

十五种原小檗碱型季铵生物碱高效液相色谱条件的优选

周元瑶 陈燕祥 朱斌 李芳 郝雷* 李信炯

(武汉市药品检验所)

提要 评价了色谱优化指标的选择, 提出用色谱图中组分(i)与参比组分(s)保留体积比值的对数值 $[\ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})]$ 来表示各组分的保留行为, 以相邻物质对的 $\ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})$ 的差值 $[\ln(V_{R(2)}/V_{R(4)}) - \ln(V_{R(1)}/V_{R(3)}) = \ln(V_{R(2)}/V_{R(1)}) = \ln \alpha']$ 为选择性指标; 对天然产物中存在的十五种原小檗碱型季铵生物碱的反相色谱条件进行了优选; 并根据检测结果, 讨论了不同基团在原小檗碱母核上的不同位置与色谱图中保留值的关系。

关键词 原小檗碱型季铵生物碱; 高效液相色谱法; 色谱优化

原小檗碱(protoberberine)型生物碱广泛存在于罂粟科(Papaveraceae)、毛茛科(Ranunculaceae)、小檗科(Berberidaceae)和防己科(Menispermaceae)等植物中, 根据其化学结构可分为叔胺和季铵两大类生物碱, 通常分别以延胡索乙素(tetrahydropalmatine)或小檗碱(berberine)为其代表。原小檗碱型季铵生物碱(以下简称“季铵碱”)因其极性较大, 在采用经典的植化方法进行提取纯化时, 远不如叔胺生物碱易于分离、鉴定, 因而在早期的文献中, 对微量季铵碱的报道较少; 近十年来, 由于采用 Mayer 试剂⁽¹⁾或硫氰酸铬铵⁽²⁾沉洗季铵碱, 经阴离子交换树脂转化成季铵碱的氯化物后, 再用小滴逆流色谱法(DCCC)⁽³⁾或其它色谱方法⁽⁴⁾重新考察了紫堇属(*Corydalis*)、荷包牡丹属(*Fumaria*)或白蓬草属(*Thalictrum*)植物, 以及中药黄连⁽⁵⁾的季铵碱, 获得前人在该植物中未曾分离得的一些微量组分, 为研究植物的亲缘关系和资源的充分利用创造了条件。采用反相高效液相色谱法考察上述科、属植物中所含季铵碱的组分, 不失为一个既快又好的分析方法, 但前人^(6~9)有关这方面的报道均局限于小檗碱、巴马亭(palmatine)、黄连碱(coptisine)、药根碱(jatrorrhizine)、非洲防己碱(columbamine)、小檗红碱(berberubine)和脱氢紫堇碱(dehydrocorydaline)中的3~4种组分。为使众多的季铵生物碱能在同一条件下进行HPLC的定性和定量分析, 本文就天然产物中的十五种季铵碱(见表1)进行了反相色谱条件的优选, 并对优化指标的选择, 以及不同基团在原小檗碱母核上的不同位置与色谱行为的关系, 作了讨论。

实验部分

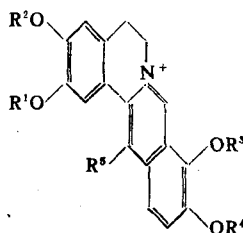
一. 仪器与药品

高效液相色谱仪 岛津LC-3A, 附SPD-2可调紫外检测器、CR-1B色谱数据处理机、CTO-6A柱加热炉和SIL-A进样阀; Perkin-Elmer系列3, 附LC-65T可调紫外检测器、岛津CR-3A色谱数据处理机和Rheodyne 7105进样阀。色谱柱 Nucleosil 5 C₁₈柱(25cm ×

本文于1987年12月30日收到。

* 南京药学院1983年应届毕业实习生

Tab 1. Structure of protoberberine type quaternary alkaloids in natural products



No	Name	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	Dehydrothalictricavine		CH ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2	Dehydrocorydaline	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
3	Berberine		CH ₂	CH ₃	CH ₃	H
4	Palmatine	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
5	Corysamine		CH ₂		CH ₂	CH ₃
6	Dehydrocavidine	CH ₃	CH ₃		CH ₂	CH ₃
7	Coptisine		CH ₂		CH ₂	H
8	Epiberberine	CH ₃	CH ₃		CH ₂	H
9	Jatrorrhizine	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
10	Columbamine	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
11	Dehydrocorydalmine	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
12	Dehydrocheilanthifoline	H	CH ₃		CH ₂	H
13	Stepharanine	H	CH ₂	CH ₃	H	H
14	Berberrubine		CH ₂	H	CH ₃	H
15	Palmatrubine	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H

4.0 mm), 塔板数按小檗碱测定值计算为 5000。流动相 水为全玻璃蒸馏器重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯, 配制后经超声波脱气处理; 流速为 1.0 或 1.5 ml/min。对照品 名称见表 1, 其中化合物 1, 13, 14 和 15 采用半合成法制备, 其它均自植物中分离纯化而得; 化合物 5, 11 和 12 均经与可信物质(authentic substance) 用HPLC法证实。

二. 色谱优化指标ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})的导出

安登魁等⁽¹⁰⁾曾对色谱分离的最优化作过综述, 介绍了色谱响应函数(CRF) 和色谱优化函数(COF), 分别为相邻两峰的分参数(Pi) 或分离度(R) 的函数:

$$CRF = \sum_i^K \ln(P_i),$$

$$COF = \sum_{i=1}^K A_i \ln(R_i/R_{id}) + B(T_M - T_L).$$

在上述优化指标中, P_i 或R需自色谱图中测量计算而求取, 操作繁复; 对于色谱峰的重叠或出峰次序因条件改变而倒置时, 不能适用。

卢佩章等^(11,12)在HPLC中引入了选择性指标(α') 和总分离效能指标(K₁), 用来衡量不同“物质对”分离的好坏与难易, 其定义为

$$\alpha' = t_{R(2)}/t_{R(1)}$$

$$K_1 = (t_{R(2)} - t_{R(1)})/2\Delta t_{1/2} = (\alpha' - 1) \sqrt{n/5.54},$$

$t_{R(2)}$ 和 $t_{R(1)}$ 为相邻物质对的保留时间。计算非常方便,且当 n 为一定值时, α' 仅与 K_1 值有关,因而也能直观地反映分离度(R)

$$R = 2(t_{R(2)} - t_{R(1)}) / (W_1 + W_2) = K_1 \sqrt{5.54/16} = 0.588K_1;$$

在指定色谱条件下,当多组分中最难分离物质对的选择性指标($\alpha'_{\text{最难}}$)确定后,即可求出所需色谱柱的最少理论板数($n_{\text{最少}}$)

$$n_{\text{最少}} = 5.54 \times K_1^2 / (\alpha' - 1)^2 \quad (\text{式 } 1)$$

为使峰高定量法的分析数据达到1%精度,上式中的 K_1 值应大于1.91。

在实际应用中,由于不同时期的条件难以绝对相同,致使测得的 t_R (或 V_R)的变异较大,给数据处理带来困难,因此我们采用组分(i)和参比组分(s)的保留体积比($V_{R(i)}/V_{R(s)}$),根据

$$\begin{aligned} \alpha' &= t_{R(2)}/t_{R(1)} = V_{R(2)}/V_{R(1)} \\ &= (V_{R(2)}/V_{R(s)}) / (V_{R(1)}/V_{R(s)}), \end{aligned}$$

即得

$$\ln \alpha' = \ln(V_{R(2)}/V_{R(s)}) - \ln(V_{R(1)}/V_{R(s)}).$$

如以 $\ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})$ 为纵坐标和以色谱条件为横坐标作图(如图1,2),则不同物质对在该条件下的纵坐标差值,即为该物质对的 $\ln \alpha'$,因而能直观地判断该物质对的分离难易;在实际应用中,当多组分中的某些组分不存在时,可将该组分的曲线自图1中抹去,即能求出其它组分间的 $\ln \alpha'$,再结合对 $V_{R(s)}$ 值大小的要求,对色谱条件进行优选。

三. 影响 $\ln \alpha'$ 的诸因素

卢佩章等⁽¹³⁾研究了液固色谱中流动相组成对保留值的影响,推导并验证了基本关系式

$$\ln K' = b_0 + b_1 C_B + b_2 \ln C_B.$$

其后,王俊德等⁽¹⁴⁾又在反相高效液相色谱中加以验证。因而在流动相组成的优选中,对每一因素可通过4~5组数据的曲线拟合,即可获得更多的信息量,进行最佳条件的选择。本文在前文⁽⁸⁾的基础上,以乙腈-水为流动相,在346 nm处检测,系统地研究了流动相中乙腈与水的容量比、pH值和磷酸盐离子浓度,以及柱温等因素对 $V_{R(i)}$ (以小檗碱为参比组分)和 $\ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})$ 的影响,得结果如下:

(一) 当其它色谱条件固定不变时,流动相中乙腈含量的增加,能明显地降低 $V_{R(i)}$,有利于测定速度;但对各物质对 $\ln \alpha'$ 的影响微弱而均衡,因而不是优选的主要因素;乙腈与水的容量比为24~32:76~68时,均可获得合适的结果。

(二) 流动相中磷酸盐离子浓度在15~50 mmol/L范围时, $V_{R(i)}$ 随离子浓度的增加而稍有降低,各物质对的 $\ln \alpha'$ 除化合物8~9略有减少外,没有明显的改变;选用浓度以20 mmol/L为宜。

(三) 流动相的pH值在2.1~5.6范围内变动时,对化合物14和15的 V_R 影响很大,pH在3.5时的峰形严重拖尾,并随pH值的升高而加剧,直至不出峰;其它组分的 V_R 虽也随pH值的升高而明显增大,但各物质对的 $\ln \alpha'$ 值除化合物4~5外均有加大,化合物8~9尤为明显,见图1。经综合平衡并结合流动相配制操作的简便和pH值的恒定,选用的pH值为4.85,亦即含20 mmol/L的 KH_2PO_4 ,使适用于化合物8~9的分离;或选用pH值为2.15,即含20 mmol/L的 H_3PO_4 ,适用于化合物14和15的检测。

(四) 柱温自 20°C 上升至 50°C, 除明显降低柱压有利于加快流速, 以及减少 $V_{R(s)}$ 有利于分析速度外, 并增大化合物 2~3、化合物 4~5 和化合物 6~7 的 $\ln a'$ 值, 改善上述物质对的分度, 见图 2; 是本色谱条件优选中的主要因素。综合衡量后, 认为 45°C 为最佳。

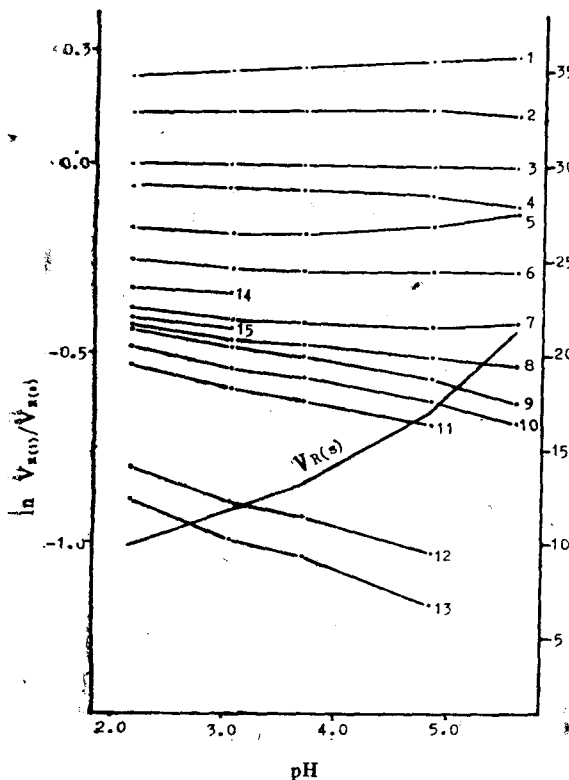


Fig 1. Effect of pH value in $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (30:70) mobile phase containing 20 mmol/L PO_4^{3-} on $V_{R(s)}$ and $\ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})$ at 45°C.

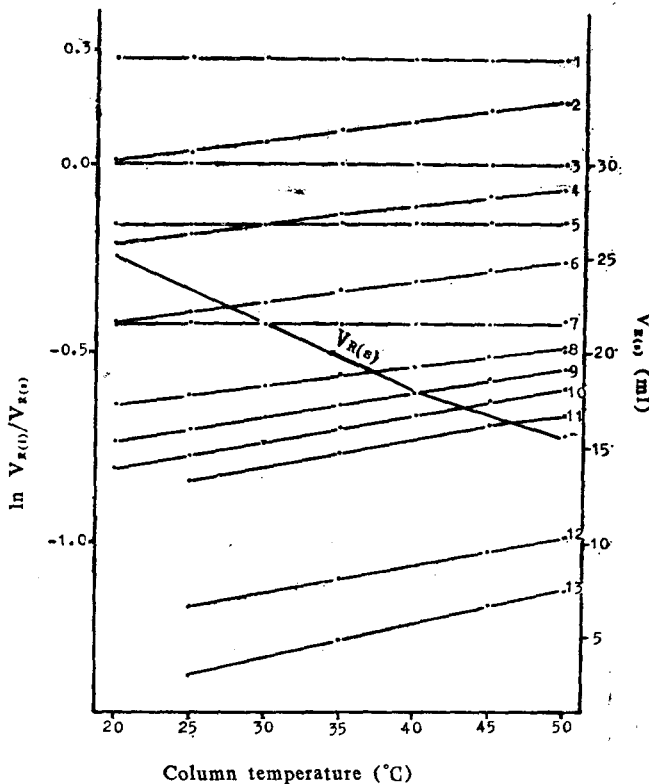


Fig 2. Effect of column temperature on $V_{R(s)}$ and $\ln(V_{R(i)}/V_{R(s)})$ using 20 mmol/L KH_2PO_4 in $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (30:70) as mobil phase.

讨论与小结

一. 根据上述影响 $\ln a'$ 的诸因素, 结合最终出峰物质的 V_R 不宜太大的要求, 选定条件如下: Nucleosil 5 C_{18} 柱(25cm×4mm), 柱温 45°C; 流动相为乙腈—水(30:70)含 20 mmol/L KH_2PO_4 , 流速 1.5 ml/min; 346 nm 处检测。其色谱图如图 3, 除化合物 14 和 15 不出峰外, 其它季铵碱物质对的 $\ln a'$ 最佳为 0.055; 为使各组分间能达到较好的分离, 以便于定量分析, 根据公式(1) 计算, $n_{\text{最少}}=6300$, 即应选用理论板数大于 6500 的色谱柱。

结果与讨论

二. 化合物 14 或 15, 不适于采用 pH 值大于 3.5 的流动相, 这可能与其 9 位上的酚羟基能和分子内的季铵基形成内铵盐有关。为了检测它们, 流动相应改用乙腈—水(26:74) 含 20 mmol/L 的 H_3PO_4 (pH 值为 2.15); 色谱图如图 4, 其中化合物 8~9 难以分离。

三. 从图 3 和图 4 可以归纳出在本色谱条件下, 原小檗碱母核不同位置上的不同取代基与色谱图中保留值的关系为: 13 位上 $-\text{CH}_3 > -\text{H}$; 2 和 3 位上 $-\text{OCH}_2\text{O}- > -\text{OCH}_3$ 和 $-\text{OCH}_3 > -\text{OCH}_3$ 和 $-\text{OH} > -\text{OH}$ 和 $-\text{OCH}_3$; 9 和 10 位上 $-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{OCH}_3 > -$

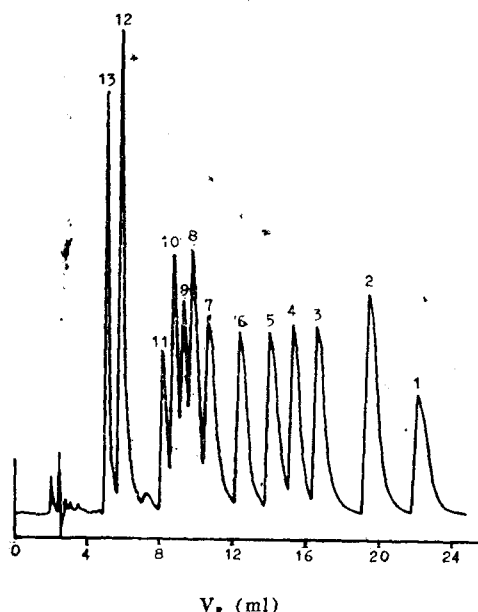


Fig 3. Chromatogram of a mixture of 13 protoberberine type quaternary alkaloids on Nucleosil 5 C₁₈ column (25 cm × 4.0mm) at 45°C, using 20 mmol/L KH₂PO₄ in CH₃CN-H₂O (30:70) as mobile phase. 1~3, see tab 1.

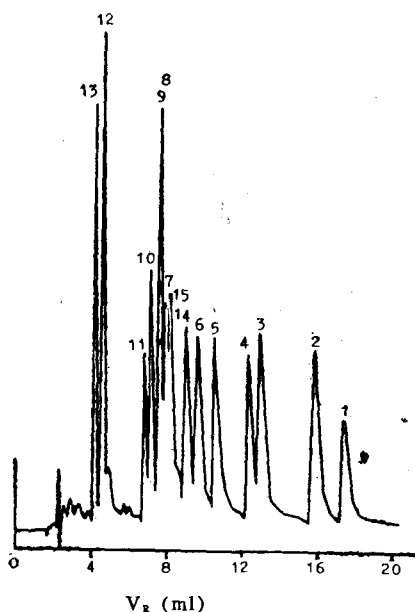


Fig 4. Chromatogram of a mixture of 15 protoberberine type quaternary alkaloids on Nucleosil 5 C₁₈ column (25 cm × 4.0mm) at 45°C, using 20 mmol/L H₃PO₄ in CH₃CN-H₂O (26:74) as mobile phase. 1~15, see tab 1.

OCH₂O—>—OCH₃ 和—OH; 即其保留值的大小, 除化合物 14 和 15 外, 将按表 1 中的顺序排列。

致谢 承天津、云南、广西和贵州等省、市、自治区药品检验所分别赠予脱氢紫堇碱、巴马亭、dehydrocavidine 或药根碱; Jiri Slavik 教授、Naotaka Nagakura 教授和 Shunsuke Naruto 博士分别赠予 corysamine, dehydrocorydalmine, dehydrocheilanthifoline 和 dehydrothalictrifoline 对照品; 武汉市医学科学研究所仪器设备上给予支援。

参 考 文 献

- Pandey VB, et al. Quaternary alkaloids of *Fumaria indica*. *Phytochemistry* 1976; 15:545.
- Wu WN, et al. Alkaloids of *Thalictrum* XXI. Isolation and characterization of alkaloids from the roots of *Thalictrum podocarpum*. *Lloydia* 1977; 40:384.
- Tani C, et al. Alkaloids of *Papaveraceous* plants XXXIV. Alkaloids of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med* 1981; 41:403.
- Chattopadhyay SK, et al. Quaternary alkaloids of *Thalictrum foliolosum*. *Phytochemistry* 1983; 22:2607.
- Ikuta A. and Itokawa H. Alkaloids of coptis rhizome. *J Nat Prod* 1984; 47:189.
- 服部忠雄, 他. 生薬主成分の分析化学的研究 (第 2 报) オウレン中ベルベリンの高速液体クロマトグラフィによる定量. *薬学雑誌* 1977; 97:1305.
- 石川治, 他. 高速液体クロマトグラフィによる生药分析: オウレン, オウベク. 同上. 1978; 98:976.
- 周元瑶, 李芳. 用反相高效液体色谱法考察盐酸黄连素的质量. *药物分析杂志* 1984; 4:131.
- 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. 同上 1986; 6:195.
- 安登魁, 相秉仁. 药物色谱分离最优化. *南京药学院学报* 1986; 17:73.
- 卢佩章. 高效液相色谱中的几个问题. 见: 中国科学院大连化学物理研究所色谱研究室编. 高效液相色谱微粒型固定相(论文集). 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1980:1~8.
- 张玉奎, 等. 高效液相色谱的基本参数和基本理论. *色谱* 1985; 2:34, 97.
- 卢佩章, 等. 液-固色谱中流动相组成对保留值的影响. *科学通报* 1982; (19):1175; (21):1306.
- 王俊德, 等. 反相高效液相色谱中流动相组成对保留值的影响. *中国科学 B 辑* 1985; (1):24.

OPTIMIZATION OF HPLC CONDITIONS FOR 15 NATURALLY OCCURRING PROTOBERBERINE TYPE QUATERNARY ALKALOIDS

YY Zhou, YX Chen, B Zhu, F Li, L Hao and XJ Li

(Wuhan Municipal Institute for Drug Control, Wuhan)

ABSTRACT The selection of chromatographic optimization criterion is evaluated. Using natural logarithm of the ratio of retention volume of component (i) to reference component (s) in the chromatogram as a function of the retention behavior of each component, the differences between the $\ln (V_{R(i)}/V_{R(s)})$ of adjacent pairs of substances were proposed as a measure of separation selectivity. Conditions of reversed phase chromatography of 15 naturally occurring protoberberine type quaternary alkaloids were optimized. On Nucleosil 5 C₁₈ column (25 cm × 4 mm) at 45°C with detection at 346 nm, isocratic elution with CH₃CN-H₂O (30:70) containing 20 mmol/L KH₂PO₄ at 1.5 ml/min is suitable for the separation of 13 protoberberines. The other two, berberubine and palmatrubine, must be eluted with a mobile phase whose pH value is less than 3.5. Analysis of the data obtained showed the relations between the different functional groups at different positions on protoberberine ring system and the retention values in the chromatogram.

Key words Protoberberine type quaternary alkaloids; HPLC; Chromatographic optimization