

元胡生物碱的化学研究

VI. 元胡叔胺生物碱的反相高效

液相色谱法测定

傅小勇* 梁文藻 涂国士

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

提要 用反相高效液相色谱法分离了元胡块茎中6个主要叔胺生物碱即(-)-四氢非洲防己胺(A), (±)-四氢巴马亭(B), (+)-紫堇碱(C), (-)-四氢小檗碱(D), 四氢黄连碱(E), (+)-海罂粟碱(F)。并用外标法测定了这些生物碱在元胡生药样品及醋制品中的含量。本法用 Nucleosil 10 C₁₈ 层析柱(2.6 mm × 25 cm), 甲醇-水(70:30)为流动相, 紫外λ280 nm检测, 流速 0.8 ml/min。方法简便、快速, 准确, 重现性好。

关键词 元胡(延胡索); 四氢原小檗碱型生物碱; 四氢非洲防己胺; 四氢巴马亭; 紫堇碱; 四氢小檗碱; 四氢黄连碱; 海罂粟碱; 反相高效液相色谱法。

元胡为荷包牡丹科(Fumariaceae)紫堇属延胡索(*Corydalis turtschaninovii* Bess. f. *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsu)的块茎, 是一常用镇痛中药, 已表明生物碱为该药的有效成分。元胡生物碱的定量测定方法已有不少报道, 前曾报道元胡中8个叔胺生物碱的薄层光密度法测定⁽¹⁾, 4个季铵生物碱的高效液相色谱法测定⁽²⁾。但对元胡叔胺生物碱以至四氢原小檗碱型生物碱的高效液相色谱测定法迄今报道甚少。本文采用反相高效液相色谱法分离测定了元胡中5个四氢原小檗碱型生物碱即(-)-四氢非洲防己胺(A) (tetrahydrocumbamine)、(±)-四氢巴马亭(B) (tetrahydropalmatine)、(+)-紫堇碱(C) (corydiline)、(-)-四氢小檗碱(D) (tetrahydroberberine)、四氢黄连碱(E) (tetrahydrocoptisine), 及1个阿朴啡型生物碱(+)-海罂粟碱(F) (glauicine)。用本法测定了元胡生药及炮制品中诸生物碱的含量。

实 验 部 分

一. 仪器和药品

仪器 Waters 6000A型高效液相色谱仪, Rheodyne 7125 进样阀, 岛津 SPD-1 可调波长紫外检测器, 岛津 C-R1B 色谱数据处理机, 上海医用激光仪器厂 10 μl 微量注射器, 不锈钢层析柱: 2.6 mm × 25 cm, 填充剂 Nucleosil 10 C₁₈ (Macherey-Nagel), 保护柱填充剂 YWG-C₁₈ (天津化学试剂二厂)。

溶剂 水(玻璃器皿重蒸馏), 其它试剂均为分析纯, 北京化工厂产品。

对照品 (-)-四氢非洲防己胺(A), (±)-四氢巴马亭(B), (+)-紫堇碱(C), (-)-四氢黄连碱(E), (+)-海罂粟碱(F) 均为自元胡中分离精制的纯品; 四氢小檗碱(D) 为 Lingt(英) 标准品。

本文于1985年9月16日收到。

* 本所八二级研究生

生药样品同前报⁽¹⁾。

炮制品及其对照品由浙江兰溪制药厂提供。

二. 实验条件的选择

(一) 仪器参数 因被测化合物均有紫外吸收, 最大吸收波长在 280 nm 左右, 因此选用 λ 280nm 紫外检测; 灵敏度: 0.04 AUFS, 流动相流速: 0.8 ml/min, 柱温: 室温, 纸速: 2.5 mm/min。

(二) 固定相和流动相的选择 经多种固定相比较, 选用 Nucleosil 10 C₁₈ 为固定相, 分离效果较好。曾比较多种流动相系统, 结果以甲醇—水(70:30) 较合适, 既能将所测化合物基本达到完全分离, 保留时间又不太长, 流速以 0.8 ml/min 较好。图 1 示上述条件测得 6 个对照品混合物的色谱分离图。各峰用对照品分别进样进行鉴定。其保留时间(t_R)、容量因子(K')、相邻峰的分度度(R_s) 见表 1。

Tab 1. HPLC data of authentic alkaloids

Alkaloid	t_R (min)	K'	R_s
A	6.87	3.29	1.58
B	8.93	4.58	1.77
C	11.76	6.35	1.44
D	14.29	7.93	1.83
E	18.39	10.49	1.35
F	22.80	13.25	

(三) 标准曲线的绘制 精密称取干燥至恒重的对照品 A 1.94 mg, B 2.20 mg, C 2.21 mg, D 1.90 mg, E 1.78 mg, F 2.12 mg 置 2 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解, 并稀释至刻度, 作为贮备液; 分别用 100 μ l 注射器精密吸取此液 100, 200, 300, 400, 500 μ l 置于 1 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度备用。用 10 μ l 微量注射器进以上各种不同浓度的混合对照品溶液 3 μ l, 微处理机计算峰面积值, 以峰面积为纵座标, 对照品 μ g 数为横座标作图(见图 2, 3)。结果表明: 生物碱 A, B, C, D 和 E 的标准曲线为通过原点的直线, 而生物碱 F 的

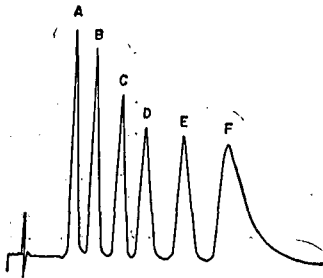


Fig 1. HPLC of authentic alkaloids A. (-)-Tetrahydrocolumbamine; B. (\pm)-Tetrahydropalmatine; C. (+)-corydaline; D. (-)-Tetrahydroberberine; E. (-)-Tetrahydrocoptisine; F. (+)-Glaucine. Column: 260 \times 2.6 mm, Nucleosil 10 C₁₈ with a YWG 10 C₁₈ guard column; Eluent: aq. 70% MeOH; Flow rate: 0.8 ml/min; Detector: UV 280 nm; Chart speed: 2.5 mm/min.

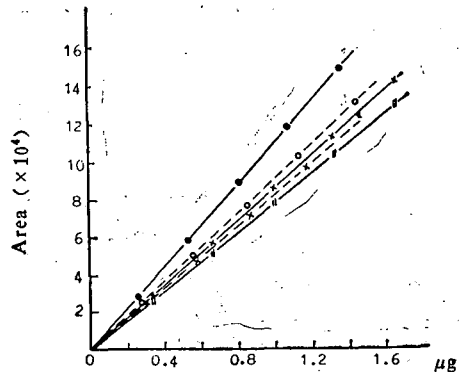


Fig 2. Standard curves of alkaloid A (x---x), B (x—x), C (||—||), D (o-----o) and E (•—•)

标准曲线则为不过原点的直线。

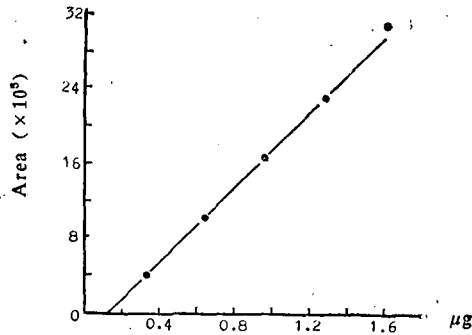


Fig 3. Standard curve of alkaloid F

(四) 精密度测定 按上述选定的条件, 用微量注射器进对照品混合溶液 $3 \mu\text{l}$, 重复进样 9 次, 测量每次进样各峰的面积值, 并计算标准偏差 SX 和变异系数 CV (见表 2)。结果表明, 生物碱 A~E 5 个四氢原小檗碱型生物碱在所选条件下峰面积重现性很好, CV 在 0.95~1.24% 之间; 而 F 由于拖尾较严重, 因此变异系数较大。

Tab 2. Precision of the method

Alkaloid	Area values	\bar{X}	SX	CV (%)
A	103283 103882 102876	103165	979.93	0.95
	103958 103824 104191			
	103252 101838 101380			
B	117401 115758 114910	115451	1422.5	1.23
	115545 115598 114488			
	117711 113260 114387			
C	106547 105906 104618	105044	1302.4	1.24
	105386 105075 104029			
	106981 102880 103978			
D	104942 104930 103445	104072	1016.1	0.98
	103935 104826 104135			
	104491 101710 104235			
E	122300 122338 120139	120710	1401.4	1.16
	121003 121525 119815			
	121174 117841 120252			
F	256158 236622 241923	245770	7485.3	3.05
	254367 249344 239485			
	236035 249184 248808			

三、样品测定

(一) 定量测定方法的选择 由于生物碱 A, B, C, D, E 的标准曲线为过原点的直线, 而 F 不过原点, 因此要同时测定样品中各生物碱的含量, 需采用外标二点法。配制 6 个生物碱的混合对照品溶液及生物碱 F 的对照品溶液 (二个不同浓度的 F 溶液), 制备 ID 表 (Mode 4)。每个对照品液进样 3 次, 处理机自动给出校正因子并贮存测出样品数据。不同日期测定时, 重新测定校正因子, 以消除层析条件波动而引起的误差。

(二) 生药样品的测定 各元胡样品的来源, 前处理方法及编号均同前报⁽¹⁾, 并按文中所述方法制备 6 个样品的甲醇溶液 5 ml, 样品液可直接进样测定。图 4 示三个不同栽培地区元胡样品的 HPLC 分离情况。

由上图可知, 样品中所含的高极性杂质几乎全在生物碱A之前流出, 不影响样品的测定。在A和B之间, 不同程度地出现另一小峰, 根据此类化合物结构和物性的关系及元胡中所含的生物碱, 此峰可能为紫堇球碱((+)-corybulbine)。

各样品溶液分别进样3次(3~5 μ l), 由数据处理机自动给出分析结果(见表3)。结果表明, 在东阳产样品1~4之间各生物碱的含量无显著性差别, 南京元胡(5号)中, 紫堇碱的含量为0.065%, 比昆山元胡(6号)中的要低2倍多, 而海罂粟碱的含量则南京元胡中最高。

(三) 醋蒸元胡及对照样品的测定 取醋制品和对照品研细, 过40目筛, 于60°C烘箱干燥至恒重, 分别取样各2份(每份约2g), 精密称定, 按下述方法制备样品溶液:

1. 水煎法 取醋制品和对照品各1份, 用80ml水煎煮两次(45, 30 min), 棉花过滤, 滤液加5ml氢氧化铵溶液碱化, 用氯仿(30 ml \times 1, 20 ml \times 6)萃取, 回收氯仿, 残渣用甲醇配成5ml样品溶液, 得样品液7(醋制品), 样品液8(对照品)。

2. 渗漉法 取余下的二份样品, 用40ml 60%乙醇浸泡24h, 再渗漉至醋元胡生物碱反应(Dragendorff试剂)不明显, 水浴挥干溶剂, 残渣用甲醇直接配成5ml样品溶液, 得样品液9(醋制品), 样品液10(对照品)。

样品7~10号均进样5 μ l, 测定结果见表3。

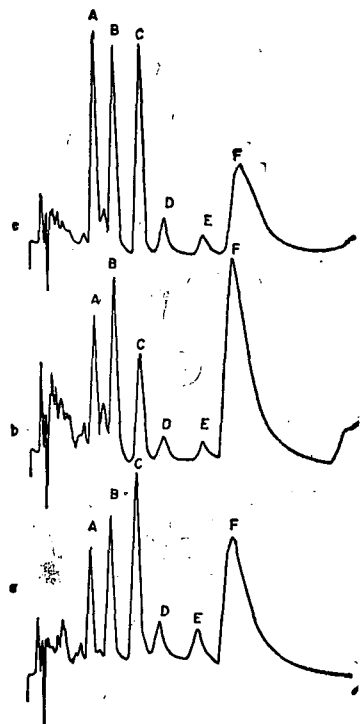


Fig 4. HPLC of *Corydalis* samples. a. Dongyang yuanhu; b. Nanjing yuanhu; c. Kunshan yuanhu

Tab 3. Contents of the alkaloids in *Corydalis* samples

Sample number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Content (%) [*]	A	HPLC	0.048	0.058	0.049	0.057	0.043	0.098	0.023	0.033	0.018	0.036
		TLC	0.037	0.038	0.045	0.052	/	0.095				
	B	HPLC	0.080	0.070	0.070	0.066	0.078	0.118	0.022	0.028	0.023	0.043
		TLC	0.078	0.071	0.067	0.065	0.065	0.116				
	C	HPLC	0.135	0.115	0.122	0.130	0.065	0.151	0.016	0.027	0.019	0.071
		TLC	0.129	0.111	0.121	0.114	0.042	0.134				
	D	HPLC	0.027	0.025	0.019	0.020	0.015	0.026	0.009	0.009	0.009	0.016
		TLC	0.014	0.011	0.010	0.011	/	0.019				
	E	HPLC	0.024	0.016	0.020	0.033	0.009	0.017	0.006	0.005	0.008	0.016
		TLC	0.022	0.014	0.019	0.030	/	0.012				
	F	HPLC	0.124	0.089	0.110	0.086	0.152	0.089	0.055	0.046	0.047	0.061
		TLC	0.116	0.086	0.103	0.076	0.122	0.084				

* Average of 2~3 measurements

讨 论

一. 四氢原小檗碱型生物碱是广泛存在于植物中的一类活性成分, 如四氢巴马亭等具有良好的镇痛、镇静作用, 被认为是一些中药(如元胡)的镇痛有效成分, 然而对此类化合物的HPLC分析方法很少见文献报道, 本文所述方法适用于此类成分的分离和分析。

二. 此类生物碱具有碱性弱的特点, 因此中性醇水系统作流动相即可将其达到较好的分离。它们在柱上的保留时间与结构有密切关系: 具亚甲二氧基的化合物极性小, 保留时间长, 且此基团数目越多, 保留时间越长, 如生物碱E比D的 t_R 长 4.1 min; 含羟基的酚性碱, 极性大, 保留时间短; 含 C_{13} -Me 的化合物(如C) 与相应的 C_{13} -H 的化合物(如B) 相比, 前者极性较小, 具较长的保留时间。

三. 共存于此中药中的普鲁托品类生物碱, 对流动相pH 值很敏感, 酸性条件下可使其转化成季铵类的原小檗碱型化合物, 极性加大。中性条件下, 常出现严重拖尾, 且保留时间长(在生物碱F后出现)。对此类化合物的分析将有待于进一步研究。

四. 本法灵敏、快速、简便、重现性好, 所用醇水流动相便宜易得。用此法分析了不同产地, 不同前处理方法的元胡样品, 所得分析结果与用 TLC 扫描法测得结果一致(见表3)。也分析了元胡炮制品中的各生物碱含量, 由于所取样品的代表性不足, 因此还不能说明元胡的炮制对生物碱的影响。这项工作有待进一步完成。

致谢 本所方典模同志热情指导本实验, 浙江兰溪制药厂提供醋蒸元胡及对照样品。

参 考 文 献

1. 傅小勇等. 元胡生物碱的化学研究 III. 元胡叔胺生物碱的薄层光密度法测定. 药物分析杂志 1985; 5: 194.
2. 傅小勇等. 元胡生物碱的化学研究 V. 元胡季铵生物碱的高效液相色谱法测定 待发表.

CHEMICAL STUDIES ON THE ALKALOIDS FROM YUANHU (*CORYDALIS TURTSCHANINOVII* BESS. F. *YANHUSUO* Y. H. CHOU ET C.C. HSU)

VI. SEPARATION AND DETERMINATION OF 6 TERTIARY ALKALOIDS IN YUANHU BY RP-HPLC

FU Xiao-Yong, LIANG Wen-Zao and TU Guo-Shi

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

ABSTRACT Six main tertiary alkaloids, (-)-tetrahydrocolumbamine(A), (\pm)-tetrahydropalmatine (B), (+)-corydaline (C), (-)-tetrahydroberberine (D), tetrahydrocoptisine(E) and (+)-glaucine (F) were separated by HPLC within 25 min on a column (25 cm \times 2.6 mm) of Nucleosil 10 C_{18} equipped with a YWG- C_{18} guard column; elution was effected at 0.8 ml/min with an isocratic mobile phase of 70% MeOH, and the elute was monitored at 280 nm.

External standards were used for the determination. The calibration curves for the first five alkaloids are rectilinear in the range of 0~1.7 μ g with CV of 0.95~1.24%. In contrast, the calibration curve for the 6th alkaloid is linear in the range of 0.3~1.6 μ g with CV up to 3.05%, which does not pass through the origin.

The individual alkaloids in 6 Yuanhu samples, cultivated in different localities and processed with different methods were determined. The alkaloid contents of the samples with vinegar steamed as well as the control samples extracted by boiling water, and percolated with 60% EtOH were also presented. The results of the proposed HPLC method are in good agreement with those of the TLC-densitometry.

Key words Yuanhu (*Corydalis turtschaninovii* Bess. f. *yanhusuo* Y.H.Chou et C. C. Hsu); Tetrahydroprotoberberine type alkaloids; (-)-Tetrahydrocolumbamine; (\pm)-Tetrahydropalmatine; (+)-Corydaline; (-)-Tetrahydroberberine; Tetrahydrocoptisine; (+)-Glaucine; Reversed-phase high performance liquid chromatography