

夏天无 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究

黄涛¹, 刘丽^{2,3#}, 张笑敏², 许浚^{3,4*}, 陈常青^{3,4*}

1. 天津市儿童医院, 天津 300074

2. 天津中医药大学, 天津 301617

3. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300193

4. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 建立夏天无 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定方法, 为夏天无药材质量标准提升提供科学依据。方法 采用 HPLC 法, Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.2%冰醋酸溶液 (三乙胺调 pH 6.0) 为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 280 nm; 建立 15 批夏天无药材的指纹图谱, 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012A 版) 进行评价, 聚类分析和主成分分析将 15 批药材分为 2 类, 同时测定原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素 4 种成分的含量。结果 建立了夏天无药材的 HPLC 指纹图谱, 共标定了 10 个共有峰; 原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素线性关系良好, r 均大于 0.999 9, 平均回收率分别为 97.12%、100.09%、98.53%、99.71%。结论 HPLC 指纹图谱结合多指标成分测定可为夏天无药材质量评价提供参考。

关键词: 夏天无; 指纹图谱; 原阿片碱; 黄藤素; 荷包牡丹碱; 延胡索乙素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2474-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.031

HPLC fingerprint and multicomponents determination of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

HUANG Tao¹, LIU Li^{2,3}, ZHANG Xiao-min², XU Jun^{3,4}, CHEN Chang-qing^{3,4}

1. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and multicomponents determination of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*, and provide a scientific basis for the improvement of its quality standards. **Methods** The separation was performed on a chromatographic Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.2% acetic acid (adjusting pH to 6.0 with triethylamine) as the mobile phase for gradient elution. Volume flow rate was 1.0 mL/min. Column temperature was 35 ℃. Injection was 10 μL and the detection wavelength was 280 nm. The fingerprints of 15 batches of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* were established and evaluated by the similarity evaluation system of TCM (version 2012A), which were divided into two categories by clustering analysis and principal component analysis. Meanwhile, the content of protopine, palmatine, bicuculline and tetrahydropalmatine was determined. **Results** The fingerprint of *Corydalis Decumbentis Rhizoma* was established. There were 10 common peaks in the fingerprint. Protopine, palmatine, bicuculline and *dl*-tetrahydropalmatine were separated with good linearity relationships ($r > 0.999 9$). The average recovery rates of the investigated compounds were 97.12%, 100.09%, 98.53%, and 99.71%, respectively. **Conclusion** HPLC fingerprint combined with multicomponents determination can provide the reference for the quality evaluation of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*.

Key words: *Corydalis Decumbentis Rhizoma*; fingerprint; protopine; palmatine; bicuculline; *dl*-tetrahydropalmatine

收稿日期: 2019-03-12

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81430096)

作者简介: 黄涛, 男, 研究方向为医院药学。Tel: 13001308196 E-mail: 383577668@qq.com

*通信作者 陈常青, 男, 研究员, 主要从事中药研究。E-mail: chencq@tjpr.com

许浚, 男, 研究员, 主要从事中药新药与中药质量研究。E-mail: xuj@tjpr.com

#并列第一作者 刘丽 (1993—), 女, 天津中医药大学中药学硕士研究生, 主要从事中药质量研究。

Tel: (022)23006843 E-mail: 15084882605@163.com

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎。其性苦、微辛，温，归肝经，用于卒中偏瘫、头痛、跌扑损伤、风湿痹痛、腰腿疼痛^[1]。现代药理学研究表明，夏天无具有抗炎、镇痛、降压、抗心律失常、保护脑神经、抗脑梗死、抗血小板聚集、抗血栓、兴奋平滑肌、抗胆碱酯酶等作用^[2-6]。研究表明，夏天无主要活性成分为生物碱类，其中原阿片碱、巴马汀、延胡索乙素及荷包牡丹碱等含量较高^[7-11]。现多采用 HPLC 法测定延胡索中原阿片碱、盐酸巴马汀和延胡索乙素的含量^[12]。

化学成分是药效物质发挥作用的基础，传统中药的质量与其有效成分密切相关。中药化学成分繁多，因此选择指纹图谱结合多指标含量测定能够更好地控制中药质量的一致性和优劣评价。夏天无现行标准收载于《中国药典》2015 年版一部，包括性状鉴别、显微鉴别、薄层色谱鉴别及原阿片碱、盐酸巴马汀的含量测定^[1]。现行质量标准存在着质控指标单一等问题，为了更合理地评价药材质量，本实验收集了 15 批夏天无药材，建立了其 HPLC 指纹图谱，在前期化学成分、现代药理研究及质量标志物预测分析的基础上，测定原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱及延胡索乙素 4 种有效成分的含量。所建立的方法专属性强，可同时从定性、定量两方面来控制夏天无药材质量，更加全面地建立了夏天无的质量控制体系。

1 仪器与材料

Agilent1260 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，美国 Dikma 公司；AB204-N 电子天平（十万分之一），德国 Meteler 公司；BT25S 电子天平（万分之一），德国 Sartorius 公司；超声波清洗机，宁波新芝生物科技有限公司。

原阿片碱（批号 MUST-17032408）、荷包牡丹碱（批号 MUST-16070212）均购自成都曼思特生物科技有限公司；黄藤素（批号 J140303）、延胡索乙素（批号 J140303）均购自上海将来试剂有限公司，质量分数均大于 98%。乙腈（色谱纯）、甲醇（色谱纯）、乙醇（分析纯）、冰乙酸（分析纯），天津市康科德科技有限公司；三乙胺（分析纯），天津光复精密化工研究所；纯净水，广州屈臣氏有限公司。15 批夏天无药材产地与批号见表 1，药材均由天津饮片厂制药有限公司提供，经天津药物研究院中药现代研究所张铁军研究员鉴定为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbens*

表 1 药材产地与批号

Table 1 Habitats and batch numbers of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	2017042002	江西	S9	2017042011	河南
S2	2017042003	江西	S10	2017063001	江西
S3	2017042004	江西	S11	2017080801	江西
S4	2017042005	江西	S12	2017080802	江西
S5	2017042007	河南	S13	2017082502	江西
S6	2017042008	河南	S14	2017082504	江西
S7	2017042009	河南	S15	2017121201	江西
S8	2017042010	河南			

(Thunb.) Pers. 的干燥块茎，符合《中国药典》2015 年版一部的有关规定。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液制备

取原阿片碱、荷包牡丹碱、黄藤素、延胡索乙素对照品适量，精密称定，加甲醇制成含原阿片碱 60.6 μg/mL、黄藤素 24.8 μg/mL、荷包牡丹碱 39.8 μg/mL、延胡索乙素 88.8 μg/mL 的混合对照品溶液，摇匀，即得。

2.2 供试品溶液制备

取夏天无药材粉末（过 40 目筛）约 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，称定质量，浸泡 30 min，超声处理 60 min，放至室温，用 70% 甲醇补足减失质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.2% 冰醋酸溶液（三乙胺调 pH 6.0），梯度洗脱：0~10 min，13%~15% 乙腈；10~15 min，15%~25% 乙腈；15~32 min，25%~29% 乙腈；32~35 min，29% 乙腈；35~60 min，29%~62% 乙腈；60~65 min，62%~90% 乙腈；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 °C；进样量 10 μL；检测波长 280 nm；理论塔板数按原阿片碱峰计算不低于 3 000。

2.4 指纹图谱的方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号为 2017042005 夏天无药材粉末（S4），按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3”项下色谱条件测定，连续进样 6 次，记录指纹图谱，以 10 号峰（延胡索乙素）的保留时间和色谱峰面积为参照，计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间及峰面积的 RSD 值均小于 3%。

2.4.2 稳定性试验 取精密度试验项下同一供试品溶

液 (S4), 按照“2.3”项下色谱条件, 分别在 0、3、6、9、12、24 h 时测定, 记录指纹图谱, 以 10 号峰 (延胡索乙素) 的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%。

2.4.3 重复性试验 取同一批次夏天无药材 (S4) 粉末 6 份, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件测定, 记录指纹图谱, 以 10 号峰 (延胡索乙素) 的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的建立及相似度评价 取 15 批夏天无药材, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件测定, 得到 15 批夏天无指纹图谱 (图 1), 将得到的数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012A 版进行分析, 以 S1 为参照指纹图谱, 采用多点校正后进行自动匹配, 生成对照指纹图谱, 并对色谱峰进行指认 (图 2)。将 15 批夏天无供试品色谱图与对照指纹图谱匹配, 进行相似度评价, 结果见表 2。

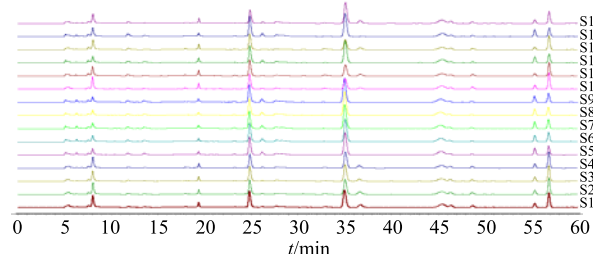
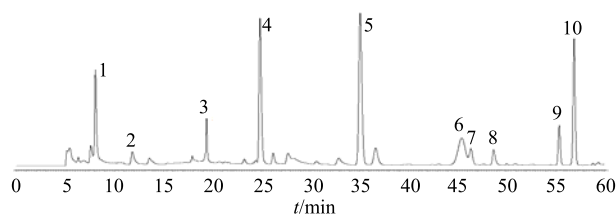


图 1 15 批夏天无 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*



4-原阿片碱 5-黄藤素 9-荷包牡丹碱 10-延胡索乙素
4-protopine 5-palmatine 9-bicuculline 10-dl-tetrahydropalmatine

图 2 夏天无对照指纹图谱

Fig. 2 Comparison fingerprint of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

表 2 15 批夏天无药材相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation of 15 batches of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.983	S9	0.975
S2	0.973	S10	0.937
S3	0.984	S11	0.960
S4	0.979	S12	0.982
S5	0.983	S13	0.945
S6	0.985	S14	0.985
S7	0.975	S15	0.982
S8	0.974		

2.5.2 聚类分析 在“2.5.1”项条件下, 以 S1 作为参照图谱自动匹配, 运用 SPSS 21.0 数据分析软件对其进行系统聚类分析, 利用平方欧氏距离作为样品的测度, 采用组间联接法进行聚类, 聚类结果见图 3。结果显示, 15 批夏天无药材分为 2 类, 其中产自江西的 10 批夏天无药材 (S1~4、S10~15) 聚为一类, 其余 5 批产自河南的夏天无 (S5~9) 聚为一类。

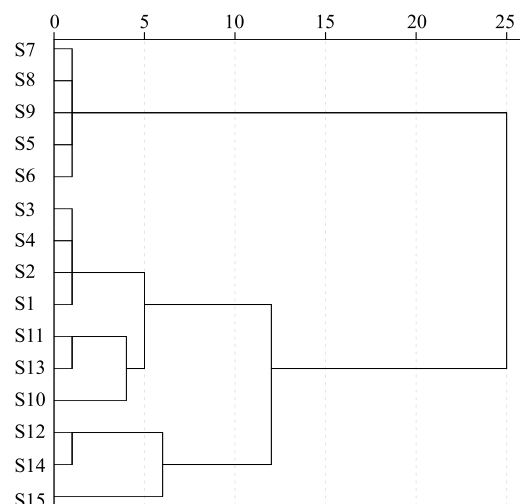


图 3 15 批夏天无药材聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis result of 15 batches of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

2.5.3 主成分分析 (PCA) 为了评价所有成分的样品分辨能力, 运用 SIMCA-P 12.0 分析软件对其进行主成分分析, 结果见图 4。由 PCA 图可以看出: 产自江西的 10 批夏天无药材 (药材 S1~4、S10~15) 整体聚为一类, 其余 5 批 (药材 S5~9) 聚为一类, 与聚类分析结果一致。

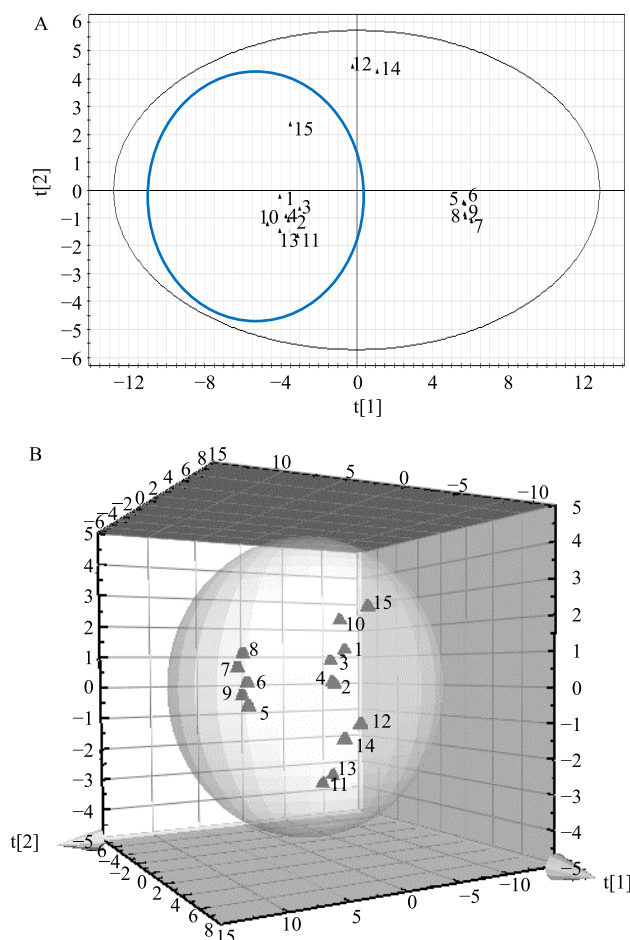


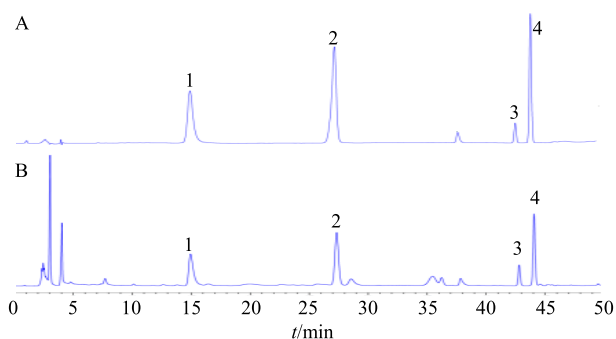
图 4 夏天无药材 PCA (A) 和 PCA 3D (B) 图
Fig. 4 PCA (A) and PCA 3D (B) of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

2.6 多指标成分测定

2.6.1 混合对照品溶液制备 同“2.1”项下混合对照品溶液的制备方法。

2.6.2 供试品溶液制备 取夏天无药材粉末(过 40 目筛)约 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定质量, 回流提取 60 min, 放至室温, 用 70% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.6.3 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%冰醋酸溶液(三乙胺调 pH 6.0), 梯度洗脱: 0~10 min, 13%~15% 乙腈; 10~15 min, 24% 乙腈; 15~25 min, 24%~30% 乙腈; 25~45 min, 30%~65% 乙腈; 45~50 min, 65%~100% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 280 nm; 结果各成分色谱峰与相邻峰的分度均大于 1.5, 理论塔板数按原阿片碱峰计算不低于 3 000。对照品和供试品色谱图见图 5。



1-原阿片碱 2-黄藤素 3-荷包牡丹碱 4-延胡索乙素

1-protopine 2-palmatine 3-bicuculline 4-dl-tetrahydropalmatine

图 5 混合对照品 (A) 及夏天无供试品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 5 HPLC of reference substance (A) and *Corydalis Decumbentis Rhizoma* (B)

2.6.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液, 制成 6 个不同质量浓度的对照品溶液, 按照“2.6.3”项下色谱条件进行测定, 并记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得标准曲线方程。4 个成分的线性回归方程见表 3。

表 3 4 种成分标准曲线

Table 3 Calibration curves of four constituents

成分	回归方程	r^2	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
原阿片碱	$Y=985.6169X+2.4652$	0.9999	121.2~1212.0
黄藤素	$Y=3542.6171X+4.5147$	0.9999	49.6~496.0
荷包牡丹碱	$Y=496.1209X+1.4308$	0.9999	79.6~796.0
延胡索乙素	$Y=838.1255X+2.7086$	0.9999	177.6~1776.0

2.6.5 精密度试验 取同一批夏天无药材粉末 (S4), 按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.6.3”项下色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积。计算原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素峰面积 RSD 值分别为 0.176%、0.169%、0.210%、0.957%, 表明仪器精密度良好。

2.6.6 稳定性试验 取精密度试验项下同一供试品溶液, 按照“2.6.3”项下色谱条件, 分别在 0、3、6、9、12、24 h 测定, 记录峰面积。计算原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素峰面积 RSD 值分别为 0.212%、0.487%、0.794%、0.998%, 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.6.7 重复性试验 取同一批次夏天无药材 (S4) 粉末 6 份, 按照“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,

按照“2.6.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。计算原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素质量分数的 RSD 值分别为 1.611%、1.414%、1.323%、1.303%,表明本法重复性良好。

2.6.8 加样回收率试验 取同一批次夏天无药材(S4)粉末 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别按已知含量的 50%加入原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱及延胡索乙素对照品,按照“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.6.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。计算原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素平均加样回收率分别为 97.12%、100.09%、98.53%、99.71%,RSD 值分别为 0.97%、0.67%、1.61%、1.99%。

2.6.9 样品测定 分别取 15 批夏天无药材粉末,按照“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.6.3”项下色谱条件测定,计算样品中原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱和延胡索乙素 4 个成分的量,结果见表 4,各指标成分含量累积加和图见图 6。

3 讨论

3.1 提取溶剂的考察

平行取 4 份夏天无药材粉末约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 90%甲醇、70%甲

表 4 15 批夏天无含量测定结果

Table 4 Determination results of 15 batches of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	原阿片碱	黄藤素	荷包牡丹碱	延胡索乙素
S1	0.406	0.163	0.199	0.426
S2	0.364	0.144	0.197	0.459
S3	0.371	0.157	0.198	0.444
S4	0.359	0.154	0.199	0.468
S5	0.446	0.211	0.319	0.282
S6	0.464	0.211	0.303	0.293
S7	0.429	0.225	0.317	0.281
S8	0.419	0.226	0.304	0.266
S9	0.442	0.222	0.292	0.275
S10	0.345	0.096	0.179	0.434
S11	0.396	0.108	0.120	0.380
S12	0.394	0.097	0.119	0.389
S13	0.421	0.206	0.284	0.261
S14	0.518	0.216	0.324	0.271
S15	0.337	0.192	0.170	0.348

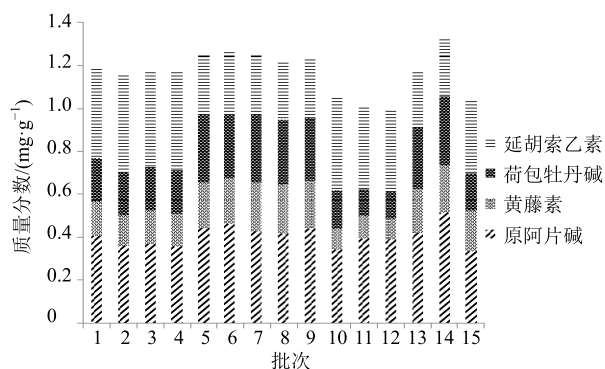


图 6 15 批夏天无药材指标成分累积加和图

Fig. 6 Sum graph of contents of 15 batches of *Corydalis Decumbentis Rhizoma*

醇、50%甲醇和 70%乙醇各 50 mL,称定质量,浸泡 30 min,超声处理 60 min,放至室温,再用 90%甲醇、70%甲醇、50%甲醇和 70%乙醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,所得 4 份供试品溶液用 HPLC 进行测定,结果显示 70%甲醇对夏天无药材中各成分的提取效果最好,故选择 70%甲醇作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择

本实验使用 DAD 检测器分别对夏天无对照品及供试品溶液进行 200~400 nm 全波长扫描,结果夏天无生物碱类成分在 280 nm 处有较大吸收,样品色谱图在 280 nm 处峰个数较多,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,故选择 280 nm 作为测定波长。

3.3 流动相的选择

本实验综合考虑基线、峰个数、各色谱峰分离度的影响,最终确定流动相为乙腈-0.2%冰醋酸溶液(三乙胺调 pH 6.0)。夏天无生物碱类成分对流动相 pH 值的要求较高,因此应注意流动相 pH 值的稳定性。

本实验建立了夏天无药材 HPLC 指纹图谱的质量评价方法,通过相似度评价系统、聚类分析和主成分分析建立夏天无药材对照指纹图谱共有模式。采用 HPLC 法测定夏天无药材中原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱及延胡索乙素 4 个成分含量的方法,方法简便、准确,重复性好。对 15 批夏天无药材 4 个指标成分进行了含量测定,结果表明各批次样品间原阿片碱、黄藤素、荷包牡丹碱及延胡索乙素含量无显著差异。本研究建立的夏天无药材指纹图谱结合多指标成分测定的方法可为夏天无药材的质量评价提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张铁军, 许 浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [3] 邓 敏, 宋秀媛, 王家富. 普洛托品的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 275-277.
- [4] Li Y, Wang S, Liu Y, *et al.* Effect of alpha-allocryptopine on transient outward potassium current in rabbit ventricular myocytes [J]. *Cardiology*, 2008, 111(4): 229-236.
- [5] 郑洪艳. 原小檗碱类生物碱作用差异的机理研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2004.
- [6] 王 新, 薛 晖, 岳 媛, 等. 高表达 $\beta 1$ 肾上腺素受体细胞膜色谱法靶向筛选夏天无中活性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 65-68.
- [7] 张金生, 徐任生, 陈仲良, 等. 夏天无化学成分的研究—白毛茛碱宁等的分离和结构 [J]. 中草药, 1987, 18(1): 8.
- [8] 廖 静, 梁文藻, 涂国士. 夏天无中十一个叔胺生物碱的分离和鉴定 [J]. 中国药学英文版, 1995, 4(2): 57-61.
- [9] Wang Q, Li Z F, Yang Z H, *et al.* New alkaloids with anti-inflammatory activities from *Corydalis decumbens* [J]. *Phyto Chem Lett*, 2016, 18: 83-86.
- [10] 杨鑫宝, 刘扬子, 杨秀伟, 等. 磐安延胡索的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2200-2207.
- [11] Ki H K, Lee I K, Cheng J P, *et al.* Benzyloquinoline alkaloids from the tubers of *Corydalis ternate* and their cytotoxicity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 20(15): 4487-4490.
- [12] 马宏达, 郭 涛, 颜 鸣, 等. HPLC 法测定夏天无中原阿片碱延胡索乙素和巴马亭 [J]. 解放军药学报, 2009, 25(3): 208-211.