

苦地丁中六种异喹啉生物碱的薄层分离 和光密度法测定

何 丽 一 张 亚 斌

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 在碱性硅胶 G 薄层上用己烷—氯仿—甲醇(8:2:0.25 及 4:5:1)两种溶剂系统, 分别展开分离了苦地丁中六种异喹啉生物碱——普洛托品(I)、右旋异紫堇灵(II)、右旋紫堇灵(III)、四氢黄连碱(IV)、乙酰紫堇灵(V)及苦地丁 5 号(VI)。用改良 Dragendorff 试剂显色后, 薄层光密度法测定。各生物碱的线性范围为 0.5~3.0 μg , 平均变异系数为 1.76%, 显色后 24 小时内稳定。用本法可测定苦地丁及紫堇属多种植物、苦地丁总碱及片剂中异喹啉生物碱的含量。

关键词 苦地丁; 异喹啉生物碱; 普洛托品; 右旋紫堇灵; 右旋异紫堇灵; 四氢黄连碱; 乙酰紫堇灵; 苦地丁 5 号; 薄层光密度法

苦地丁为罂粟科(Papaveraceae)植物紫堇(*Corydalis bungeana* Turcz)的带根全草, 具清热解毒、活血消肿作用, 可治疗多种炎症。文献报道从苦地丁中曾分到七个异喹啉生物碱⁽¹⁾。这些成分的定性定量方法未见报道。本文应用碱性硅胶 G 薄层分离了普洛托品(protoptine, I)、右旋异紫堇灵(d-isocorynoline, II)、右旋紫堇灵(d-corynoline, III)、四氢黄连碱(tetrahydrocoptisine, IV)、乙酰紫堇灵(acetylcorynoline, V)及苦地丁 5 号(tetrahydrocorysamine, VI), 显色后用薄层光密度法测定含量。本文对影响薄层分离的因素、含量测定条件的选择、色点的稳定性、方法的精密性、标准品的线性范围及样品的提取方法等进行了研究。本法不仅适用于紫堇属植物的分析, 并可用于总碱中各生物碱的含量分析, 以建立合理的工艺方法和控制片剂的质量。

实 验 部 分

(一) 试剂、药品与仪器

苦地丁生物碱 I, II, III, IV, V 及 VI 本所方起程副研究员提供。植物样品苦地丁(*Corydalis bungeana* Turcz), 山东省售商品, 本所方起程副研究员提供。草黄堇(*C. stricta* Steph.)青海; 广佈紫堇(*C. conspersa* Maxim.)青海; 线叶紫堇即条裂紫堇(*C. linearoides* Maxim.)青海; 热贡即短尖紫堇(*C. mucronifera* Maxim.)青海; 紫堇即暗绿紫堇(*C. melanoschlora* Maxim.)青海。以上样品鉴定人吴征镒, 由本所林茂同志提供。尼泊尔紫堇(*C. henadersonii* Hend.)西藏, 鉴定人肖培根, 由本所林茂同志提供。

改良 Dragendorff 试剂, 岛津 CS-910 型双波长薄层扫描仪, 岛津 C-E1B 型数据处理机, 微量定量毛细管(Drummond 厂, USA)。

(二) 薄层层析条件

1. 薄层的制备 硅胶 G(10~40 μm 青岛海洋化工厂)10 g 加 0.4% 氢氧化钠溶液 36 ml

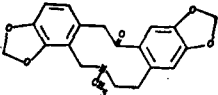
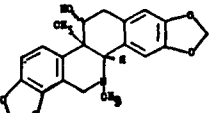
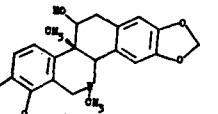
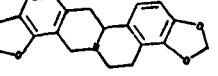
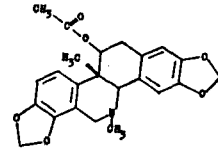
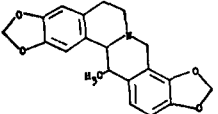
本文于 1984 年 7 月 30 日收到

本文于 1983 年全国第四次色谱学术会议上宣读

调浆, 用自制涂铺器铺板(15×15 cm)6~7 块, 室温放置过夜。

2. 展开剂、展开条件及展开方式 A. 己烷-氯仿-甲醇(8:2:0.25); B. 己烷-氯仿-甲醇(4:5:1)。A 和 B 均需饱和 45 分钟, 上行展开 13.5 cm。结果见表 1。

Tab 1. TLC separation of six isoquinoline alkaloids

Alkaloid	Structure	Rf values		Spot colour	
		A	B	Iodine vapour UV365 nm	Modified Dragendorff's reagent
Protopine		0.00	0.58	Dark	Orange
d-Isocorynoline		0.13	0.93	Green	Orange
d-Corynoline		0.28	0.92	Green	Orange
Tetrahydro-coptisine		0.46	0.92	Bright yellow	Orange
Acetylcorynoline		0.65	0.97	Yellow	Orange
Tetrahydro-Corysamine		0.79	0.97	Bright yellow	Orange

普洛托品极性最大, 必须用极性大的展开剂 B 展开; 展开前 A, B 系统均需饱和 45 分钟以克服边缘效应和缩短展开时间, 并可将某些样品中一个极性较大的蓝色荧光点与紫堇灵分开。

(三) 含量测定

1. 测定条件的选择

考察了六种异喹啉生物碱对三种不同光源的响应, 从而选择了一种最好的测定条件, 见表 2。

普洛托品无荧光, 其它成分的激发光波长亦不一致, 虽然荧光法灵敏度高, 但测试不方便; 六种异喹啉生物碱的紫外最大吸收波长不同, 测定样品时基线不稳且有负吸收峰, 见图 1A; 用改良 Dragendorff 试剂显色, 所有生物碱均呈橙色, 带荧光的杂质不显色, 故基线稳定, 杂峰少, 样品波长及参比波长完全一致, 便于测定, 见图 1B。

测定条件: 反射法锯齿扫描; λ_s 500 nm, λ_R 650 nm; 狭缝 1.25×1.25 mm; 灵敏度×1;

Tab 2. Test of different light source for detection of isoquinoline alkaloids

Alkloid	Fluorescence		Ultraviolet*	Visible**	
	λ_{ex}	λ_{em}	λ_{max}	λ_s	λ_R
Protopine	285	...	285,235	500	650
d-Isocorynoline	290	500	290,240	500	650
d-Corynoline	295	500	295,235	500	650
Tetrahydrocoptisine	350	500	350,260	500	650
Acetylcorynoline	300	500	300,235	500	650
Tetrahydrocorysamine	350	500	350,270,235	500	650

* Exposure to iodine vapour; ** Spray reagent: modified Dragendorff's reagent

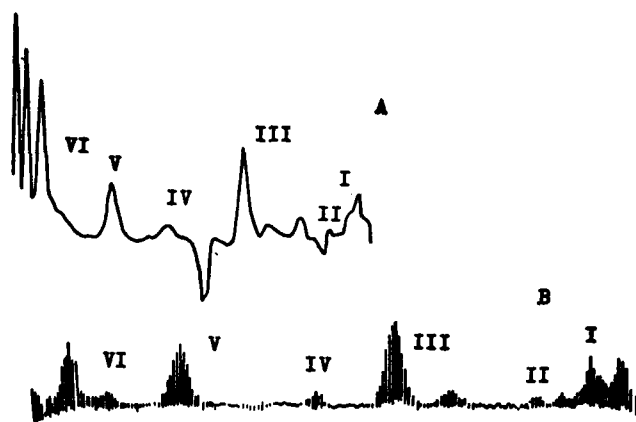


Fig 1. Scan graph of thin layer chromatogram of *C. bungeana*
Light source A: UV; B: Vis. Scan speed (mm/min) A: 40; B: 20

扫描速度 20 mm/min; 纸速 20 mm/min。

微处理机主要参数: 峰宽 0.50; 斜率 15000.00, 漂移 1000000.00, 最小峰面积 50.00; 方法 40。

2. 稳定性测定

将六种异喹啉生物碱纯品溶液点在碱性硅胶G薄层上, 分别用展开剂A及B饱和后展开, 显色, 密封, 并测定不同时间各色点的面积, 结果见图2。

3. 精密度测定

将六种异喹啉生物碱纯品溶液点在碱性硅胶G薄层上, 普洛托品(I)用展开剂B其余生物碱(II~VI)用A展开, 并比较了不同饱和和时间对精密度的影响, 结果见表3。

4. 线性范围的测定

精密配制一定浓度(约 0.5 mg/ml)的生物碱混合液, 分别点 1~6 μ l 于碱性硅胶G薄层上, 分别用展开剂A及B展开, 显色, 密封, 并测定其斑点面积, 用斑点面积及点样浓度作图, 在 0.5~3.0 μ g 间成直线, 合适点样量为 2 μ g, 见图3。

5. 样品提取条件的比较

精密称取样品粉末 0.5 g 四份, 用以下四种方法进行提取;

(1) 于沙氏提取器中用氯仿热提至无生物碱反应, 浓缩氯仿至干, 准确加入氯仿 2 ml

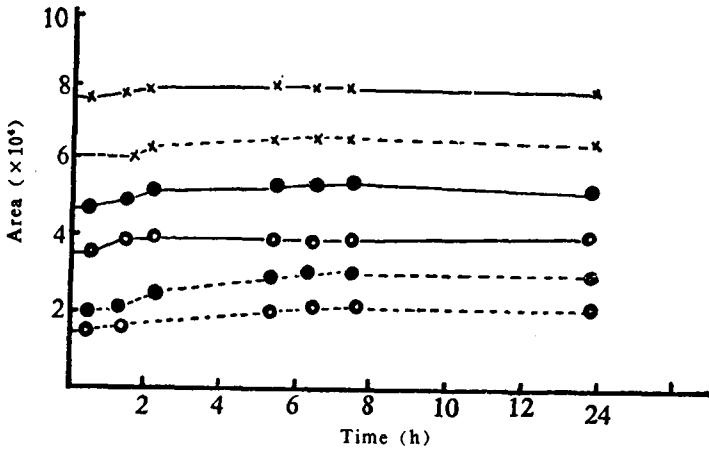


Fig 2. Stability of colour spots of isoquinoline alkaloids

x---x IV; x---x V; ●---● III;
 ●---● VI; ●---● I; ○---○ II

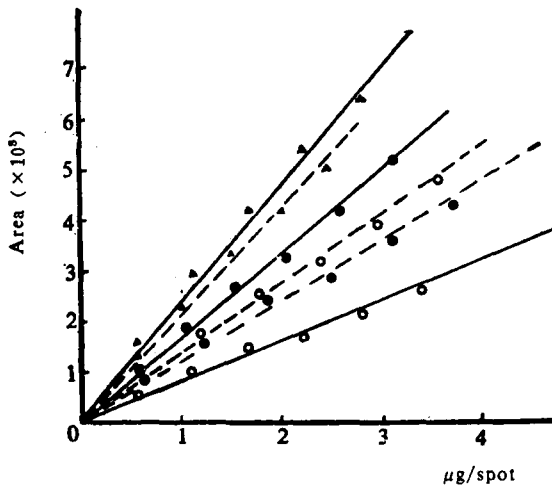


Fig 3. Linear range. ▲---▲ VI; ▲---▲ I; ●---● V; ○---○ IV; ●---● III; ○---○ II

Tab 3. Influence of saturation for accuracy of isoquinoline alkaloids

Saturation time (min)	CV%(n=6)					
	I	II	III	IV	V	VI
0	...	3.00	6.97	9.28	6.79	2.96
15	...	3.60	4.16	3.77	4.56	3.06
45	1.12	1.88	1.93	2.90	1.81	1.68

溶解残渣。

(2) 加苯 10 ml 冷浸过夜, 取滤液 5 ml 蒸干后加氯仿 1.0 ml 溶解残渣。

(3) 加甲醇 10 ml 冷浸过夜, 取滤液 5 ml 蒸干后加氯仿-甲醇(1:1)1.0 ml 溶解残渣。

(4) 加氨性氯仿 10 ml 冷浸过夜, 取滤液 5 ml 蒸干后加氯仿 1.0 ml 溶解残渣。

结果见表 4, 5。

Tab 4. Comparison of extraction method for *Corydalis bungeana*

Extraction method	Amount of isoquinoline alkaloid extracted(%)		
	I	III	V
(1)	0.021	0.123	0.093
(2)	0.015	0.023	0.048
(3)	0.035	0.152	0.082
(4)	0.063	0.195	0.110

Tab 5. Comparison of solvent quantity and maceration time on extraction method(4)

Solvent quantity (ml)	Maceration time (h)	Amount of isoquinoline alkaloid extracted(%)		
		I	III	V
10	12	0.066	0.205	0.103
20		0.061	0.201	0.108
30		0.063	0.197	0.108
10	12	0.075	0.217	0.109
	24	0.068	0.216	0.109

6. 样品分析

提取 精密称取样品粉末 0.5 g, 精密加入氨性氯仿 10.0 ml 冷浸过夜, 精密吸取滤液 5.0 ml, 蒸干后加入氯仿 1.0 ml 溶解残渣。精密称取总碱 10.0 mg 于 2 ml 容量瓶中, 用氯仿溶解并稀释至刻度。精密称取片剂粉末 50.0 mg 于 2 ml 容量瓶中, 用氨性氯仿溶解并稀释至刻度。

苦地丁及其总碱、片剂中各成分的含量相差悬殊, 点样时必须调整样品溶液浓度, 使点样量适合线性范围。结果见表 6, 7。

Tab 6. Quantitative determination of *Corydalis bungeana* and other related plants

Sample	Amount of isoquinoline alkaloid(%)					
	I	II	III	IV	V	VI
1. <i>Corydalis bungeana</i> Turcz	0.06	trace	0.20	...	0.11	0.22
2. <i>C. stricta</i> Steph.	0.10	trace
3. <i>C. conspersa</i> Maxim.	0.05	...	0.64	...	0.13	...
4. <i>C. linearoides</i> Maxim.	0.29	trace
5. <i>C. mucronifera</i> Maxim.	0.11	0.01
6. <i>C. melanchloria</i> Maxim.	0.02	...	0.30	...	0.24	...
7. <i>C. hendersonii</i> Hend.	0.06	0.01

Tab 7. Quantitative determination of isoquinoline alkaloids in total alkaloid and tablets of *Corydalis bungeana*

Sample	No.	Alkaloid			
		I	III	IV	V
Total alkaloid (%)	1	9.16	49.06	0.04	1.46
	2	14.01	32.76	0.43	6.71
	3	2.26	52.29	0.67	17.31
	4	1.24	67.97	0.13	11.75
Tablet (mg/tab)	1	1.45	6.86	0.21	0.81
	2	1.60	6.98	0.17	0.68

参 考 文 献

1. 潘溪庆等. 苦地丁生物碱的初步研究. 药学通报 1981, 16:57.

TLC SEPARATION AND DENSITOMETRIC DETERMINATION OF SIX ISOQUINOLINE ALKALOIDS IN *CORYDALIS BUNGEANA*

HE Li-Yi and ZHANG Ya-Bin

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT Application of thin-layer chromatographic method for separation and subsequent visible densitometric determination of protopine (I), d-isocorynoline (II), d-corynoline (III), tetrahydrocoptisine (IV), acetylcorynoline (V) and tetrahydrocorysamine (VI) in *Corydalis bungeana* is described. The procedure is as follows:

Sample preparation: 0.5 g of pulverized sample of crude drug is macerated overnight with 10 ml of chloroform saturated with 25% NH₄OH in a glass stoppered flask. The extract is filtered and exactly 5 ml of the filtrate are evaporated to dryness. The residue is dissolved in 1 ml of chloroform.

Detection and identification of alkaloids in extract: Thin layer chromatography: Basic silica gel G plates (15×15 cm); Developing solvent: hexane-chloroform-methanol A. 8:2:0.25; B. 4:5:1. Detection of spots by spraying with modified Dragendorff's reagent. R_f values of II, III, IV, V and VI are 0.13, 0.28, 0.46, 0.56 and 0.79, respectively with A. R_f value of I is 0.58 with B.

Estimation of alkaloid contents: After spraying, the plate is covered immediately with a glass plate of the same size and left to stand for 2 hours to allow the spots to reach stability. The spots are scanned with a Shimadzu Dual-Wavelength TLC Scanner CS-910. The results are calculated by comparison with standards spotted on the same plate.

Key words *Corydalis bungeana* Turcz; Protopine; d-Isocorynoline; d-Corynoline; Tetrahydrocoptisine; Acetylcorynoline; Tetrahydrocorysamine; TLC-densitometry