫豆供试品(MD-1); C-猫豆供试品(MD-2); D-藜豆。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substance solution RS-2; B-samples of *Mucuna pruriens* var. *utilis*(MD-1); C-samples of *Mucuna pruriens* var. *utilis* (MD-2); D-*Mucuna pruriens*.

3.2.2 线性范围考察 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 RS-1~6, 依次注入高效液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标(Y), 进样量 X(g)为横坐标(X), 进行线性回归, 求得回归方程, 结果见表 1。结果表明化合物 1~4 在相应浓度范围内线性关系良好。

3.2.3 仪器精密度考察 分别精密吸取混合对照溶液 20 μ L, 重复进样 6 次, 以峰面积指标计算 RSD

($n=6$), 结果表明仪器的精密度良好, 结果见表 1。

3.2.4 稳定性考察 取同一猫豆 MD-1 供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样分析, 测定 4 种成分峰面积并计算 RSD($n=6$), 结果表明供试品在 12 h 内稳定性良好, 结果见表 1。

3.2.5 重复性考察 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份猫豆 MD-1 供试品溶液, 在“2.2.1”项下色谱条件同时测定 4 种目标成分的含量, 并计算 RSD($n=6$), 结果表明本法重复性良好, 结果见表 1。

表 1 方法学考察结果

Tab. 1 Results of method investigations

成分	回归方程	r	线性范围/g	精密度 RSD/%	稳定性 RSD/%	重复性 RSD/%
1	$Y=1418.7X+311.25$	0.9994	0.2984~5.968	1.07	1.44	1.32
2	$Y=369.15X+13659$	0.9991	6.554~131.1	1.15	1.12	1.13
3	$Y=1538.2X+277.25$	0.9992	0.2626~5.252	1.03	1.38	1.08
4	$Y=797.30X+63.260$	0.9997	0.2568~5.136	1.27	1.29	1.21

3.2.6 加样回收率实验 精密称取已知含量的猫豆 MD-1 药材样品共 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入 4 mL 混合对照品溶液 RS-2, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样 20 μ L, 记录峰面积, 测得化合物 1~4 的平均回收率分别为 97.7%, 99.1%, 98.7%, 97.9%, RSD 计算结果表明本法加样回收率良好, 结果见表 2。

3.3 样品测定

按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 对猫

豆和藜豆药材中 4 种成分含量进行分析, 测定结果见表 3。

4 结论

猫豆中的主要有效成分为 LD, 对其中的微量 LD 衍生物相关研究较少。天然来源的 LD 与其衍生物结构相似、极性较强, 在常规 C_{18} 柱上几乎没有保留^[10], 分离度不好。本实验曾尝试使用亲水作用色谱柱, 各组分间分离度较好, 但高含量的 LD 色谱峰容易出现过载、拖尾变形等现象, 同时流

表 2 回收率考察结果

Tab. 2 Results of recovery tests

成分	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1	0.392 1	0.386 7	0.768 5	97.34	97.7	0.96
	0.403 4	0.386 7	0.775 5	96.22		
	0.387 3	0.386 7	0.767 4	98.29		
	0.383 5	0.386 7	0.766 2	98.97		
	0.384 7	0.386 7	0.762 7	97.75		
	0.393 2	0.386 7	0.769 7	97.36		
2	20.35	19.94	39.98	98.45	99.1	0.70
	20.34	19.94	39.92	98.19		
	19.92	19.94	39.75	99.45		
	20.16	19.94	39.93	99.15		
	19.97	19.94	39.81	99.50		
	19.62	19.94	39.57	100.1		
3	0.551 3	0.561 8	1.104	98.38	98.7	0.89
	0.552 4	0.561 8	1.102	97.83		
	0.576 2	0.561 8	1.132	98.93		
	0.577 9	0.561 8	1.131	98.45		
	0.563 4	0.561 8	1.127	100.3		
	0.572 1	0.561 8	1.124	98.24		
4	0.418 9	0.430 5	0.843 4	98.61	97.9	1.42
	0.425 2	0.430 5	0.848 8	98.40		
	0.433 1	0.430 5	0.850 9	97.05		
	0.424 7	0.430 5	0.843 2	97.21		
	0.430 5	0.430 5	0.857 6	99.21		
	0.422 9	0.430 5	0.840 3	96.96		

表 3 样品中成分 1~4 含量(n=3)

Tab. 3 Contents of constituents 1-4 in samples(n=3)

样 品	含量/mg·kg ⁻¹			
	1	2	3	4
猫豆 MD-1	0.763	38.76	1.15	0.804
猫豆 MD-2	0.657	35.37	0.417	0.976
藜豆	0.906	42.95	0.829	0.743

动相需使用高浓度的乙腈有机相^[11]。经进一步研究,通过多种色谱柱比较,结合改性剂(1%乙酸、10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵)和洗脱流速(0.5, 0.8, 1.0 mL·min⁻¹)的优化,最终选用亲水性的 Cosmosil PAQ 色谱柱和 100%乙酸溶液作为流动相等度洗脱的“2.2.1”色谱条件,组分 1~4 获得了较为理想的基线分离,首次建立了猫豆中该类组分的同时定量分析方法。

本类 LD 衍生物组分在水、乙醇等常规溶剂中溶解度差、容易氧化,同时 LD 和其他组分含量差

距大,因此供试品的制备方法较为关键。本研究针对该类组分离化特性,选用 0.1 mol·L⁻¹的盐酸超声提取,并对提取溶剂用量(10, 20, 30 倍)、提取时间(30, 60, 90 min)的考察优化,最终建立的供试品制备方法准确可靠、简便易行。

由图 1 和表 3 可知,猫豆和藜豆均含有 4 种目标成分,且含量相对比例相近,表明猫豆和藜豆具有相似的该类物质组成,提示猫豆可作为藜豆代用品使用。四氢异喹啉类成分 1, 3, 4 是猫豆中的特征性组分和有效成分之一^[9],可作为猫豆及同属植物提取物的质量控制指标。

REFERENCES

- [1] CAI J, ZHU Z Y. A study of *Stizolobium hassjoo* medicinal plant resources [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 1988, 11(19), 37-40.
- [2] LU X Y. Determination of levodopa and its related substance by HPLC [J]. *China Pharm(中国药师)*, 2010, 13(5), 681-683.
- [3] FU L N, ZHENG J Q, ZHENG G G, et al. Determination of related substance of levodopa by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2014, 34(3), 475-479.
- [4] WU S H, JIANG W Z, LV L et al. Study on quality standard of *Mucuna pruriens* var *lutilis* [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2009, 32(3), 333-335.
- [5] CHRISTOPHER A, ALLEN R, BALA V, et al. A water extract of *Mucuna pruriens* provides long-term amelioration of parkinsonism with reduced risk for dyskinesias [J]. *Parkinsonism Relat Dis*, 2010, 16(7), 458-465.
- [6] SANJAY K, SILAYA P, ANNALISA P, et al. Assessment of symptomatic and neuroprotective efficacy of *Mucuna pruriens* seed extract in rodent model of Parkinson's disease [J]. *Neurotox Res*, 2009, 15(2), 111-122.
- [7] LAXMINARAIN M, HILDEBERT W. Alkaloidal constituents of *Mucuna pruriens* seeds [J]. *Phytochem*, 2004, 65(18), 2562-2567.
- [8] SIDDHURAJU P, BECKER K. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of *L*-dopa (*L*-3,4-dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds from *Mucuna beans* [J]. *Food Chem*, 2001, 72(3), 389-394.
- [9] YANG G G, ZHANG F R, DENG L F, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of levodopa and MD01 in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of mucuna pruriens extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, DOI 10.1002/bmc.3714.
- [10] ZHENG K B, LI A P, CAO Y Y, et al. Development of HPLC for determination of *L*-dopa from *Vicia faba* flower [J]. *Jiangsu J Agr Sci(江苏农业学报)*, 2012, 28(3), 688-690.
- [11] TAN B B, YU Y L, LI N et al. Determination of *L*-dopa and its derivate in seeds of *Mucuna pruriens* var *utilis* by hydrophilic chromatography [J]. *J Soochow Univ Med Sci Ed(苏州大学学报: 医学版)*, 2012, 32(5): 593-506.

收稿日期: 2015-11-21