

RP-HPLC 法同时测定醋延胡索配方颗粒中 7 种生物碱

毕福钧, 林 彤*

广州市药品检验所, 广东 广州 510160

摘 要: **目的** 建立 RP-HPLC 法同时测定醋延胡索配方颗粒中原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的方法。**方法** 采用 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.1%磷酸水溶液 (三乙胺调 pH 值至 6.0) (10:90) 为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm。**结果** 原阿片碱线性范围为 6.8~119.0 ng, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 98.2%, RSD 为 2.0%; 盐酸巴马汀线性范围为 24.38~426.65 ng, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 99.6%, RSD 为 2.8%; 盐酸小檗碱线性范围为 8.88~155.40 ng, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 100.2%, RSD 为 1.3%; 脱氢紫堇碱线性范围为 77.66~1 359.05 ng, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 99.0%, RSD 为 2.2%; 延胡索乙素线性范围为 41.4~724.5 ng, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 100.8%, RSD 为 2.6%; 四氢小檗碱线性范围为 6.70~117.25 ng, $r=0.999\ 7$, 平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.5%; 延胡索甲素线性范围为 25.50~446.25 ng, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 97.7%, RSD 为 2.2%。**结论** 该法分离度好, 快速简便, 重现性好, 可用于醋延胡索配方颗粒的质量控制。

关键词: 醋延胡索配方颗粒; 原阿片碱; 盐酸巴马汀; 盐酸小檗碱; 脱氢紫堇碱; 延胡索乙素; 四氢小檗碱; 延胡索甲素; RP-HPLC

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)04-0606-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.013

Simultaneous determination of seven alkaloids in Cuyanhusuo Granule by RP-HPLC

BI Fu-jun, LIN Tong

Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China

Abstract: Objective To establish HPLC method for the simultaneous determination of protopine, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, tetrahydroberberine, and corydaline in Cuyanhusuo Granule. **Methods** The analysis was performed on Ultimate AQ-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (adjust to pH 6.0 with triethylamine) (10:90). The UV detection wavelength was set at 280 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The linear ranges of protopine, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, tetrahydroberberine, and corydaline were 6.8—119.0 ($r=0.999\ 9$), 24.38—426.65 ($r=0.999\ 9$), 8.88—155.40 ($r=0.999\ 9$), 77.66—1 359.05 ($r=0.999\ 9$), 41.4—724.5 ($r=0.999\ 9$), 6.70—117.25 ($r=0.999\ 9$), and 25.50—446.25 ng ($r=0.999\ 9$). The average recoveries ($n=6$) were 98.2% (RSD = 2.0%), 99.6% (RSD = 2.8%), 100.2% (RSD = 1.3%), 99.0% (RSD = 2.2%), 100.8% (RSD = 2.6%), 98.7% (RSD = 2.5%), and 97.7% (RSD = 2.2%), respectively. **Conclusion** This method is simple and rapid, and can be used for the quality control of Cuyanhusuo Granule with satisfactory separation and repeatability.

Key words: Cuyanhusuo Granule; protopine; palmatine hydrochloride; berberine hydrochloride; dehydrocorydaline; tetrahydropalmatine; tetrahydroberberine; corydaline; RP-HPLC

醋延胡索配方颗粒为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎经醋炮制后加工而成的颗粒剂, 作为醋延胡索饮片的免煎

形式, 供临床配方使用。药理及化学成分研究表明, 延胡索中主要有效成分是生物碱类成分, 具有镇痛、镇静、降压、抗心律失常等作用; 其中绝大多数属于

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 国家药典委员会中药配方颗粒质量标准示范性研究项目

作者简介: 毕福钧 (1982—), 男, 硕士, 副主任中药师, 主要从事中药检验和质量标准研究。Tel: (020)81613880 E-mail: bfujiun@hotmail.com

*通信作者 林 彤 Tel: (020)81613880 E-mail: lint@gzfd.gov.cn

异喹啉类生物碱, 根据母核类型的不同又可以分为原小檗碱类, 如延胡索甲素、延胡索乙素、脱氢紫堇碱等; 阿朴菲类, 如海罂粟碱、去氢海罂粟碱等; 普托品类, 如原阿片碱等^[1-2]。目前, 醋延胡索配方颗粒暂无国家标准, 其有效成分定量测定方法的研究^[3]与大多数延胡索药材、饮片以及含延胡索的其他中成药制剂质量标准类似, 以延胡索乙素作为定量测定的指标成分, 质控指标单一, 专属性不强^[4-6]。研究表明, 配方颗粒的质控标准与原药材应有所差异^[7-8]。因此, 本实验从多种有效成分同时监控的角度出发, 建立一种 RP-HPLC 法同时测定醋延胡索配方颗粒中原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素 7 种生物碱的方法, 为醋延胡索配方颗粒国家标准的制定提供参考。

1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 包括 DAD 检测器, 四元泵, 自动进样器、化学工作站等, 美国 Agilent 公司; XS204 电子天平和 XP26 电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司。

对照品原阿片碱 (批号 110853-201003, 质量分数为 99.9%)、盐酸巴马汀 (批号 110732-201108, 质量分数为 86.2%)、盐酸小檗碱 (批号 110713-200911, 质量分数为 86.8%)、延胡索乙素 (批号 110726-201213, 质量分数为 99.8%), 中国食品药品检定研究院提供; 对照品脱氢紫堇碱 (批号 13060621, 质量分数为 98.0%)、四氢小檗碱 (批号 13061823, 质量分数为 98.0%), 上海同田生物技术股份有限公司; 对照品延胡索甲素 (批号 130429, 质量分数为 98.0%) 购自四川省维克奇生物科技有限公司。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

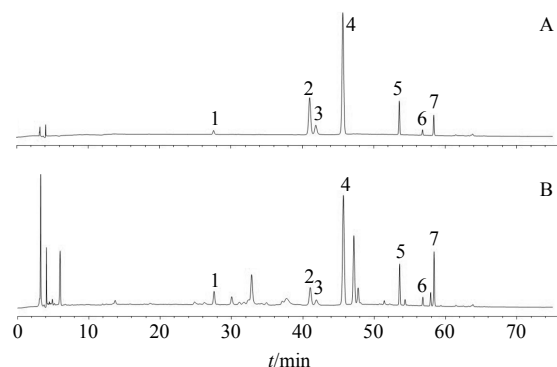
12 批醋延胡索配方颗粒分别由华润三九医药股份有限公司 (批号 130706-1、130706-2)、四川新绿色药业科技发展股份有限公司 (批号 03096、03108)、广东一方制药有限公司 (批号 130710-1、130710-2)、江阴天江药业有限公司 (批号 130516-1、130516-2)、培力 (南宁) 药业有限公司 (批号 130615-1、130615-2) 和北京康仁堂药业有限公司 (批号 131202、140114) 提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱 Ultimate AQ-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm,

5 μm); 柱温 35 °C; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (三乙胺调 pH 值至 6.0), 梯度洗脱: 0~26 min, 10%~25%乙腈; 26~40 min, 25%~28%乙腈; 40~55 min, 28%~65%乙腈; 55~70 min, 65%~80%乙腈; 70~75 min, 80%乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 280 nm; 进样量为 10 μL。理论板数按脱氢紫堇碱峰计算应不低于 5 000。色谱图见图 1。



1-原阿片碱 2-盐酸巴马汀 3-盐酸小檗碱 4-脱氢紫堇碱 5-延胡索乙素 6-四氢小檗碱 7-延胡索甲素
1-protopine 2-palmatine hydrochloride 3-berberine hydrochloride 4-dehydrocorydaline 5-tetrahydropalmatine 6-tetrahydroberberine 7-corydaline

图 1 混合对照品溶液 (A) 和醋延胡索配方颗粒供试品溶液 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference solution (A) and sample solution of Cuyanhusuo Granule (B)

2.2 对照品溶液制备

精密称取原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素对照品适量, 加甲醇制成含原阿片碱 4 μg/mL、盐酸巴马汀 16 μg/mL、盐酸小檗碱 4 μg/mL、脱氢紫堇碱 40 μg/mL、延胡索乙素 20 μg/mL、四氢小檗碱 4 μg/mL 和延胡索甲素 12 μg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液制备

取装量差异项下的本品, 混匀, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 加热回流 40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下制备的混合对照品贮备溶液 2、5、10、15、20、25、30、35 μL, 按“2.1”

项下色谱条件测定峰面积。以对照品的进样量为横坐标 (X), 相应色谱峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得到 7 个生物碱成分的标准曲线方程、相关系数 (r) 和线性范围, 结果分别为原阿片碱 $Y=6\,658.3X+9.829\,2$, $r=0.999\,9$, $6.8\sim119.0$ ng; 盐酸巴马汀 $Y=24\,916X-98.63$, $r=0.999\,9$, $24.38\sim426.65$ ng; 盐酸小檗碱 $Y=20\,634X-37.041$, $r=0.999\,9$, $8.88\sim155.40$ ng; 脱氢紫堇碱 $Y=20\,290X-58.336$, $r=0.999\,9$, $77.66\sim1\,359.05$ ng; 延胡索乙素 $Y=5\,442.4X+39.163$, $r=0.999\,9$, $41.4\sim724.5$ ng; 四氢小檗碱 $Y=5\,138X-1.387\,4$, $r=0.999\,7$, $6.7\sim117.25$ ng; 延胡索甲素 $Y=4\,960.1X+69.149$, $r=0.999\,9$, $25.50\sim446.25$ ng。

2.5 精密密度试验

精密吸取同一对照品溶液 $10\,\mu\text{L}$, 重复进样 6 次, 记录峰面积。结果显示, 原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的峰面积 RSD 值分别为 1.5%、1.8%、2.0%、0.9%、1.2%、1.5%、1.5%, 表明仪器精密密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批醋延胡索配方颗粒 (批号 G1307001) 6 份, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果显示, 原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的平均质量分数分别为 0.93、1.04、0.24、5.87、1.38、0.19、1.13 mg/g, RSD 分别为 2.5%、2.4%、2.7%、2.7%、1.8%、2.3%、2.3%, 表明方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液各 $10\,\mu\text{L}$, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 结果显示原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的平均质量分数分别为 0.93、1.05、0.25、5.96、1.40、0.19、1.13 mg/g, RSD 分别为 2.4%、1.7%、1.6%、2.9%、2.7%、2.7%、1.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定的供试品 (批号 G1307001) 6 份, 每份约 0.1 g, 分别置平底烧瓶中, 精密加入混合对照品 (原阿片碱 $4.967\,53\,\mu\text{g/mL}$ 、盐酸巴马汀 $4.922\,02\,\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 $0.982\,14\,\mu\text{g/mL}$ 、脱氢

紫堇碱 $28.478\,8\,\mu\text{g/mL}$ 、延胡索乙素 $6.793\,9\,\mu\text{g/mL}$ 、四氢小檗碱 $0.951\,58\,\mu\text{g/mL}$ 、延胡索甲素 $5.338\,55\,\mu\text{g/mL}$) 甲醇溶液 $20\,\text{mL}$, 按“2.3”项下方法制备, 依法测定, 计算回收率。原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的平均回收率分别为 98.2%、99.6%、100.2%、99.0%、100.8%、98.7%、97.7%, RSD 分别为 2.0%、2.8%、1.3%、2.2%、2.6%、2.5%、2.2%。

2.9 样品测定

取收集到的 12 批样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 用外标法计算样品中原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的量, 结果见表 1。

3 讨论

醋延胡索配方颗粒由醋延胡索经水煎煮制成。目前《中国药典》2010 年版一部^[9]中与延胡索相关的定量测定方法研究主要以延胡索乙素作为定量测定的指标成分^[10], 但延胡索乙素的专属性不强, 在同科属药材夏天无中的量也较高。

鉴于醋延胡索配方颗粒已经失去了药材饮片原来的外观特征, 无法在性状鉴别中辨别真伪, 若单以延胡索乙素作为质控目标, 明显不合理, 前期的研究表明延胡索乙素只是延胡索其中一种生物碱, 其量也不算最高。因此, 本研究首次建立一种 RP-HPLC 法同时测定醋延胡索配方颗粒中原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、脱氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素 7 种生物碱的量, 方法简便, 准确, 重现性好, 可实现对醋延胡索配方颗粒有效成分更全面、更专属的质量控制, 为其国家标准的制定提供参考。

在检测波长的选择上, 在波长 $210\sim400\,\text{nm}$ 对 7 种生物碱对照品溶液进行全扫描, 结果表明, 7 种生物碱在在 $(280\pm2)\,\text{nm}$ 波长处均有较大吸收, 因此选择 $280\,\text{nm}$ 作为检测波长。

实验中比较了不同提取溶剂 (甲醇、甲醇-浓氨试液、50% 甲醇和水) 以及不同提取方法 (超声提取和加热回流提取) 的提取效果, 结果显示, 甲醇加热回流提取的效果最理想; 另外, 对加热回流的时间 (20、40、60、120 min) 进行了考察, 结果表明加热回流提取 40 min 即可。因此, 最终确定供试品溶液的制备方法为甲醇加热回流提取 40 min。

表 1 样品测定结果 ($n=2$)
Table 1 Determination results of samples ($n=2$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	原阿片碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	脱氢紫堇碱	延胡索乙素	四氢小檗碱	延胡索甲素
130706-1	0.84	0.76	0.20	4.29	1.79	0.32	1.69
130706-2	0.77	0.52	0.13	2.81	1.36	0.23	1.11
03096	0.67	0.64	0.18	4.39	1.35	0.22	0.90
03108	0.66	0.64	0.17	4.35	1.33	0.22	0.89
130710-1	0.93	1.04	0.24	5.87	1.38	0.19	1.13
130710-2	0.85	0.96	0.25	5.59	1.30	0.18	1.03
130516-1	0.70	0.63	0.20	3.53	1.36	0.25	1.35
130516-2	1.09	0.90	0.31	4.31	1.71	0.30	1.33
130615-1	0.93	0.48	0.19	3.01	2.11	0.45	2.69
130615-2	0.91	0.47	0.19	2.98	2.16	0.46	2.92
131202	0.72	0.75	0.19	4.27	1.26	0.19	1.05
140114	0.81	1.02	0.30	5.71	1.40	0.20	1.14

由样品的测定结果可见,不同企业生产的醋延胡索配方颗粒中盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索甲素等成分的量差异较大,这可能与投料醋延胡索饮片的质量、企业的工艺条件等因素有关。其次,所测定 7 种生物碱质量分数之间的差别也很大(0.18~5.87 mg/g),因此可以考虑以质量分数较高的几个生物碱(如脱氢紫堇碱、延胡索乙素、延胡索甲素等)的总量作为质量评价指标。

7 种生物碱可根据母核类型的不同进行区分,每种类型的生物碱也可以考虑采用一测多评方法测定同类型生物碱的量,以减少对照品的使用。

参考文献

[1] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
[2] 贺 凯, 高建莉, 赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1909-1912.

[3] 蓝明雄. 醋延胡索配方颗粒质量标准的研究 [J]. 中国中医药咨询, 2011, 20(3): 66-67.
[4] 魏惠珍, 谢 菲, 饶 毅, 等. HPLC 法测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素及其不确定度评定 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 299-302.
[5] 刘 梅, 汤树良, 张文惠. HPLC 色谱指纹图谱鉴别夏天无和延胡索药材 [J]. 中药材, 2003, 26(9): 629-631.
[6] 张 捷, 黄荣华. HPLC 测定延胡索不同炮制品中延胡索乙素含量 [J]. 西北药学杂志, 2006, 21(5): 209-210.
[7] 王 杰, 刘 冰, 周 军, 等. 六味地黄配方颗粒与传统汤剂中 6 种有效成分的比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2887-2891.
[8] 孙源源, 施 萍. 借助中药配方颗粒推进中药国际化的对策研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 929-934.
[9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[10] 王正宽, 刘 圆, 周 萌, 等. 中试规模下 Box-Behnken 法优化延胡索微波提取工艺 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2394-2399.