



中药夏天无超临界提取物中 六种生物碱含量的UFLC测定

No.LC-024

摘要: 本文运用了UFLC对夏天无超临界提取物进行了分析,建立了一套测定指纹图谱以及同时测定六种主要生物碱含量的方法,为UFLC在中药提取物中的运用打下基础,也有利地证明了UFLC的优点。

关键词: UFLC 中药 夏天无 指纹图谱

夏天无系罂粟科(Papaveraceae)紫堇属延胡索亚属多年生草本植物伏生紫堇*Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. (*C. amabilis* Migo)的干燥块茎或全草,具活血、通络、行气、止痛等功效。主治高血压、脑血管引起的中风偏瘫,并对风湿性关节炎、坐骨神经痛、小儿麻痹后遗症等有较好的作用,其主要活性成分为生物碱类。传统方法用HPLC分析夏天无超临界提取物生物碱,耗时长,一般需要80分钟左右。本文用UFLC对夏天无超临界提取物分析只需要14分钟。利用该UFLC条件不但可以制定夏天无超临界提取物的指纹图谱,还可以同时测定其中主要六碱的含量,为以后分析夏天无超临界提取物提供便利。

仪器与试剂

Shimadzu UFLC高效液相色谱仪:SPD-M20A二极管阵列检测器, DGU-20A5在线脱气机, LC-20AD输液泵(双泵), SIL-20AC自动进样器, CTO-20AC柱温箱, LCsolution色谱工作站。

夏天无药材来自江西余江县,对照品为原阿片碱

(EGE)、夏无宁碱(PRO)、紫堇尔明(TETRA)、毕枯枯灵(BI)、盐酸巴马汀(KIK)、延胡索乙素(PAL)。无水乙醇、冰乙酸、三乙胺、氨水、氯仿为分析纯;甲醇、乙腈为HPLC级,水为纯净水(并以0.45 μm水性微孔滤膜滤过)。

方法与结果

1. 色谱条件

流动相:A:77mL冰乙酸加8mL三乙胺加水稀释至1000mL; B:甲醇:乙腈(2:8)。

梯度洗脱程序:

时间(min)	B 浓度(%)
0.01	12
5.50	12
8.00	18
10.00	35
13.50	35
13.51	12
17.00	STOP

色谱柱: shim-pack XR-ODS(75×3mm, 2.2 μm), 柱温: 40℃, 流速: 1mL/min, 检测波长: 282nm。

2. 供试品的制备及溶液配制

夏天无药材用超临界提取。取超临界萃取物,干燥,用氯仿溶解至25mL。取0.1mL挥干用流动相溶解并稀释至25mL,用0.22 μm微孔滤膜滤过。

3. 标准溶液配制

根据药材中成分含量配制对照品系列溶液,见表

1。溶液用0.22 μm微孔滤膜滤过。

表1 标准溶液浓度系列

名称 浓度 μg/mL	EGE	PRO	TETRA	BI	KIK	PAL
浓度 1	1400	700	350	175	87.5	43.75
浓度 2	852	426	213	106.5	53.3	26.6
浓度 3	839	419.5	209.7	104.9	52.4	26.2
浓度 4	518	259	129.5	64.75	32.38	16.19
浓度 5	104	52	26	13	6.5	3.25
浓度 6	13.3	6.65	3.33	1.66	0.813	0.416

4. 定量分析

按上述色谱条件获得标准溶液线性方程及线性回归系数，见表2。

表1 标准溶液浓度系列

名称	线性方程	回归系数
EGE	$y=5.077133 \times 10^{-4}X+3.634177$	1.0000
PRO	$y=3.913227 \times 10^{-4}X+2.171534$	0.9999
TETRA	$y=4.123552 \times 10^{-4}X+0.460858$	0.9999
BI	$y=1.919997 \times 10^{-3}X-0.7133639$	1.0000
KIK	$y=3.535232 \times 10^{-4}X-0.1505344$	1.0000
PAL	$y=2.629337 \times 10^{-4}X$	0.9999

5. 加标回收率的测定:

取超临界提取的夏天无药材的样品13g用氯仿溶解于250mL容量瓶，取1mL用氯仿稀释成10mL。取1mL加入一定浓度的EGE，BI，KIK，PAL标品。用流动相稀释到10mL即为加样回收率的样品。取2.5mL用氯仿稀释成10mL，取1mL加入一定浓度的PRO，TETRA标品。用流动相稀释到10mL即为加标回收率的样品。见表3。

表3 加标回收率

样品名称	未加标样品量 $\mu\text{g/mL}$	加标量 $\mu\text{g/mL}$	加标回收 1		加标回收 2		加标回收 3		加标回收 4		加标回收 5		加标回收 6		平均回收率 %	RSD%
			测定量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	测定量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	测定量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	测定量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	测定量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %	测定量 $\mu\text{g/mL}$	回收率 %		
GEG	64.72	74.75	135.92	95.26	142.82	104.49	142.49	104.04	142.00	103.38	142.20	103.65	140.84	101.83	102.11	3.107
PRO	36.76	42.6	78.33	97.59	80.41	102.49	79.53	100.41	80.45	102.57	78.59	98.19	80.16	101.88	100.52	1.987
TETRA	36.86	41.05	77.12	98.07	79.15	103.02	78.01	100.24	79.07	102.83	70.98	97.78	79.16	103.04	100.83	2.250
BI	49.52	44.16	93.06	98.60	93.17	98.85	92.93	98.30	92.96	98.37	93.19	98.90	93.13	98.75	98.63	0.229
KIK	9.39	8.91	18.14	98.20	18.73	104.83	18.10	97.76	18.74	104.94	18.71	104.60	18.66	104.04	102.39	3.064
PAL	8.83	4.2	13.22	104.52	13.00	99.29	12.91	97.14	13.00	99.29	12.95	98.10	13.00	99.29	99.60	2.349

6. 样品测定

取超临界提取的样品4份用UFLC和HPLC分别进行含量测定，结果见表4、表5。

表4 UFLC测定夏天无超临界提取物中生物碱的含量（示提取物占浸膏的含量%）

编号	BI	EGE	KIK	PRO	TETRA	PAL	$\Sigma 6$ 碱	Σ 总碱
1	8.41	24.26	2.67	21.34	17.75	0.99	75.43	79.21
2	9.03	26.79	3.08	20.95	19.71	0.32	79.89	83.42
3	8.83	25.00	2.78	22.79	18.34	1.05	78.79	82.85
4	11.21	18.72	2.44	20.71	15.77	0.34	69.19	73.82

表5 HPLC测定夏天无超临界提取物中生物碱的含量（示提取物占浸膏的含量%）

编号	BI	EGE	KIK	PRO	TETRA	PAL	$\Sigma 6$ 碱	Σ 总碱
1	8.70	21.42	2.77	18.29	18.34	1.23	70.76	79.83
2	9.89	23.58	3.30	17.52	21.64	0.39	76.32	85.90
3	9.24	22.58	2.94	20.21	19.54	1.24	75.75	85.06
4	11.77	17.91	2.63	20.39	17.51	0.52	70.73	77.97

7. 精密度实验:

取夏天无标准工艺提取药材一份, 照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 连续进样6次, 保留时间RSD小于0.7%, 色谱峰峰面积的RSD小于3%, 结果见表6、表7。

表6 夏天无6种生物碱成分精密度实验 (示保留时间min)

峰号	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	RSD%
EGE	2.696	2.694	2.671	2.657	2.656	2.661	0.623
PRO	3.55	3.549	3.518	3.495	3.499	3.509	0.628
TETRA	4.17	4.163	4.128	4.098	4.105	4.118	0.662
BI	4.797	4.79	4.75	4.723	4.73	4.745	0.592
KIK	8.453	8.424	8.348	8.322	8.324	8.361	0.593
PAL	12.386	12.375	12.355	12.353	12.357	12.366	0.096

表7 夏天无6种生物碱成分精密度实验 (示峰面积)

峰号	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	RSD%
EGE	28509	28391	28361	28198	28293	28188	0.396
PRO	325384	324445	324160	322924	323799	322622	0.286
TETRA	43669	43258	43230	43149	43322	43307	0.381
BI	251159	250153	250037	249000	249827	248746	0.318
KEK	231887	231311	231261	230596	230918	230360	0.217
PAL	1309	1333	1328	1345	1293	1414	2.866

8. 稳定性实验

取夏天无标准工艺提取药材一份, 照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 在24小时内进样5次, 保留时间RSD小于0.6%, 色谱峰峰面积的RSD小于5%, 结果见表8、表9。

表8 夏天无6种生物碱成分稳定性实验 (示保留时间min)

序号	0h	1h	3h	4h	7h	23h	RSD%
EGE	2.624	2.601	2.597	2.593	2.584	2.614	0.511
PRO	3.427	3.398	3.395	3.386	3.374	3.406	0.486
TETRA	4.011	3.975	3.972	3.961	3.942	3.975	0.520
BI	4.626	4.59	4.585	4.573	4.554	4.584	0.472
KEK	8.031	7.98	7.968	7.947	7.894	7.938	0.526
PAL	12.276	12.259	12.256	12.253	12.228	12.24	0.123

表9 夏天无6种生物碱成分指纹图谱稳定性实验 (示峰面积)

编号	0h	1h	3h	4h	7h	23h	RSD%
EGE	28965	28935	28995	29021	28895	28604	0.483
PRO	325258	324990	324246	323994	324627	321988	0.330
TETRA	43497	43467	43668	43672	43513	43436	0.215
BI	242303	242080	241497	241613	241980	239984	0.316
KEK	242596	242222	241987	241773	242204	241966	0.107
PAL	2175	2250	2135	2276	2121	1986	4.404

9. 指纹图谱的建立:

取超临界提取的十批药材样品按照供试品溶液项的方法制备。按照色谱条件项的条件进行样分析。结果10批样品共标出16个共有峰。标准指纹图谱见图1。

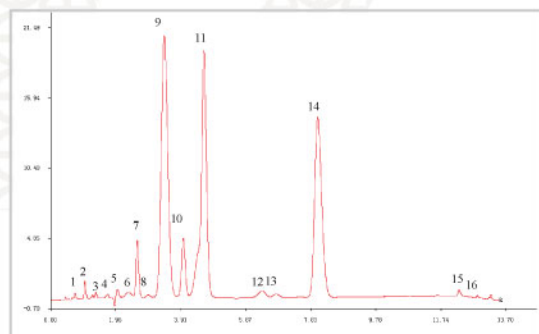


图1 夏天无超临界提取HPLC指纹图谱

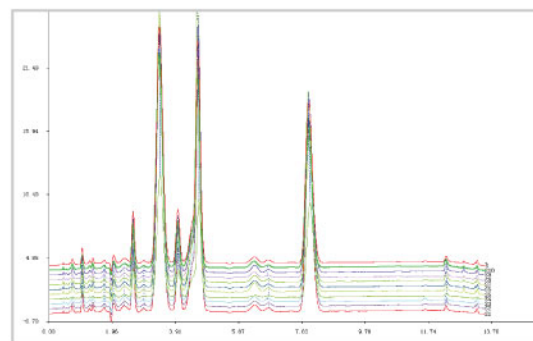


图2 十批次试样的指纹图谱

7#: EGE, 9#: PRO, 10#: TETRA, 11#: BI, 14#: KIK, 15#: PAL

■ 结论

夏天无超临界提取物的UFLC图谱很好地反映了夏天无超临界提取物的情况。根据提取物指纹图谱与标准指纹图谱的比较就可以知道其工艺是否合要求。用UFLC同时测定提取物中的6种主要生物碱，为夏天无超临界提取的质量控制提供了更稳定的质量控制方法。与HPLC同时测定结果相比，用超快速液相色谱分析夏天无超临界提取物只用14分钟，大大优于HPLC所需要的80分钟，且UFLC各峰的分离度良好，测定结果与HPLC的测定结果出入不大。为中药现代化分析提供了更便利的条件。