

一测多评法同时测定斑花黄堇药材中4种生物碱成分

杜清¹, 陈志^{2*}, 吴江³, 刘明地³, 郭苏城⁴, 候永强³

1. 青海民族大学药学院 青海省青藏高原植物资源化学研究重点实验室 青海省药物分析学重点实验室, 青海 西宁 810007
2. 青海师范大学 青藏高原药用动植物资源重点实验室, 青海 西宁 810007
3. 青海民族大学化学与化工学院, 青海 西宁 810007
4. 青海民族大学生态环境与资源学院, 青海 西宁 810007

摘要: 目的 建立一测多评法同时测定斑花黄堇 *Corydalis conspersa* 中盐酸小檗碱、比枯枯灵、原阿片碱、黄连碱4种生物碱成分的含量。方法 采用酸提碱沉法, 二氯甲烷萃取斑花黄堇中的生物碱成分, 以盐酸小檗碱、比枯枯灵、原阿片碱、黄连碱4种生物碱为指标成分, 结合一测多评法建立各成分与盐酸小檗碱的相对校正因子, 计算各成分的相对保留时间, 实现一测多评; 同时测定4种生物碱成分的量。色谱柱为 B18120405.25 摇光 Waters C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%的醋酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~5 min, 25%A; 6~10 min, 25%~30%A; 11~15 min, 30%~35%A; 16~25 min, 35%~25%A。检测波长为245 nm, 体积流量1.0 mL/min, 柱温30 °C, 理论塔板数以盐酸小檗碱计算不低于4000。结果 斑花黄堇药材各组织中盐酸小檗碱、原阿片碱、黄连碱的含量较高, 不同采集地区根部4种生物碱的含量比茎、叶、花中高。结论 建立的一测多评法含量测定的方法方便可行, 可作为斑花黄堇药材中盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱、比枯枯灵质量检测的方法。

关键词: 一测多评; 斑花黄堇; 盐酸小檗碱; 黄连碱; 原阿片碱; 比枯枯灵; 高效液相色谱; 相对校正因子

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-6038-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.027

Simultaneous determination of four alkaloids in different original *Corydalis conspersa* by QAMS

DU Qing¹, CHEN Zhi², WU Jiang³, LIU Ming-di³, GUO Su-cheng⁴, HOU Yong-qiang³

1. College of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Key Laboratory of Plant Resources of Qinghai-Tibet Plateau in Chemical Research and drug analysis, Xining 810007, China
2. Key Laboratory of medicinal animal and plant resources, Qinghai Normal University, Xining 810007, China
3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China
4. College of ecological environment and resource, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China

Abstract: Objective To establish a QAMS method for the simultaneous determination of four alkaloids in *Corydalis conspersa*. **Method** The alkaloids from *C. conspersa* were collected by acid and alkali precipitation extracted through dichloromethane. Berberine hydrochloride, bicuculline, protopine, coptisine as reference substances combined with HPLC method were used to calculate the relative correction factors and relative retention time of each component compared to berberine hydrochloride, achieving the review of QAMS; Regression equation method was used to determine the quantity of four alkaloids. B18120405.25C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); acetonitrile-0.2% acetic acid aqueous solution, gradient elution (pH 4.8), detection wavelength 245nm, flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 30 °C, calculating theoretical plate number of berberine hydrochloride should be more than 4000. **Results** The contents of

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 青海省科技厅项目(2016-ZJ-903); 青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室(2020-ZJ-Y40); 青海省青藏高原植物化学重点实验室(2020-ZJ-Y20); 民族药资源化学国家民族事务委员会-教育部重点实验室(云南民族大学, MZY2101)

作者简介: 杜清, 女, 博士, 中级制药工程师, 从事中药学教学与植物分子质量控制和肿瘤疾病的研究。

Tel: 18909717612 E-mail: duqing2001@sina.com

*通信作者: 陈志(1963—), 教授, 青海师范大学生命与地理科学学院。E-mail: czi58@163.com

berberine hydrochloride, protopine and coptisine in different tissues of *C. conspersa* were higher. The contents of four alkaloids in roots were higher than those in stems, leaves and flowers. **Conclusions** The HPLC-QAMS method is convenient and feasible, so it can be used for the quality control of berberine hydrochloride, coptisine, protopine and bicuculline in *C. conspersa*.

Key words: quantitative analysis on multi-components by single marker; *Corydalis conspersa* Maxim. Fl. Tang.; berberine hydrochloride; coptisine; protopine; bicuculline; high performance liquid chromatography; relative correction factor

罂粟科 (Papaveraceae) 荷包牡丹亚科 (Fumarioideae) 紫堇属 *Corydalis* L. 的植物全世界有 428 种, 中国有 298 种, 其中斑花黄堇 *Corydalis conspersa* Maxim. Fl. Tang. 为紫堇属多年生草本植物^[1], 青藏高原和西藏地区有 210 多种^[2-3], 藏医作为“当日丝哇”使用^[4]。紫堇属的植物含有多种生物碱成分, 主要包括异喹啉类、有机胺类、异吲哚类、原阿片碱类、原小檗碱类、苯酞异喹啉类、螺苜异喹啉类、苜基异喹啉类、阿朴菲类、枯拉灵类、苯菲啶类及其他类别的异喹啉类生物碱^[5]。研究表明斑花黄堇中含有黄连碱、巴马亭、原阿片碱、血根碱、比枯枯灵、紫堇碱、四氢非洲防己胺 7 种生物碱成分^[6-7]。

根据已有研究报道^[8], 《中国药典》2020 年版中对于药材中生物碱的检测情况及斑花黄堇

药材质量标准制定的要求, 本研究采用一测多评法首次测定斑花黄堇各个部位中盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱、比枯枯灵 4 种生物碱的含量, 为斑花黄堇药材的质量控制提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 斑花黄堇药材的采集及处理 药材于 2017 年 8 月采于青海省黄南州河南县吉岗山、青海省海北藏族自治州祁连县祁连山、青海省玉树藏族自治州囊谦县香龙峡谷山、青海省海南州贵德县拉脊山, 经青海民族大学林鹏程教授鉴定为斑花黄堇 *C. conspersa* Maxim. Fl. Tang., 样品信息见表 1。将新鲜植物清洗干净后, 分成根、茎、叶、花不同部位, 阴干, 粉碎后过 60 目筛备用。

表 1 斑花黄堇样品信息

Table 1 Sample information from *C. conspersa*

编号	采集地区	部位	采集时间
BHHJ-JGS-R	青海省黄南州河南县吉岗山	根	2017-08
BHHJ-JGS-S	青海省黄南州河南县吉岗山	茎	2017-08
BHHJ-JGS-F	青海省黄南州河南县吉岗山	花	2017-08
BHHJ-QL-R	青海省海北藏族自治州祁连县祁连山	根	2017-08
BHHJ-QL-S	青海省海北藏族自治州祁连县祁连山	茎	2017-08
BHHJ-NQ-R	青海省玉树藏族自治州囊谦县香龙峡谷山	根	2017-08
BHHJ-NQ-S	青海省玉树藏族自治州囊谦县香龙峡谷山	茎	2017-08
BHHJ-NQ-L	青海省玉树藏族自治州囊谦县香龙峡谷山	叶	2017-08
BHHJ-LJS-R	青海省海南州贵德县拉脊山	根	2017-08
BHHJ-LJS-S	青海省海南州贵德县拉脊山	茎	2017-08
BHHJ-LJS-L	青海省海南州贵德县拉脊山	叶	2017-08

1.1.2 对照品及试剂 对照品盐酸小檗碱购于北京北纳创联生物技术研究院 (批号 633-65-8), 质量分数大于 98%; 黄连碱购于上海宝曼生物有限公司 (批号 170316YX-1); 原阿片碱 (批号 161223WTA)、比枯枯灵 (批号 161009HXY) 购于上海宝曼生物有限公司, 质量分数大于 98%; 乙腈 (Fisher Chemical, HPLC 级, LOT166579)。浓盐酸 (天津市博迪化工有限公司)、氢氧化钠、无水乙醇、95%乙醇 (国药集团化学试剂有限公司), 甲醇 (西陇化工股份有限公司), 二氯甲烷 (天津富宇化学试剂公司), 水 (杭州娃哈哈有限

公司), 以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters Alliance 高效液相色谱系统: 配有 2695 溶剂管理系统、2996 二极管阵列检测器和 Empower 色谱工作站, 仪器型号分别是 Waters2695 和岛津 LC-20AT, UV-2450 紫外-可见分光光度计 (岛津公司), AYALA 旋转蒸发仪 N-1100 (上海爱朗仪器有限公司), 实验室专用超纯水机 (沃特普公司), SB5200 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 微量移液器 (ORAGON LAB), BSA1245 型电子天平 (德国赛

多利斯公司)。

色谱柱均为 C₁₈ 柱, 分别摇光 B18120405.25 (江苏汉邦科技有限公司)、Phenomenex (飞诺美公司) 和 6L Sciences (日本 GL Sciences), 无菌注射器 (江苏常州医疗器械总厂), 微孔滤膜 (天津市津腾实验设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 提取条件的选择

生物碱成分可应用酸提碱沉法^[9-10]提取分离, 斑花黄堇中总生物碱提取工艺^[11], 采用 0.5% 盐酸提取后用 5% 氢氧化钠碱沉, 调至不同 pH 值 (pH 8~9、10~11、11~12), 静置过夜后, 将各种碱性水溶液分别用二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇萃取 3 次后合并相同萃取溶剂的萃取液, 旋转蒸干有机溶剂后用 95% 乙醇溶解移液至量瓶, 定容至 10.0 mL 后, 用紫外分光光度计在波长 200~550 nm 处扫描紫外吸收情况, 每份溶液平行测定 3 次。斑花黄堇药材中的生物碱成分极性较低, pH 9~12 二氯甲烷萃取相 95% 乙醇溶液在波长 200~350 nm 及 430 nm 左右都有多个吸收峰, 且强度和吸光度均较强, 尤其 pH 11~12 各个峰的吸收峰最大; 而各种 pH 条件下醋酸乙酯、正丁醇萃取相的 95% 乙醇溶液在波长 200~350 nm 未见强的吸收峰, 尤其 430 nm 左右均未见吸收峰 (盐酸小檗碱 95% 乙醇溶液的吸收峰之一), 故选择二氯甲烷萃取碱沉溶液 (pH 11~12) 提取斑花黄堇总生物碱^[11]。

2.2 色谱条件

色谱柱: B18120405.25 摇光 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 的醋酸水溶液, 梯度洗脱, 0~5 min, 25% 乙腈; 6~10 min, 25%~30% 乙腈; 11~15 min, 30%~35% 乙腈; 16~25 min, 35%~25% 乙腈。体积流量 1.0 mL/min; 检测

波长为 245 nm; 柱温 30 °C; 进样量 50 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 单一对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵对照品各适量至容量瓶中, 95% 乙醇溶解, 配制成含盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵 0.216、0.024、0.190、0.060 mg/mL 的单一对照品溶液, 以上溶液超声 10 min, 摇匀, 定容, 静置备用。

2.3.2 混合对照品溶液 分别用移液枪精密吸取盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵的单一对照品 95% 乙醇溶液各 0.5 mL, 加入至 2.0 mL 量瓶混匀, 密封, 静置备用, 此时混合对照品溶液中盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵的质量浓度分别为 0.054、0.006、0.0475、0.015 mg/mL。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取斑花黄堇药材粉末 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.5% 盐酸溶液 20 mL, 密塞, 超声 10 min, 静置过夜, 抽滤酸提取溶液后用 5% NaOH 沉淀, 用酸度计调 pH 值至 11~12, 超声 10 min 后静置过夜, 用二氯甲烷每次 30 mL, 萃取 3 次后的萃取液放置于 250 mL 三角锥形瓶中, 旋干有机溶剂, 用 95% 乙醇溶液溶解, 超声 5 min, 摇匀并定容至 2.0 mL 量瓶, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 密封。

2.4 方法学考察^[12-13]

2.4.1 专属性试验 应用“2.2”项色谱条件下进样, 混合对照品溶液和斑花黄堇药材供试品溶液中的盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵 4 个生物碱峰和峰之间的分离度均>1.5, 理论塔板数按盐酸小檗碱峰计算不低于 4000, 混合对照品及供试品的色谱图见图 1。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.3.2”项中混合对照品溶液各 50、35、25、15、10、1 μL 进样分析,

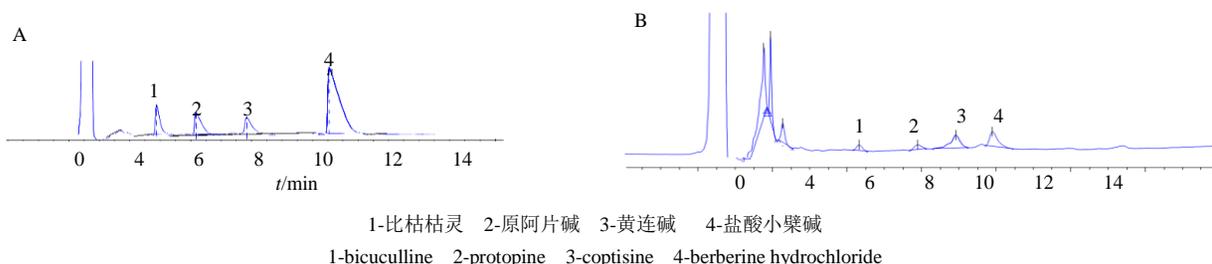


图 1 混合对照品 (A) 和斑花黄堇样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *C. conspersa* (B)

每个质量浓度进样3次,取平均值。分别以对照品质量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行回归计算,得各对照品的标准曲线回归方程

及线性范围,同系列混合对照品按照制备方法逐级稀释,分别以信噪比3和10考察检测限和定量限,结果见表2。

表2 4种生物碱对照品的线性关系和线性范围

Table 2 Linear correlation and ranges of four alkaloids reference substances

对照品	回归方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	r	检测限/ng	定量限/ng
盐酸小檗碱	$Y=1.48 \times 10^6 X+7.75 \times 10^4$	0.054~27.000	0.992 0	0.000 8	0.002 3
黄连碱	$Y=2.0 \times 10^6 X+8.17 \times 10^3$	0.006~3.000	0.993 1	0.007 2	0.021 8
原阿片碱	$Y=2.1 \times 10^5 X+1.96 \times 10^4$	0.0475~23.750	0.996 5	0.015 7	0.047 6
比枯枯灵	$Y=579\ 409 X+28\ 047$	0.015~7.500	0.995 9	0.005 5	0.016 5

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一供试品(批号BHHJ-JGS-R)溶液50 μL连续进样6次,记录盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵的保留时间和峰面积,结果表明,各色谱峰相对保留时间的RSD分别为0.31%、0.53%、1.23%、0.26%;峰面积的RSD分别为1.29%、3.63%、3.73%、1.45%。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品(批号BHHJ-JGS-R)溶液50 μL,分别于配制后的0、4、12、24 h测定其中盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵的保留时间和峰面积,得保留时间的RSD分别为0.93%、1.13%、1.12%、0.15%;峰面积的RSD分别为1.52%、1.97%、1.84%、2.72%。

2.4.5 重复性试验 称取斑花黄堇药材根(批号BHHJ-JGS-R)粉末共6份0.1 g,精密称定,按“2.3.3”项下制备样品,测定样品中盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵的质量分数分别为969.64、773.83、432.59、500.64 μg/g, RSD分别为3.64%、1.71%、2.80%、2.83%。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取适量已测定的斑花黄堇粉末9份,按“2.3.3”项下分别制备供试品溶液后定容至6.0 mL,取供试品溶液0.3 mL,分别精密加入“2.3.2”项下低、中、高3个剂量的混合对照品各0.4、0.5、0.6 mL,每个剂量平行3份,制备样品后混匀,按照色谱条件测定,计算盐酸小檗碱、黄连碱、原阿片碱和比枯枯灵的加样回收率分别为98.83%、102.03%、100.52%、100.47%, RSD分别为1.31%、1.46%、0.45%、1.52%。

2.5 相对校正因子($f_{s/i}$)^[13-14]的计算

采用多点校正法,精密吸取混合对照品溶液各30、35、40、45、50 μL,按照“2.2”项色谱条件进样,记录色谱图,每个质量浓度进样3次,取平均值计算。以盐酸小檗碱(s)为内参物,根据 $f_{s/i}$

的计算公式 $[f_{s/i}=f_s/f_i=(A_s/C_s)/(A_i/C_i)]$ 计算比枯枯灵、黄连碱、原阿片碱与内参物盐酸小檗碱间的 $f_{s/i}$,结果3个待测成分与内参物的 $f_{s/i}$ 的RSD值均小于5%,见表3。

表3 不同进样体积对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 3 Influence on relative correction factor from different injection volume

进样体积/μL	$f_{\text{盐酸小檗碱/比枯枯灵}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/原阿片碱}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/黄连碱}}$
30	1.591 3	4.614 5	0.760 7
35	1.670 5	4.701 8	0.738 1
40	1.676 9	4.718 5	0.703 6
45	1.685 4	4.775 1	0.685 7
50	1.721 9	4.840 5	0.681 0
平均值	1.669 2	4.730 1	0.713 8
RSD/%	2.87	1.79	4.84

2.6 $f_{s/i}$ 耐用性考察

2.6.1 不同柱温考察 采用Waters 2695高效液相色谱仪和摇光C₁₈色谱柱,考察不同柱温(25、30、35 °C)对斑花黄堇中生物碱成分 $f_{s/i}$ 的影响,结果各种成分与内参物的 $f_{s/i}$ 重现性良好(RSD<5%),见表4。

表4 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 4 Influence on relative correction factor from different column temperature

柱温/°C	$f_{\text{盐酸小檗碱/比枯枯灵}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/原阿片碱}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/黄连碱}}$
25	1.675 8	5.131 6	0.716 1
30	1.671 1	5.275 6	0.712 0
35	1.559 2	5.097 4	0.715 0
平均值	1.635 4	5.168 2	0.714 4
RSD/%	4.04	1.83	0.30

2.6.2 不同体积流量考察 采用Waters 2695高效液相色谱仪和摇光C₁₈色谱柱,考察不同体积流量(0.8、1.0、1.2 mL/min)对斑花黄堇中生物碱成分 $f_{s/i}$ 的影响,结果各种成分与内参物的 $f_{s/i}$ 重现性良好(RSD<5%),见表5。

表5 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 5 Influence on relative correction factor from different volume

体积流量/(mL·min ⁻¹)	$f_{\text{盐酸小檗碱/比枯枯灵}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/原阿片碱}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/黄连碱}}$
0.8	1.673 3	5.516 9	0.727 2
1.0	1.689 4	5.757 4	0.763 5
1.2	1.673 3	5.606 1	0.722 5
平均值	1.678 7	5.626 8	0.737 7
RSD/%	0.55	2.16	3.04

2.6.3 不同仪器和色谱柱的考察 分别考察了 Waters 2695 和岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪及瑶光 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 6L Sciences (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响, 检测波长为 245 nm, 并计算 RSD, 结果 RSD 均小于 5%, 表明 $f_{s/i}$ 在不同的仪器和色谱柱的适用性良好, 结果见表 6。

表6 不同仪器和色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响

Table 6 Influence on relative correction factor from different instruments and columns

不同仪器	色谱柱	$f_{\text{盐酸小檗碱/比枯枯灵}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/原阿片碱}}$	$f_{\text{盐酸小檗碱/黄连碱}}$
Waters 2695	瑶光 C ₁₈	1.596 0	5.437 5	0.735 1
	Phenomenex	1.608 4	5.479 8	0.742 6
	6L Sciences	1.589 5	5.415 6	0.733 9
岛津 LC-20AT	瑶光 C ₁₈	1.595 9	5.437 5	0.735 1
	Phenomenex	1.608 4	5.479 7	0.742 7
	6L Sciences	1.582 7	5.415 5	0.734 7
平均值		1.597 0	5.445 6	0.737 8
RSD/%		0.64	0.54	0.56

通过斑花黄堇中各种生物碱对于盐酸小檗碱的 $f_{s/i}$ 的测定和耐用性进行评价, 结果表明, 不同进样体积、不同柱温、不同体积流量、不同仪器和色谱柱对 $f_{s/i}$ 均无明显影响。

2.7 待测组分色谱峰定位

根据“2.5”项中得到的保留时间计算待测成分 (i) 与盐酸小檗碱 (内参 s) 的相对保留值 ($r_{i/s}=t_{Ri}/t_{Rs}$), 对待测组分进行定位, 并计算 RSD,

表8 斑花黄堇药材中 4 种生物碱的含量测定结果 ($n=3$)

Table 8 Determination results of four alkaloids from drugs of *C. conspersa* ($n=3$)

样品	盐酸小檗碱/(μg·g ⁻¹)	原阿片碱/(μg·g ⁻¹)		黄连碱/(μg·g ⁻¹)		比枯枯灵/(μg·g ⁻¹)	
		一测多评法	标准曲线法	一测多评法	标准曲线法	一测多评法	标准曲线法
BHHJ-JGS-R	669.43	800.88	795.52	65.46	67.99	76.79	77.92
BHHJ-QL-R	325.59	345.26	328.95	284.63	274.34	142.08	138.33
BHHJ-NQ-R	837.12	433.59	432.59	700.97	695.66	312.05	310.30
BHHJ-LJS-R	656.09	3 201.24	3 186.55	554.64	552.97	660.21	655.68
BHHJ-JGS-S	44.58	402.61	394.40	13.31	14.28	31.28	31.90
BHHJ-QL-S	97.33	140.49	135.30	33.81	35.57	18.24	17.70
BHHJ-NQ-S	495.79	585.41	592.17	152.95	154.53	399.61	391.07
BHHJ-LJS-S	20.75	390.38	389.73	28.17	27.97	342.68	332.20
BHHJ-NQ-L	130.85	352.03	348.63	125.92	123.24	103.28	100.46
BHHJ-LJS-L	83.99	556.09	546.62	79.15	77.49	240.88	235.06
BHHJ-JGS-F	6.21	3.10	3.01	1.03	1.05	4.82	6.16

结果各待测成分相对保留值的 RSD 均小于 5%, 表明采用的研究体系能有效且稳定检测待测成分。结果见表 7。

表7 不同条件下对 $r_{i/s}$ 的影响

Table 7 Influence of different injection volume, column temperature, volumn, instruments and columns on $r_{i/s}$

不同条件	$r_{\text{比枯枯灵/盐酸小檗碱}}$	$r_{\text{原阿片碱/盐酸小檗碱}}$	$r_{\text{黄连碱/盐酸小檗碱}}$	
进样体积/μL	30	0.461 4	0.579 0	0.737 9
	35	0.462 3	0.579 9	0.737 6
	40	0.462 4	0.584 6	0.742 6
	45	0.463 2	0.585 4	0.742 7
	50	0.468 5	0.590 9	0.752 6
柱温/℃	25	0.464 4	0.591 9	0.751 1
	30	0.464 9	0.591 5	0.751 0
	35	0.462 1	0.584 4	0.740 4
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.8	0.445 2	0.561 6	0.730 0
	1.0	0.444 7	0.561 7	0.717 8
	1.2	0.445 6	0.562 5	0.722 5
Waters 2695	瑶光 C ₁₈ 柱	0.445 3	0.562 5	0.732 1
	Phenomenex	0.446 1	0.563 5	0.717 9
	6L Sciences	0.448 2	0.566 2	0.721 3
	岛津 LC-20AT	瑶光 C ₁₈ 柱	0.469 0	0.577 8
岛津 LC-20AT	Phenomenex	0.463 0	0.601 4	0.766 3
	6L Sciences	0.439 0	0.585 2	0.744 8
	平均值	0.451 4	0.573 8	0.734 8
RSD/%	2.31	2.47	2.33	

2.8 药材中 4 种生物碱的含量测定

将不同采集地区的药材, 采用“2.3.3”项下方法制备样品并精密吸取溶液 50 μL 自动进样器进样, 每个样品重复测定 3 次, 取平均值。分别采用一测多评法^[14], 以盐酸小檗碱对照品峰面积为对照, 同时通过标准曲线法计算各个采样地区样品中的比枯枯灵、黄连碱、原阿片碱的含量及 RSD 值, 结果见表 8, RSD 均<5.0%, 计算结果并无显著性差异, 说明一测多评法和标准曲线法均可行的。故应用一测多评法的结果绘制各个采样地区不同组织部位药材中 4 种生物碱的含量和积累含量情况图, 见图 2、3。

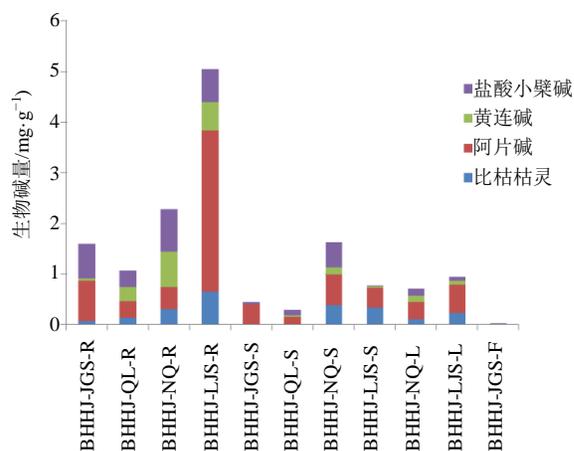


图2 不同来源斑花黄堇药材中生物碱的积累量

Fig. 2 Accumulated contents of alkaloids from different origin drug of *C. conspersa*

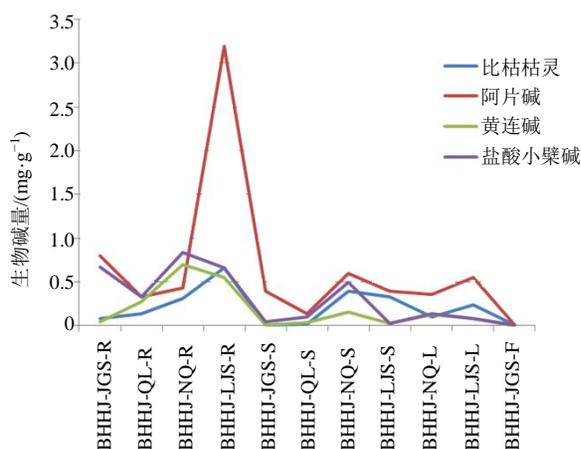


图3 不同来源斑花黄堇药材中4种生物碱总量

Fig. 3 Contents of four alkaloids from different origin drug of *C. conspersa*

从表8及图2、3可看出,斑花黄堇药材各个组织中原阿片碱、盐酸小檗碱的含量较高,不同组织部位各种生物碱的含量差别较大。不同采集地区根部4种生物碱的含量比茎、叶、花中高,因为生长年限和海拔高度、生态环境的不同,4种生物碱成分的含量:根部海南州、玉树州地区高于黄南州、海北州;茎部玉树州地区高于海南州、黄南州、海北州;4个采集地区叶、花部4种生物碱的积累含量相对于根、茎部均较少。4种生物碱中原阿片碱、盐酸小檗碱的含量在各个采集地区的根、茎、叶中含量较高,花中盐酸小檗碱的含量最高。该结果为今后药材质量标准的定量分析提供依据。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

结合实际研究色谱图,可看到的波长有210、

212、224、228、245、254、345、359、394 nm,对灵敏度、检测限和各个成分的分离度、最大吸光度情况进行考察,并结合已有的报道文献^[15-16],结果表明,检测波长为245 nm时,基线较稳定,4个生物碱成分的色谱分离度最好,且各个峰的吸光度最大,故以245 nm作为检测波长。

3.2 色谱柱的选择

反相色谱是分析生物碱的常用方法,色谱柱的固定相采用常规的C₁₈柱,高纯的硅胶基质,填料的粒径在5 μm,耐酸碱,且高密度键合和完全封尾的技术,选择pH值1.5~10.5宽范围以适应不同性质的生物碱,柱长为25 cm达到有效分离。

3.3 检测方法和流动相的选择

目前可常规应用紫外和HPLC的方法检测斑花黄堇药材中生物碱成分,本研究中对流动相的不同比例及不同pH值的醋酸水溶液进行梯度洗脱,结果,pH 4.8为最佳^[17-18],4种生物碱成分的分离度最好,且4个峰的保留时间均在11 min以内。由此说明此研究实验中有有机溶剂和酸水溶液配比的流动相能有效分离且节约时间有效检测出4种生物碱成分。

HPLC研究中应用酸提碱沉法精细分离出总生物碱,根据已有紫外分光光度法研究总生物碱的含量,可看出应用紫外吸收光谱检测的总生物碱的含量比单体生物碱成分的含量高的多,而同样单体生物碱成分用不同的取样量以及检测方法测定的含量也有不小的差别,会因为提取过程中的损失,也会因为检测的限度范围不同,尤其茎、叶花中各种生物碱的成分含量低。

致谢:青海师范大学陈克龙教授、马友贵教授、尚军教授、程子毓教授、熊雯豆、魏杰锋、李岭、焦璐等师生处理药材、准备仪器和实验条件;青海省药品检验检测院工作人员对于研究的支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 269.
- [2] 罗达尚, 冯赤华, 夏光成. 青藏高原藏药资源—紫堇属植物初探 [J]. 中草药, 1984, 15(6): 33-36.
- [3] 吴征镒. 西藏植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1985, 2: 267.
- [4] 淮虎银, 杨生妹. 紫堇属藏药的药用民族植物学研究 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(1): 8-11.

- [5] 李珂, 张得钧, 李占强, 等. 紫堇属植物生物碱及其生物活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(10): 748-757.
- [6] Fang Q C, Lin M, Weng Q M. Chemical study of alkaloids from *Corydalis conspersa* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(1): 25-27.
- [7] 确生, 陈卫东, 吴江, 等. 斑花黄堇化学成分的研究 [J]. 中成药, 2016, 38(11): 2405-2408.
- [8] 张宝喜, 彭福, 罗维早, 等. 不同产地黄连中 6 个生物碱含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(2): 128-133.
- [9] 栾庆祥, 赵杨, 周欣, 等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 859-865.
- [10] 确生, 王志波, 李成思, 等. 响应面法优化斑花黄堇中总生物碱的提取工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(3): 358-362.
- [11] 吴江, 杜清, 林鹏程, 等. 斑花黄堇药材中总生物碱的提取、定性鉴定和含量测定 [J]. 昆明医科大学报, 2018, 4(6):147-149.
- [12] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [13] 董惠敏, 许如玲, 何丹丹, 等. 一测多评法测定印度獐牙菜中 8 个 酮类成分的含量 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 241-247.
- [14] 罗祖良, 仇峰, 韦日伟, 等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [15] 黄云, 李文莉, 龙海燕, 等. HPLC 测定注射用夏天无总碱中比枯枯灵的含量 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(4): 34-36.
- [16] Chao R B, Zhang H, Zhuang Y L, et al. HPLC Determination of berberine type alkaloids in rhizoma of *coptidis chinensis* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2003, 23(5): 354-357.
- [17] Fang Q M, Zhang H, Li Z C. Determination of coptisine and epiberberine from diferent species of *Coptis chinensis* by RP-HPLC [J]. *West China J Pharm Sci*, 2003, 1: 16-19.
- [18] 陈东东, 毛坤军, 李祥, 等. HPLC 法比较延胡索炮制前后 7 个生物碱成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1591-1595.

[责任编辑 时圣明]