

生/醋延胡索饮片及配方颗粒的指纹图谱研究及5种生物碱的含量测定^Δ

孙萍萍^{1*}, 郭正红², 杨武德², 羊波¹, 沈成俊³, 沈祥春³, 陶玲³, 肖婷^{3#}(1.浙江省立同德医院药学部, 杭州 310012; 2.贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 3.贵州医科大学药学院/贵州省天然药物资源高效利用工程中心/贵州省普通高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室/贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室/天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)20-2462-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.20.06

摘要 目的:建立生/醋延胡索饮片及配方颗粒的指纹图谱,并测定其中5种生物碱成分(原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀)的含量。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为0.1%磷酸水溶液-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以盐酸巴马汀为参照,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立11批生延胡索饮片、7批生延胡索配方颗粒、12批醋延胡索饮片、11批醋延胡索配方颗粒的指纹图谱并进行相似度评价;采用上述HPLC法测定41批生/醋延胡索饮片及配方颗粒中原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的含量。结果:生延胡索饮片及其配方颗粒分别确定共有峰12、20个,醋延胡索饮片及其配方颗粒分别确定共有峰14、16个;各批次同类样品的相似度分别为0.529~0.981、0.342~0.985、0.711~0.999、0.437~0.998。原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀检测质量浓度的线性范围分别为1.9~38.0、2.0~40.0、2.2~44.0、2.6~52.0、2.3~46.0 μg/mL(R^2 均大于0.999 0),加样回收率为100.12%~100.98%(RSD=1.05%~1.90%, $n=9$),精密度、重复性、稳定性(24 h)、耐用性试验的RSD均小于2.0%。不同批次的生/醋延胡索饮片及配方颗粒中上述5种生物碱成分的平均含量分别为0.24~0.46、0.37~0.82、0.24~0.58、0.07~0.75、0.24~0.76 mg/g,RSD为12.27%~147.48%。结论:成功建立生/醋延胡索饮片及配方颗粒的指纹图谱;醋制前后延胡索饮片及配方颗粒指纹图谱相似度不一,且其中上述5种生物碱含量差异较大。

关键词 延胡索;醋制;高效液相色谱法;生物碱;指纹图谱;含量测定

Study on the Fingerprint of Crude/vinegar-processed *Corydalis yanhusuo* Decoction Pieces and Their Dispensing Granules and Content Determination of Five Alkaloids

SUN Pingping¹, GUO Zhenghong², YANG Wude², YANG Bo¹, SHEN Chengjun³, SHEN Xiangchun³, TAO Ling³, XIAO Ting³(1. Dept. of Pharmacy, Zhejiang Provincial Tongde Hospital, Hangzhou 310012, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University/Guizhou Engineering Center for Efficient Utilization of Natural Product Resources/Key Lab of Pharmacology and Druggability Evaluation Characteristics of Natural Product in Guizhou Province/Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Lab/Key Lab of Efficient Utilization of National Product, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of crude/vinegar-processed *Corydalis yanhusuo* decoction pieces and their dispensing granules, and to determine the contents of five alkaloids (protopine, tetrahydropalmatine, corydaline, berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride). METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using palmatine hydrochloride as reference, *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition) was used to establish the fingerprint of 11 batches of *C. yanhusuo* decoction pieces, 7 batches of crude *C. yanhusuo* dispensing granules, 12 batches of vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces and 11 batches of vinegar-processed *C. yanhusuo* dispensing granules. The same HPLC method was adopted to determine the contents of

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660647);国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培训项目(No.国中医药人教函[2019]43号);浙江省中医药科技计划项目(No.2019ZB022);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZY-2019-059);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(No.gzsjkj2019-1-181);贵州医科大学博士启动基金(No.院博合J字[2018]013号)

* 副主任中药师,硕士。研究方向:中药质量分析。电话:0571-89972243。E-mail:spsuper@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药、民族药功效成分及生物活性评价。电话:0851-88416160。E-mail:tingjinxiao@163.com

protopine, tetrahydropalmatine, corydaline, berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride in 41 batches of crude/vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces and their dispensing granules. RESULTS: There were 12 and 20 common peaks for crude *C. yanhusuo* decoction pieces and its dispensing granules, and 14 and 16 common peaks for vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces and its dispensing granules. The similarity of each batch of same type were 0.529-0.981, 0.342-0.985, 0.711-0.999, 0.437-0.998, respectively. The linear range of protopine, tetrahydropalmatine, corydaline, berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride were 1.9-38.0, 2.0-40.0, 2.2-44.0, 2.6-52.0, 2.3-46.0 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 > 0.999$). The recoveries were 100.12%-100.98% (RSD=1.05%-1.90%, $n=9$). RSDs of precision, reproducibility, stability (24 h) and durability tests were all lower than 2.0%. The average contents of five alkaloids in different batches of crude/vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces and its dispensing granules were 0.24-0.46, 0.37-0.82, 0.24-0.58, 0.07-0.75, 0.24-0.76 mg/g. RSDs were 12.27%-147.48%. CONCLUSIONS: The fingerprint of crude/vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces and its dispensing granules is established successfully. The similarities of fingerprint are different before and after processing with vinegar, and the contents of five alkaloids in *C. yanhusuo* decoction pieces and its dispensing granules are greatly different.

KEYWORDS *Corydalis yanhusuo*; Vinegar-processing; HPLC; Alkaloids; Fingerprint; Content determination

延胡索 *Corydalis Rhizoma* 为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 具有活血、行气、止痛的功效, 被称为“止痛之要药”, 专治上下一身诸痛^[1]。该药主产于浙江省东阳、磐安一带, 是著名的“浙八味”之一。延胡索配方颗粒是以单味延胡索饮片经一定工艺加工制成的一种新型配方药物, 因其保存、服用方便, 近年来已逐步在各级医院应用^[2-3], 但目前尚缺乏安全性、生物等效性等方面的系统研究^[4]。

随着分析化学及相关仪器的迅速发展, 有关延胡索活性成分的研究也得以深入。目前, 已在延胡索中发现了40多种生物碱, 主要包括原小檗碱类、阿朴菲类、原阿片碱类、异喹啉苄咪唑类、异喹啉苯并菲啶类、双苄基异喹啉类等^[5]。现代研究表明, 生物碱是延胡索的主要活性成分^[6-8], 具有显著的镇痛、镇静、催眠作用, 对冠心病、心律失常、胃溃疡等疾病有较好的临床疗效^[9-11]。其中, 原阿片碱具有镇痛、解痉、改善微血管循环、抗血小板聚集、扩血管等作用^[12]; 延胡索乙素和延胡索甲素同为延胡索行血镇痛的主要活性成分, 具有镇痛、镇静、催眠、抗心律失常、降血压等作用^[13]; 盐酸小檗碱具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等作用^[14]; 盐酸巴马汀具有抗炎、抗菌、降血糖等作用^[15], 上述5种生物碱均为延胡索抗炎镇痛的主要指标性成分。延胡索作为一味常用中药, 在经典方剂、配方颗粒和中成药等传统中医药的各个领域均有广泛应用, 建立其统一的质量标准意义重大。

为了缓和中药药性、增强药效、降低毒副作用, 通常会对生药材进行炮制加工。生延胡索为延胡索干燥块茎, 常用的炮制方法为醋制。研究表明, 在醋制延胡索中, 原阿片碱、延胡索乙素、巴马汀、小檗碱、去氢延胡索等生物碱含量均有不同程度升高^[16], 同时延胡索乙素的稳定性亦有所增强^[17], 提示炮制会对延胡索的生物碱含量造成一定影响。

目前, 对延胡索的质量控制和评价方法主要有两种: 一种是以《中国药典》为基础, 以延胡索中主要化学

成分的含量作为药材和制剂的质量控制指标, 即2015年版《中国药典》(一部)对延胡索原药材及饮片的含量测定均以延胡索乙素为对象, 对单一化合物进行含量检测与控制^[1]; 另一种方法是建立指纹图谱, 指纹图谱具有全面性、整体性、层次性、关联性和动态性的特点^[18], 有助于实现对中药内在和整体质量的综合评价。基于此, 本研究采用高效液相色谱法(HPLC), 建立11批生延胡索饮片、7批生延胡索配方颗粒、12批醋延胡索饮片、11批醋延胡索配方颗粒的指纹图谱; 同时, 对这41批样品中原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的含量进行测定, 以为生/醋延胡索饮片及其配方颗粒的整体质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260型HPLC仪和Agilent TC-C₁₈色谱柱、Agilent HC-C₁₈色谱柱(美国Agilent公司); Daisogel-C₁₈色谱柱(上海宸乔生物科技有限公司); SG8200HE型数控超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); AUW220D型十万分之一天平(日本Shimadzu公司); HC-800Y高速多功能粉碎机(武义海纳电器有限公司)。

1.2 药品与试剂

11批生延胡索饮片(编号:A1~A11)、7批生延胡索配方颗粒(编号:B1~B7, 规格:1 g/袋)、12批醋延胡索饮片(编号:C1~C12)、11批醋延胡索配方颗粒(编号:D1~D11, 规格:1 g/袋)样品来源信息详见表1。其中, 生/醋延胡索饮片由贵州医科大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为罂粟科紫堇属植物延胡索 *C. yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎或块茎炮制品。原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品(成都植标化纯生物技术有限公司, 批号分别为PCS0963、PCS0603、PCS0604、PCS0133、PCS0470, 纯度均不低于98.0%); 甲醇为色谱纯, 甲酸等其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

表1 样品来源信息

Tab 1 Sample source information

编号	来源	批号	编号	来源	批号	编号	来源	批号
A1	华东医药股份有限公司药材参茸分公司	180704	B4	北京康仁堂药业有限公司	1901	C11	浙江景岳堂药业有限公司	1809025
A2	衢州南孔中药有限公司	1811	B5	浙江佐力药业股份有限公司	1708077	C12	江阴天江药业有限公司	19040111
A3	衢州南孔中药有限公司	1906	B6	北京康仁堂药业有限公司	1907	D1	江阴天江药业有限公司	18082491
A4	广东和翔制药有限公司	HX18A01	B7	江阴天江药业有限公司	19040062	D2	江阴天江药业有限公司	181121095611
A5	桐君堂药业有限公司	190715	C1	华东医药股份有限公司药材参茸分公司	190414	D3	广东一方制药有限公司	9031513
A6	浙江景岳堂药业有限公司	180806	C2	衢州南孔中药有限公司	180614	D4	北京康仁堂药业有限公司	1901
A7	广东和翔制药有限公司	HX18A01	C3	衢州南孔中药有限公司	1904115	D5	浙江佐力药业股份有限公司	1705022
A8	安徽亳州药材市场	1907	C4	广东和翔制药有限公司	HX18B01	D6	浙江佐力药业股份有限公司	K1809006
A9	浙江磐安市场中国药材城	1908	C5	桐君堂药业有限公司	190715	D7	北京康仁堂药业有限公司	1901
A10	浙江民泰医药有限公司	190701	C6	浙江景岳堂药业有限公司	180806	D8	浙江新华医院	190716
A11	江阴天江药业有限公司	190701	C7	广东和翔制药有限公司	HX19H01	D9	浙江景岳堂药业有限公司	K1803053
B1	江阴天江药业有限公司	18050811	C8	安徽亳州药材市场	1907	D10	浙江景岳堂药业有限公司	K1803085
B2	广东一方制药有限公司	18112094937	C9	广东和翔制药有限公司	180221	D11	浙江景岳堂药业有限公司	18127414
B3	广东一方制药有限公司	9030763	C10	浙江景岳堂药业有限公司	180806			

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别精密称取原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品适量,置于1 mL量瓶中,加入少量甲醇摇匀,超声(功率:500 W,频率:59 kHz,下同)使完全溶解后,用甲醇定容,制得原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀质量浓度分别为1.9、2.0、2.2、2.6、2.3 mg/mL的混合对照品溶液,置于4 °C冰箱内保存,备用。

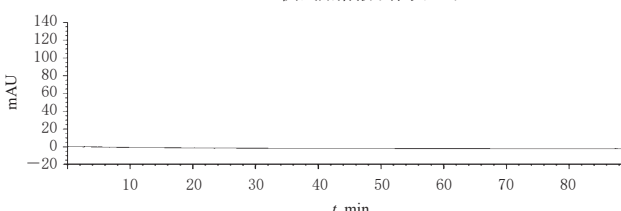
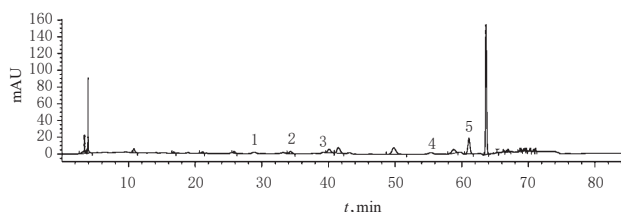
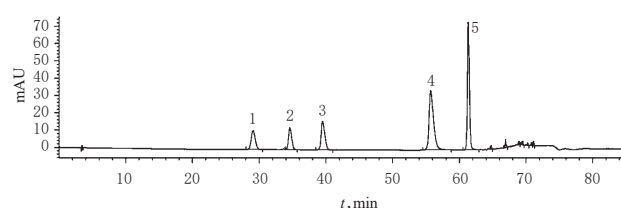
2.1.2 饮片供试品溶液 分别取生/醋延胡索饮片适量,粉碎,过四号筛,取粉末约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入70%乙醇25 mL,称定质量,超声处理45 min,取出,冷却至室温,再次称定质量,用70%乙醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液作为饮片供试品溶液。

2.1.3 配方颗粒供试品溶液 取生/醋延胡索配方颗粒适量,研细,过四号筛,取粉末约0.45 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入70%乙醇100 mL,称定质量,超声处理45 min,取出,冷却至室温,再次称定质量,用70%乙醇补足失质量,摇匀,滤过,取续滤液作为配方颗粒供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~15 min,5% B→25% B;15~30 min,25% B→27% B;30~45 min,27% B→30% B,45~55 min,30% B→31% B;55~60 min,31% B→45% B;60~65 min,45% B→95% B;65~70 min,95% B;70~75 min,95% B→5% B;75~85 min,5% B);流速:1.0 mL/min;柱温:30 °C;检测波长:280 nm;进样量:10 μL。分别精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液、“2.2”项下供试品溶液(生延胡索饮片,编号:A3)和阴性对照溶液(70%乙醇溶液)各10 μL,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1

可见,5个待测生物碱成分均基线分离,相邻峰间的分离度均大于1.5,且阴性对照溶液无干扰,表明该方法专属性较好。



注:1.原阿片碱;2.延胡索乙素;3.延胡索甲素;4.盐酸小檗碱;5.盐酸巴马汀

Note: 1. protopine; 2. tetrahydropalmatine; 3. corydaline; 4. berberine hydrochloride; 5. palmatine hydrochloride

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3 指纹谱图的建立

2.3.1 精密度试验 精密称取同一批生延胡索饮片粉末(编号:A3)约0.5 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以盐酸巴马汀(峰5)作为参照,计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于1.50%(n=6),表明

该方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密称取同一批生延胡索饮片粉末(编号:A3)约0.5 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以盐酸巴马汀(峰5)作为参照,计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于1.50% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 分别精密称取同一批生延胡索饮片粉末(编号:A3)6份,每份约0.5 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以盐酸巴马汀(峰5)作为参照,计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于1.50% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.4 HPLC 指纹图谱生成及共有峰指认 取41批生/醋延胡索饮片及配方颗粒适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》^[19],分别以A1、B1、C1、D1为参照样品,设置时间窗宽度为0.2 min,图谱间距为50,通过多点校正及自动峰匹配生成叠加指纹图谱,采用中位数法生成生/醋延胡索饮片和配方颗粒样品的对照指纹图谱(R),详见图2。在上述指纹图谱中,分别确定了共有峰12个(生延胡索饮片)、20个(生延胡索配方颗粒)、14个(醋延胡索饮片)、16个(醋延胡索配方颗粒)。通过与对照品(见图1A)比对,指认了其中5个色谱峰,即峰1、2、3、4、5分别为原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀。

2.3.5 HPLC 指纹图谱相似度分析 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》^[20]对41批生/醋延胡索饮片及配方颗粒的HPLC指纹图谱以及对照指纹图谱(R)进行相似度评价。结果,11批生延胡索饮片的相似度为0.529~0.981,7批生延胡索配方颗粒的相似度为0.342~0.985,12批醋延胡索饮片的相似度为0.711~0.999,11批醋延胡索配方颗粒的相似度为0.437~0.998。可见,不同产地及批次的生/醋延胡索饮片及颗粒指纹图谱相似度有所差异,详见表2~表5。综合“2.3.4”项下共有峰指认情况发现,延胡索饮片经过醋制后成分谱有明显变化;制成颗粒后,成分谱也有明显增加的趋势,可能与浓缩、干燥、制粒等产地加工工艺不同有关。

2.4 含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液适量,加甲醇逐级稀释,制成原阿片碱质量浓度分别为1.9、3.8、9.5、19.0、38.0 $\mu\text{g/mL}$,延胡索乙素质量浓度分别为2.0、4.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$,延胡索甲素浓

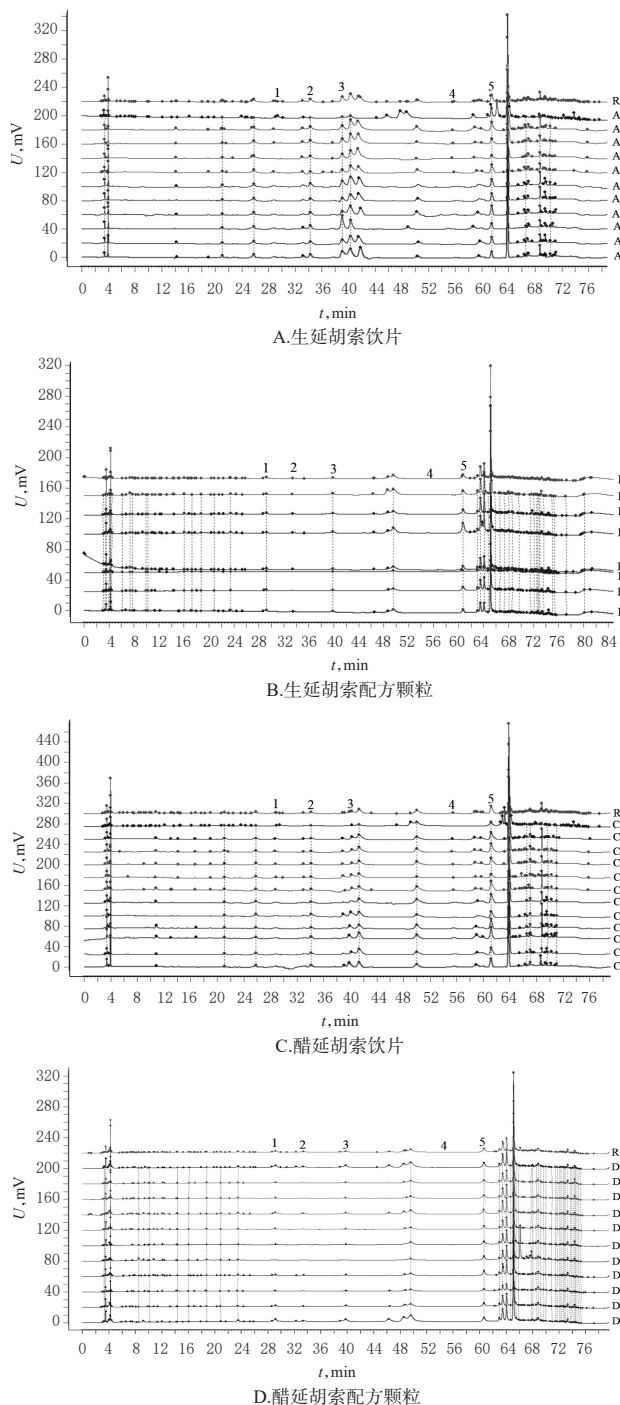


图2 HPLC 指纹图谱共有模式和对照指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprint common mode and control fingerprint

度分别为2.2、4.4、11.0、22.0、44.0 $\mu\text{g/mL}$,盐酸小檗碱质量浓度分别为2.6、5.2、13.0、26.0、52.0 $\mu\text{g/mL}$,盐酸巴马汀质量浓度分别为2.3、4.6、11.5、23.0、46.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度为横坐标($x, \mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析,结果见表6。

2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液,用甲醇稀释后,按“2.2”项下色谱条件连续测定6次,

表2 生延胡索饮片 HPLC 指纹图谱的相似度分析结果

Tab 2 Similarity analysis results of HPLC fingerprint of crude *C. yanhusuo* decoction pieces

编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
A1	1.000	0.835	0.834	0.903	0.827	0.834	0.825	0.666	0.769	0.773	0.638
A2	0.835	1.000	0.858	0.867	0.975	0.889	0.959	0.845	0.933	0.921	0.706
A3	0.834	0.858	1.000	0.843	0.859	0.891	0.847	0.730	0.817	0.829	0.679
A4	0.903	0.867	0.843	1.000	0.886	0.890	0.888	0.700	0.844	0.862	0.717
A5	0.827	0.975	0.859	0.886	1.000	0.904	0.983	0.864	0.957	0.943	0.728
A6	0.834	0.889	0.891	0.890	0.904	1.000	0.891	0.717	0.844	0.845	0.709
A7	0.825	0.959	0.847	0.888	0.983	0.891	1.000	0.862	0.952	0.942	0.718
A8	0.666	0.845	0.730	0.700	0.864	0.717	0.862	1.000	0.959	0.946	0.529
A9	0.769	0.933	0.817	0.844	0.957	0.844	0.952	0.959	1.000	0.989	0.659
A10	0.773	0.921	0.829	0.862	0.943	0.845	0.942	0.946	0.989	1.000	0.651
A11	0.638	0.706	0.679	0.717	0.728	0.709	0.718	0.529	0.659	0.651	1.000
R	0.878	0.967	0.906	0.926	0.981	0.928	0.976	0.884	0.967	0.966	0.719

表3 生延胡索配方颗粒 HPLC 指纹图谱的相似度分析结果

Tab 3 Similarity analysis results of HPLC fingerprint of crude *C. yanhusuo* dispensing granules

编号	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
B1	1.000	0.513	0.933	0.981	0.922	0.963	0.650
B2	0.513	1.000	0.342	0.568	0.655	0.597	0.739
B3	0.933	0.342	1.000	0.902	0.795	0.876	0.419
B4	0.981	0.568	0.902	1.000	0.964	0.977	0.727
B5	0.922	0.655	0.795	0.964	1.000	0.961	0.844
B6	0.963	0.597	0.876	0.977	0.961	1.000	0.748
B7	0.650	0.739	0.419	0.727	0.844	0.748	1.000
R	0.940	0.720	0.817	0.971	0.985	0.974	0.843

表4 醋延胡索饮片 HPLC 指纹图谱的相似度分析结果

Tab 4 Similarity analysis results of HPLC fingerprint of vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces

编号	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
C1	1.000	0.963	0.989	0.986	0.948	0.960	0.966	0.869	0.968	0.967	0.968	0.823
C2	0.963	1.000	0.971	0.965	0.956	0.985	0.950	0.857	0.969	0.970	0.970	0.821
C3	0.989	0.971	1.000	0.993	0.954	0.968	0.975	0.865	0.977	0.978	0.977	0.834
C4	0.986	0.965	0.993	1.000	0.956	0.973	0.978	0.859	0.978	0.974	0.972	0.833
C5	0.948	0.956	0.954	0.956	1.000	0.955	0.951	0.884	0.957	0.957	0.955	0.810
C6	0.960	0.985	0.968	0.973	0.955	1.000	0.962	0.852	0.969	0.965	0.964	0.828
C7	0.966	0.950	0.975	0.978	0.951	0.962	1.000	0.911	0.977	0.981	0.979	0.822
C8	0.869	0.857	0.865	0.859	0.884	0.852	0.911	1.000	0.877	0.901	0.904	0.711
C9	0.968	0.969	0.977	0.978	0.957	0.969	0.977	0.877	1.000	0.996	0.994	0.836
C10	0.967	0.970	0.978	0.974	0.957	0.965	0.981	0.901	0.996	1.000	0.999	0.831
C11	0.968	0.970	0.977	0.972	0.955	0.964	0.979	0.904	0.994	0.999	1.000	0.830
C12	0.823	0.821	0.834	0.833	0.810	0.828	0.822	0.711	0.836	0.831	0.830	1.000
R	0.984	0.982	0.990	0.989	0.971	0.982	0.987	0.900	0.992	0.993	0.993	0.837

记录峰面积。结果,原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 1.56%、1.28%、0.78%、1.49%、1.95% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批生延胡索饮片粉末(编号:A3)约 0.5 g,共 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面

表5 醋延胡索配方颗粒 HPLC 指纹图谱的相似度分析结果

Tab 5 Similarity analysis results of HPLC fingerprint of vinegar-processed *C. yanhusuo* dispensing granules

编号	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
D1	1.000	0.676	0.473	0.684	0.824	0.934	0.930	0.753	0.661	0.643	0.808
D2	0.676	1.000	0.959	0.987	0.624	0.681	0.695	0.978	0.975	0.974	0.963
D3	0.473	0.959	1.000	0.940	0.437	0.466	0.477	0.913	0.928	0.937	0.883
D4	0.684	0.987	0.940	1.000	0.656	0.706	0.716	0.974	0.975	0.972	0.958
D5	0.824	0.624	0.437	0.656	1.000	0.854	0.865	0.665	0.614	0.590	0.687
D6	0.934	0.681	0.466	0.706	0.854	1.000	0.987	0.752	0.712	0.686	0.771
D7	0.930	0.695	0.477	0.716	0.865	0.987	1.000	0.751	0.708	0.681	0.770
D8	0.753	0.978	0.913	0.974	0.665	0.752	0.751	1.000	0.982	0.982	0.985
D9	0.661	0.975	0.928	0.975	0.614	0.712	0.708	0.982	1.000	0.998	0.953
D10	0.643	0.974	0.937	0.972	0.590	0.686	0.681	0.982	0.998	1.000	0.951
D11	0.808	0.963	0.883	0.958	0.687	0.771	0.770	0.985	0.953	0.951	1.000
R	0.823	0.966	0.868	0.970	0.758	0.834	0.837	0.986	0.965	0.958	0.984

表6 线性关系考察结果

Tab 6 Investigation results of linear relationship

成分	回归方程	R^2	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
原阿片碱	$y=11\ 691.50x+7.630\ 0$	0.999 9	1.9~38.0
延胡索乙素	$y=13\ 551.948\ 6x-7.909\ 6$	0.999 1	2.0~40.0
延胡索甲素	$y=15\ 554.436\ 2x+10.552\ 6$	0.999 5	2.2~44.0
盐酸小檗碱	$y=39\ 987.893\ 9x+13.564\ 0$	0.999 6	2.6~52.0
盐酸巴马汀	$y=36\ 760.489\ 2x+20.820\ 6$	0.999 7	2.3~46.0

积并按外标法计算原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的含量。结果,原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀含量的 RSD 分别为 1.00%、0.38%、1.72%、1.38%、0.96% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 精密称取同一批生延胡索饮片粉末(编号:A3)约 0.5 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 1.44%、0.59%、1.62%、1.50%、1.13% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的生延胡索饮片粉末(编号:A3)0.25 g,共 9 份,分别按已知量的 50%、100%、150% 加入原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品,每个浓度 3 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的平均加样回收率分别为 100.12%、100.70%、100.98%、100.75%、100.98%,RSD 分别为 1.70%、1.57%、1.90%、1.26%、1.05% ($n=9$),表明该方法准确度良好。

2.4.6 耐用性考察 取同一批生延胡索饮片粉末(编号:A3)约0.5 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件分别以Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Daisogel-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量。结果,原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀在3种色谱柱上测得含量的RSD分别为0.70%、0.41%、1.10%、0.86%、1.21%(n=3),表明本方法耐用性良好。

2.4.7 样品含量测定 取11批生延胡索饮片、7批生延胡索配方颗粒、12批醋延胡索饮片和11批醋延胡索配方颗粒样品适量,分别按“2.1.2”“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量。结果,11批生延胡索饮片、7批生延胡索配方颗粒、12批醋延胡索饮片、11批醋延胡索配方颗粒中5种生物碱成分的平均含量分别为0.24~0.46、0.37~0.82、0.24~0.58、0.07~0.75、0.24~0.76 mg/g, RSD分别为12.27%~52.68%、12.55%~49.12%、39.60%~60.56%、26.71%~147.48%,表明不同产地和批次饮片及配方颗粒含量差异较大,详见表7~表10。

表7 11批生延胡索饮片中5种生物碱成分的含量(mg/g)

Tab 7 Contents of 5 alkaloids in 11 batches of crude *C. yanhusuo* decoction pieces(mg/g)

编号	原阿片碱	延胡索乙素	延胡索甲素	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀
A1	0.30	0.80	0.92	0.06	0.22
A2	0.21	0.46	0.58	0.04	0.21
A3	0.33	0.77	0.59	0.14	0.27
A4	0.31	0.56	0.54	0.08	0.36
A5	0.19	0.38	0.35	0.05	0.22
A6	0.22	0.63	0.74	0.06	0.25
A7	0.21	0.37	0.38	0.05	0.28
A8	0.02	0.42	0.63	0.03	0.12
A9	0.13	0.42	0.47	0.03	0.19
A10	0.19	0.45	0.73	0.05	0.34
A11	0.25	0.43	0.44	0.15	0.17
平均值	0.24	0.54	0.58	0.07	0.24
RSD, %	28.80	29.78	29.52	52.68	12.27

3 讨论

本研究采用HPLC法对41批生/醋延胡索饮片及配方颗粒进行了指纹图谱研究,同时对生/醋延胡索饮片及配方颗粒中原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀5种生物碱成分进行了含量测定。指纹图谱分析结果显示,延胡索饮片经醋制加工后主要化学成分个数有所变化,且将饮片制成配方颗粒后主要化学成分个数明显增加,这说明延胡索饮片在浓缩、干燥、制粒过程中,化学成分受到了一定影响。相似度评价结果显示,不同产地及批次的生/醋延胡索饮片及配方颗粒

表8 7批生延胡索配方颗粒中5种生物碱成分的含量(mg/g)

Tab 8 Contents of 5 alkaloids in 7 batches of crude *C. yanhusuo* dispensing granules(mg/g)

编号	原阿片碱	延胡索乙素	延胡索甲素	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀
B1	0.49	1.24	0.36	0.73	0.73
B2	0.38	0.68	0.15	0.77	0.87
B3	0.14	0.16	0.04	0.38	0.45
B4	0.54	1.08	0.33	0.84	0.86
B5	0.65	1.43	0.34	1.11	1.26
B6	0.46	1.00	0.21	0.70	1.62
B7	0.44	1.00	0.22	0.71	1.63
平均值	0.46	0.78	0.24	0.75	0.25
RSD, %	12.55	48.24	49.12	29.00	30.39

表9 12批醋延胡索饮片中5种生物碱成分的含量(mg/g)

Tab 9 Contents of 5 alkaloids in 12 batches of vinegar-processed *C. yanhusuo* decoction pieces(mg/g)

编号	原阿片碱	延胡索乙素	延胡索甲素	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀
C1	0.46	0.90	0.39	0.13	0.46
C2	0.22	0.31	0.21	0.07	0.30
C3	0.46	0.47	0.22	0.13	0.60
C4	0.36	0.36	0.17	0.12	0.53
C5	0.22	0.52	0.47	0.05	0.01
C6	0.28	0.32	0.16	0.11	0.41
C7	0.29	0.30	0.14	0.10	0.46
C8	0.15	0.26	0.53	0.04	0.18
C9	0.22	0.29	0.13	0.07	0.35
C10	0.22	0.25	0.15	0.09	0.43
C11	0.21	0.22	0.13	0.07	0.38
C12	0.14	0.27	0.14	0.19	0.24
平均值	0.27	0.37	0.24	0.10	0.36
RSD, %	39.60	50.84	60.56	41.63	44.62

表10 11批醋延胡索配方颗粒中5种生物碱成分的含量(mg/g)

Tab 10 Contents of 5 alkaloids in 11 batches of vinegar-processed *C. yanhusuo* dispensing granules(mg/g)

编号	原阿片碱	延胡索乙素	延胡索甲素	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀
D1	0.77	1.95	1.56	0.94	1.01
D2	0.39	0.77	0.01	0.75	0.82
D3	0.12	0.24	0.15	0.45	0.49
D4	0.44	0.62	0.17	0.49	0.93
D5	0.23	0.17	0.01	0.39	0.90
D6	0.23	0.61	0.06	0.60	0.64
D7	0.24	0.48	0.09	0.47	0.54
D8	0.48	1.27	0.71	0.78	0.83
D9	0.28	0.64	0.06	0.57	0.61
D10	0.26	0.57	0.08	0.55	0.56
D11	0.70	1.66	1.43	0.97	1.08
平均值	0.38	0.82	0.39	0.63	0.76
RSD, %	54.60	69.57	147.48	31.40	26.71

指纹图谱的相似度有所差异。5种生物碱含量测定结果显示,醋延胡索饮片中阿片碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀含量高于生延胡索饮片,延胡索乙素、延胡索甲素含量低于生延胡索饮片,表明延胡索经醋制后其化学成分或其存在形式均发生了变化^[20],且醋制还可能增加了部分生物碱成分的溶出度^[21]。在生延胡索配方颗粒中,原阿片碱、延胡索乙素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀含量均高于生延胡索饮片,仅延胡索甲素含量低于生延胡索饮片,表明生延胡索饮片提取浓缩制成颗粒后大部分有效成分的含量有所增加。在醋延胡索配方颗粒中,5种生物碱含量普遍高于醋延胡索饮片,均表明提取浓缩制成颗粒后,药效更佳。中药配方颗粒剂具有免煎煮、服用便捷、起效迅速,且工艺先进、利于贮存等优势,更加顺应现代社会对药物的基本要求。

综上所述,本研究成功建立了生/醋延胡索饮片及配方颗粒的指纹图谱和原阿片碱、延胡索乙素、延胡索甲素、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀5种生物碱含量的测定方法。结果表明,生/醋延胡索饮片及配方颗粒指纹图谱相似度不一,且其中上述5种生物碱含量差异较大。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:139-140.

[2] 张斐妹,蔡舒婷,舒忻,等. 中药配方颗粒的临床运用概况与未来趋势[J]. 中国医药导报,2016,13(16):70-73.

[3] 魏梅,杜兰哲,李慧,等. 醋延胡索饮片、水煎液、配方颗粒高效液相色谱特征图谱相关性研究[J]. 中药材,2015,38(5):1066-1069.

[4] 刘俊宏,王金玲,杨德辉,等. 中药配方颗粒研究现状[J]. 特产研究,2019,41(4):124-127.

[5] 冯自立,赵正栋,刘建欣. 延胡索化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(11):2000-2008.

[6] 李凤琴,周琼,马林,等. 延胡索化学成分的分离和结构鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):211-216.

[7] 王栋. 醋制延胡索和黄茶的化学成分研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2019.

[8] DING B, ZHOU T, FAN G, et al. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2007, 45(2): 219-226.

[9] LI T, WANG S, MENG X, et al. Metabolomics coupled

with multivariate data and pathway analysis on potential biomarkers in gastric ulcer and intervention effects of *Corydalis yanhusuo* alkaloid[J]. *PLoS One*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0082499.

[10] WU H, WALDBAUER K, TANG L, et al. Influence of vinegar and wine processing on the alkaloid content and composition of the traditional Chinese medicine *Corydalis Rhizoma*[J]. *Molecules*, 2014. DOI: 10.3390/molecules-190811487.

[11] 余守洋,白威峰,涂平,等. 延胡索及其有效成分抗吗啡成瘾多巴胺系统作用机制研究和效果比较[J]. 中国中药杂志,2016,41(19):3643-3648.

[12] 李艳红. 原阿片碱的临床应用分析[J/CD]. 世界最新医学信息文摘:电子版,2014,14(9):113,120.

[13] 张铁军,许浚,韩彦琪,等. 中药质量标志物(Q-marker)研究:延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药,2016,47(9):1458-1467.

[14] 吴炎,李想,石海莲. 盐酸小檗碱与吴茱萸联用抑制乳腺癌转移的作用机制[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(12):1165-1168.

[15] LONG J, SONG J, ZHONG L, et al. Palmatine: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. *Biochimie*, 2019. DOI:10.1016/j.biochi.2019.04.008.

[16] 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.

[17] 林家寿. 高效液相色谱法测定延胡素中延胡索乙素、延胡索丙素、小檗碱的含量及不同炮制品稳定性研究[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(3):348-351.

[18] 彭丽华,赖智填,成金乐,等. 基于HPLC指纹图谱的中药破壁饮片质量评价[J]. 中国现代中药,2016,18(9):1230-1232.

[19] 邓李红,张志鹏,田清清,等. 吴茱萸和制吴茱萸的饮片、水煎液、配方颗粒UPLC特征图谱研究[J]. 中国药房,2020,31(14):1739-1745.

[20] 陈磊,夏星,何博赛,等. 近5年国家自然科学基金中药炮制学科资助与结题项目情况分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(9):1639-1643.

[21] 李倩,辛义周. 延胡索炮制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(6):589-592.

(收稿日期:2020-06-03 修回日期:2020-09-07)

(编辑:邹丽娟)