

RP-HPLC 法测定小果博落回中 7 种异喹啉类生物碱

罗忠勇^{1,2}, 曾建国^{2*}, 黄敬^{1,2}, 谈满良^{2*}

(1 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410007; 2 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331)

摘要:目的 建立同时测定小果博落回中 7 种生物碱的高效液相色谱法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相:(A) 乙腈,(B) 0.5% 三乙胺缓冲液(磷酸调 pH=2.5), 梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 35 °C, 检测波长 284 nm。结果 7 种生物碱均能达到良好的分离, 原阿片碱、别隐品碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱、二氢白屈菜红碱、二氢血根碱的线性范围分别为 0.11~22.0、0.424~84.7、0.433~86.6、0.380~75.9、0.498~99.6、0.523~104.5、0.508~101.5 μg/mL; 平均回收率分别为 97.8%、97.0%、98.9%、102.2%、98.6%、101.8%、102.9%。结论 本方法操作简便、准确、灵敏度高, 为该类药物资源的质量评价提供了一定的科学依据。

关键词: 反相高效液相色谱法; 小果博落回; 异喹啉类生物碱

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1188-03

小果博落回 *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde 属于罂粟科博落回属植物, 主要分布于陕西、河南、甘肃、湖北及四川等地。作为一种民间中药, 具有散瘀、祛风、解毒、止痛、杀虫等功效, 主要治疗痈疮疗肿、痔疮、湿疹、顽癣、虫蛇咬伤等症。小果博落回主要含有血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱、隐品碱、别隐品碱和博落回碱等^[1] 异喹啉类生物碱。现代药理研究发现异喹啉类生物碱具有强烈的抗菌^[2]、抗炎^[3]、抗寄生虫^[4]、杀灭钉螺^[5]、杀灭血吸虫^[6]、改善肝功能^[7,8]、抗肿瘤^[9] 和抗心律失常^[10] 等作用。近年来, 曾建国等^[11] 研究了博落回果实中血根碱和白屈菜红碱在不同生长期量的变化; 安采贤^[12] 等对小果博落回的茎、叶、全株中血根碱和白屈菜红碱进行了测定; Abizov 等^[13] 研究了俄罗斯产小果博落回中血根碱和白屈菜红碱总生物碱在苗期、花期和果期中的量变化情况。上述只局限对小果博落回中的主要生物碱进行测定, 并未同时检测某些微量生物碱。本实验旨在建立一种快速、简便的反相高效液相色谱方法, 同时测定小果博落回中 7 种异喹啉类生物碱原阿片碱(1)、别隐品碱(2)、血根碱(3)、小檗碱(4)、白屈菜红碱(5)、二氢白屈菜红碱(6)、二氢血根碱(7) 的量, 为小果博落回药材资源的质量评价提供了一定的科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 1525 高效液相色谱仪(美国, 包括

Waters 2998 PAD 检测器, Waters 2707 自动进样器); 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯试剂, 水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。血根碱(Sigma 公司, 批号 84480, 质量分数 98%), 别隐品碱(Sigma 公司, 批号 s450987, 质量分数 98%), 原阿片碱(中国药品生物制品检定所, 批号 110853-200402, 质量分数 98%), 白屈菜红碱(中国药品生物制品检定所, 批号 111718-200501, 质量分数 98%), 小檗碱、二氢白屈菜红碱、二氢血根碱 3 种对照品(自制, 质量分数 98%, 面积归一化法)。小果博落回样品于 2009 年 6 月采自河南洛阳嵩县。植物由湖南中医药大学药学院药用植物学周日宝教授鉴定为罂粟科博落回属植物小果博落回 *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:(A) 乙腈,(B) 0.5% 三乙胺缓冲液(磷酸调 pH=2.5), 梯度洗脱(0~5 min, 30% A; 5~20 min, 30%~54% A; 20~23 min, 54%~70% A; 23~40 min, 70%~80% A; 40~45 min, 80%~30% A; 45~50 min, 30% A), 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 35 °C, 检测波长

* 收稿日期: 2009-12-16

基金项目: 国家科技部国际合作与交流专项(2009DFA31270); 科技部创新基金(07C26224300717)

作者简介: 罗忠勇(1983-), 男, 湖南邵阳人, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物活性成分研究及新药开发。

Tel: 15116482649 E-mail: zhongyongluo@hotmail.com

* 通讯作者 曾建国 E-mail: ginkgo@worldway.net

284 nm。在此条件下 7 种成分均能达到良好分离, 具有较好的分离度, 理论塔板数均大于 10 000, 拖尾因子在 1.5~ 2.0。

2.2 对照品溶液的配制: 分别精密称取生物碱 1~ 7 对照品 1.12、4.29、4.39、3.88、5.10、5.31、5.20 mg 置同一 10 mL 量瓶中, 加少量甲醇超声溶解, 冷却后用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 取小果博落回待测样品约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇-1% 盐酸(50: 50) 超声提取 60 min, 滤过, 取滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系的考察: 分别精密量取对照品溶液 1、10、50、100、200 μL 分别置于 5 个 1 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别进样 5 μL。按照“2.1”项下的色谱条件测定, 以峰面积(Y)对进样浓度(X)进行回归处理, 回归方程、线性范围、相关系数见表 1。

表 1 7 种生物碱的回归曲线方程、线性范围和相关系数

Table 1 Calibration curve, linear range, and linearity parameters of seven isoquinolines alkaloids

生物碱	回归曲线方程	线性范围/ (μg · mL ⁻¹)	r
原阿片碱	$Y = 9.05 \times 10^3 X - 2.62 \times 10^3$	0.11~ 22.0	0.999 9
别隐品碱	$Y = 4.92 \times 10^3 X + 9.09 \times 10^2$	0.42~ 84.7	0.999 6
血根碱	$Y = 2.49 \times 10^4 X - 6.05 \times 10^3$	0.43~ 86.6	0.999 9
小檗碱	$Y = 1.64 \times 10^4 X + 3.56 \times 10^3$	0.38~ 75.9	0.999 8
白屈菜红碱	$Y = 2.82 \times 10^4 X - 1.76 \times 10^4$	0.50~ 99.6	0.999 7
二氢白屈菜红碱	$Y = 2.21 \times 10^4 X - 3.20 \times 10^4$	0.52~ 104.5	0.999 8
二氢血根碱	$Y = 4.01 \times 10^4 X - 2.32 \times 10^4$	0.51~ 101.5	0.999 8

表 2 小果博落回不同部位中 7 种生物碱测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Determination of seven isoquinolines alkaloids from different parts of *M. microcarpa* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

部位	质量分数/(mg · g ⁻¹)						
	原阿片碱	别隐品碱	血根碱	小檗碱	白屈菜红碱	二氢白屈菜红碱	二氢血根碱
根	1.76 ± 0.03	4.94 ± 0.02	2.19 ± 0.04	0.02 ± 0.01	1.41 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.01
茎	0.71 ± 0.01	0.42 ± 0.02	1.76 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.92 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.03
叶	0.54 ± 0.03	2.99 ± 0.02	11.33 ± 0.01	—	10.18 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.34 ± 0.02
果实	0.92 ± 0.01	32.10 ± 0.08	0.99 ± 0.01	—	1.84 ± 0.02	—	—

“—” 低于检测限

“—” below testing limit

3 讨论

3.1 本实验利用 Waters 2998 PAD 检测器对单个生物碱进行了三维图谱分析, 原阿片碱在 288 nm、别隐品碱在 284 nm、二氢血根碱在 285 nm、二氢白屈菜红碱在 281.5 nm、血根碱在 275 nm、白屈菜红碱在 270 nm、小檗碱在 264 nm 和 328 nm 处有最大吸收; 同时对 7 种混合对照品溶液进行三维图谱分析, 发现在 284 nm 波长条件下 7 种生物碱同时存在

2.5 精密度试验: 精密吸取对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样量均为 5 μL, 结果生物碱 1~ 7 峰面积的 RSD 分别为 1.48%、1.21%、1.36%、1.65%、1.46%、1.78%、1.23%。

2.6 重现性试验: 取同一批小果博落回样品 6 份, 每份约 1.0 g, 按“2.3”项下样品溶液的制备方法制备样品溶液, 并按照“2.1”项下的色谱条件进行测定, 计算, 结果样品中生物碱 1~ 7 质量分数的 RSD 分别为 1.12%、1.34%、1.89%、1.32%、1.43%、1.28%、1.36%。

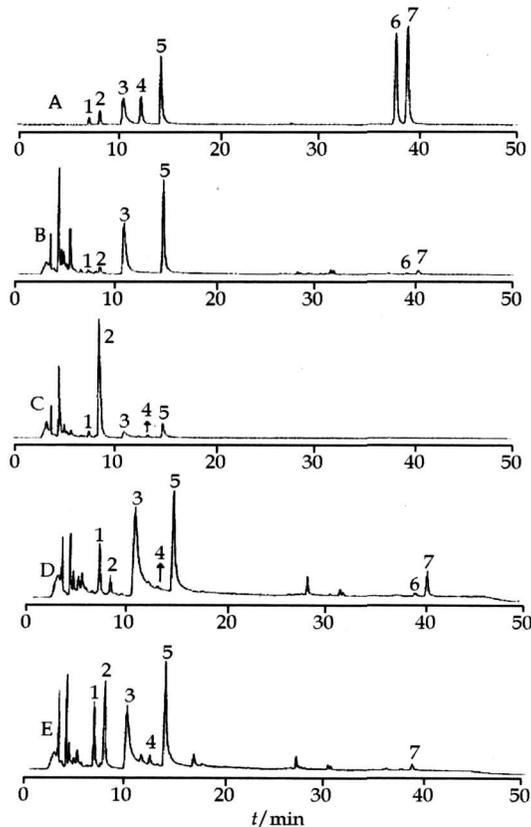
2.7 稳定性试验: 取小果博落回同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、10、12 h, 按照“2.1”项下的色谱条件测定, 结果生物碱 1~ 7 峰面积的 RSD 分别为 0.96%、1.24%、1.78%、1.65%、1.97%、1.01%、1.08%, 表明溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 加样回收试验: 取已测定的样品粗粉, 采用甲醇-1% 盐酸(50: 50) 为提取溶液考察 7 种生物碱的回收率。3 个浓度水平的 7 种生物碱混合对照品溶液加入到未处理的小果博落回样品中, 按照“2.3”项下供试品溶液制备方法进行提取, 并进行分析测定。结果生物碱 1~ 7 平均回收率分别为 97.8%、97.0%、98.9%、102.2%、98.6%、101.8%、102.9%; RSD 分别为 2.6%、1.8%、3.0%、2.1%、1.6%、1.9%、2.5%。

2.9 样品测定: 按照“2.3”项下制备供试品溶液, 分别进样 5 μL, 测定, 记录色谱图, 计算供试品溶液中生物碱 1~ 7 的量, 结果见表 2 和图 1。

较大吸收, 且各生物碱分离效果较好, 故选择 284 nm 作为最佳检测波长。

3.2 本实验分别考察了甲醇-水、甲醇-磷酸、乙腈-水、乙腈-磷酸等流动相, 发现在甲醇条件下, 原阿片碱和别隐品碱很难分离, 在乙腈条件下, 各生物碱均能分离, 但血根碱、小檗碱和白屈菜红碱拖尾较严重, 故选择在乙腈-磷酸条件加入 0.5% 的三乙胺缓冲液, 抑制生物碱色谱峰拖尾, 同时采用梯度洗脱, 7



1-原阿片碱 2-别隐品碱 3-血根碱 4-小檗碱
5-白屈菜红碱 6-二氢白屈菜红碱 7-二氢血根碱
1-protopine 2-allocryptopine 3-sanguinarine 4-berberine
5-chelerythrine 6-dihydrochelerythrine 7-dihydrosanguinarine
图 1 对照品(A)及小果博落回叶(B)、果实(C)、茎(D)、
根(E)的HPLC色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), leaves (B), fruits (C), stems (D), and roots (E) of *M. microcarpa*

种生物碱分离效果较理想。

3.3 本实验分别考察了甲醇、乙醇、1% 盐酸、甲醇

1% 盐酸等不同提取溶剂, 超声、回流等不同提取方式, 并进行了提取时间为 30、45、60、75 min, 提取次数为 1、2 次的考察, 结果表明, 以甲醇-1% 盐酸 (50: 50) 为溶剂, 超声提取 60 min, 提取 1 次即可将总生物碱提取完全, 因此选择该提取方法。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- [2] 曾建国. 别隐品碱在农药杀菌剂中的应用[P]. 中国专利: CN101401579A, 2009-04-08
- [3] Chang H L, Jaw C C, Chien Y H, et al. Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α productions via the inhibition of I κ B degradation in human lung cells [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 56: 193-201.
- [4] 曾建国. 普托品类总生物碱在抗寄生虫兽药中的应用[P]. 中国专利: CN101502567A, 2009-08-12
- [5] 刘年猛, 彭飞, 黄琼瑶, 等. 血水草总生物碱灭钉螺的初步探讨[J]. *中国血吸虫病防治*, 2001, 13(5): 303
- [6] Barreto M C, Ruy E P, Joao D A, et al. Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 146: 37-47.
- [7] 曾建国, 钟明, 姚利. 博落回总生物碱或其盐在抗血吸虫致肝纤维化治疗中的应用[P]. 中国专利: CN101297870A, 2008-11-05
- [8] 曾建国, 钟明, 姚利. 别隐品碱及其盐在抗肝纤维化中的应用[P]. 中国专利: CN101327221A, 2009-12-24
- [9] Jiri V, Petr D, Jaroslav V, et al. Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22: 1008-1017.
- [10] 宗永立, 刘艳平. 白屈菜红碱诱导细胞凋亡的机理综述[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(10): 2068-2069
- [11] 曾建国, 张胜, 侯团章, 等. 不同生长期博落回果实中血根碱和白屈菜红碱的含量[J]. *中药材*, 1999, 22(5): 229
- [12] 安彩贤, 杨广德, 叶建涛, 等. RP-HPLC 法同时测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量研究[J]. *中成药*, 2001, 23(11): 824-825
- [13] Abizov E A, Tolkachev O N, Kopylova I E. Distribution of the sum of sanguinarine and chelerythrine in the above-ground part of *Macleaya microcarpa* [J]. *Pharm Chem J*, 2003, 37(8): 413-414

气相色谱法测定山蜡梅叶中桉油精和芳樟醇

魏惠珍¹, 饶毅^{1*}, 陈燕军², 夏川川², 冯育林¹, 张小娟¹, 杨世林¹

(1 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西南昌 330006; 2 江西中医学院, 江西南昌 330004)

摘要: 目的 建立气相色谱法测定山蜡梅叶中桉油精和芳樟醇的方法。方法 气相色谱法, DB-WAX 石英毛细管柱(30.0 m \times 250 μ m, 0.25 μ m), FID 检测器, 进样口温度: 230 $^{\circ}$ C, 检测口温度 250 $^{\circ}$ C, 体积流量 1 mL/min, 分流: 20: 1, 程序升温: 起始温度 60 $^{\circ}$ C, 保持 5 min, 以 25 $^{\circ}$ C/min 升至 200 $^{\circ}$ C, 保持 2 min。结果 桉油精在 0.015 7~0.393 6 mg/mL 与峰面积比值(桉油精/环己酮)呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 13\ 659 X + 0\ 066\ 5$, $r = 0\ 999\ 8$,

* 收稿日期: 2009-12-11

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2006BAI06A18-09)

作者简介: 魏惠珍(1965-), 女, 江西南昌人, 主要从事药物质量控制研究工作。

* 通讯作者 饶毅 Tel: (0791) 7119609 E-mail: raoyi99@126.com