

黄连黄柏提取液中3种生物碱的原位生成 离子液体微萃取及HPLC测定

曹玺珉* 吴昊 张晋 刘霞 杜黎明

(山西师范大学分析测试中心 临汾 041004)

摘要 通过加入水溶性离子液体 $[C_6MIM][Br]$ 和离子对试剂 $NaPF_6$ 在黄连和黄柏的提取液中,原位生成非水溶性离子液体 $[C_6MIM][PF_6]$ 萃取其生物碱,离心分相后,用HPLC测离子液体相中的生物碱小檗碱、巴马汀和黄连碱,其线性相关系数分别为0.9998、0.9996和0.9997,线性范围为1~2000 $\mu g/L$,检出限皆为0.5 $\mu g/L$,加标回收率96.52%~104.34%。这种方法可用于黄连和黄柏中的小檗碱、巴马汀和黄连碱的检测。

关键词 生物碱,离子液体,原位溶剂生成微萃取,高效液相色谱

中图分类号:O629.3

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)12-1489-05

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.30296

离子液体(ILs)独特的物理和化学特性使其获得了广泛应用^[1-3]。作为“绿色溶剂”,离子液体在天然产物的提取分离中也显示出良好的应用前景^[4-7]。与其它微萃取法相比,离子液体原位溶剂生成微萃取(ISFME)^[7-11]不需要加热、超声以及冷却等操作,不仅可实现热不稳定性化合物的萃取分离,还可缩短萃取时间和节约能源,是一种非水溶性离子液体的生成、分散和萃取分相原位同步完成的微萃取分离技术,不需要另加扩散剂,使萃取过程更快速和环保。本研究小组率先将离子液体原位生成微萃取法应用于生物碱的萃取分离,结合高效液相色谱建立了高灵敏度测定中草药博落回和白屈菜中血根碱以及白屈菜红碱的分析方法^[7]。小檗碱(Berberine, BER)、巴马汀(Palmatine, PAL)和黄连碱(Coptisine, COP)均为天然异喹啉类生物碱,具有广谱药理学活性,是黄连(*Rhizoma coptidis*)和黄柏(*Cortex phellodendri*)的主要活性成分。本文将原位生成离子液体微萃取方法用于中草药有效成分的分离前处理中,再与高效液相色谱紫外检测相结合测定了黄连和黄柏中的小檗碱、巴马汀和黄连碱,优化了离子液体生成萃取的实验参数,可用于实际样品中这3种生物碱的准确测定。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱系统由1525泵和2489紫外可见检测器组成。采用Breeze 2软件来控制仪器和采集数据。Gemini C_{18} 柱(5 μm ; 4.6 mm \times 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)。Model pHs-3C型酸度计(上海天达仪器有限公司);TDZ4-WS型离心机(湘仪离心机仪器有限公司);SHA-B型水浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司)。小檗碱、巴马汀和黄连碱(色谱纯,成都曼斯特生物科技有限公司),标准储备液浓度为1000 mg/L(甲醇配制);十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS; Acros Organics, 纯度为99%);离子液体溴化1-己基-3-甲基咪唑(1-hexyl-3-methylimidazolium bromide, $[C_6MIM][Br]$)、氯化1-己基-3-甲基咪唑(1-hexyl-3-methylimidazolium chloride, $[C_6MIM][Cl]$)、氯化1-辛基-3-甲基咪唑(1-octyl-3-methylimidazolium chloride, $[C_8MIM][Cl]$)和溴化1-辛基-3-甲基咪唑(1-octyl-3-methylimidazolium bromide, $[C_8MIM][Br]$)(上海成捷化学有限公司);乙腈(色谱纯,天津市光复化工研究所);实验用水由密立根超纯水系统制备。其它试剂均为分析纯。中草药黄连和黄柏购于

本地药店。

1.2 实验方法

将黄连和黄柏药材粉碎至粒径不大于 $75\ \mu\text{m}$ 后,分别取 $5\ \text{mg}$ 在烧杯中,用 $10\ \text{mL}$ $0.1\ \text{mol/L}$ 盐酸溶液沸水浴中提取 $60\ \text{min}$,将其通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的过滤膜,收集滤液,用 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 值为 2.0 后,用水定容为 $10\ \text{mL}$ 。

准确移取 $5\ \text{mL}$ 样品溶液或标准工作溶液至 $10\ \text{mL}$ 离心试管中,用 $100\ \mu\text{L}$ 注射器向其加入 $70\ \mu\text{L}$ 离子液体,震荡混匀,使其完全溶解到水溶液中。然后加入 $40\ \text{mg}$ NaPF_6 震荡,使 NaPF_6 溶解,同时澄清溶液很快变为浑浊液。将其在室温放置 $3\ \text{min}$ 后,置离心机上以 $3500\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$,用吸管小心吸除上层水溶液后,向离心管底部的离子液体富集相中加入甲醇,混合均匀后使总体积为 $50\ \mu\text{L}$ 。用微量进样器将 $10\ \mu\text{L}$ 该溶液注入到高效液相色谱仪进行分离测定。所有试验均重复 3 次。微量进样器每次均经甲醇、乙腈和丙酮洗涤多次以消除分析物和离子液体残留对测定的影响。

色谱柱温为 $25\ ^\circ\text{C}$;流动相 A 为 0.1% 磷酸和 0.02% SDS 水溶液,用三乙胺调节 $\text{pH} = 3.0$;流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序为 $0 \sim 15\ \text{min}$, $30\% \sim 40\%$ B; $15 \sim 25\ \text{min}$, $40\% \sim 50\%$ B;紫外检测波长 $345\ \text{nm}$ 。

2 结果与讨论

2.1 萃取分离条件的选择

优化萃取条件时用浓度均为 $10\ \mu\text{g/L}$ 的 3 种生物碱的混合标准工作液进行分析测定。

2.1.1 离子液体的选择 原位生成的非水溶性离子液体微萃取是由水溶性离子液体与离子对试剂在溶液中原位反应而成。要求所生成的非水溶性离子液体具有良好的色谱行为,对被分析物具有优良的萃取能力,其密度比水大以便离心分相。本文比较 4 种水溶性离子液体 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Cl}]$ 、 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ 、 $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{Cl}]$ 和 $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{Br}]$ 与 NaPF_6 生成非水溶性离子液体对萃取分离的影响。结果表明, $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{Cl}]$ 和 $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{Br}]$ 虽然均能生成非水溶性离子液体,但萃取后的色谱分离效果不好。而 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ 不但能够萃取这 3 种生物碱而且色谱分离效果好。 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ 的萃取率高于 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Cl}]$,因此选用 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ 作为水溶性离子液体。

2.1.2 NaPF_6 用量的确定 向已知浓度的生物碱对照品溶液中加入离子液体 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ $70\ \mu\text{L}$,测定加入 NaPF_6 量对生物碱萃取回收率的影响,结果见图 1。当 NaPF_6 加入后溶液中生成了 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$,并且随着加入量的增加 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ 的体积也增大,萃取回收率也升高。当 NaPF_6 用量增大至 $40\ \text{mg}$ 后,萃取率达到最大,继续增大用量萃取率不再变化。因此,确定 NaPF_6 的用量为 $40\ \text{mg}$ 。

2.1.3 离子液体体积的确定 因 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ 的用量决定所生成萃取剂 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ 的量。为考察最适离子体积,固定 NaPF_6 的用量为 $40\ \text{mg}$,考察 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ 体积对生物碱回收率的影响,结果见图 2。从图 2 可见,随着离子液体体积的增大,萃取率不断增大,当离子液体体积为 $70\ \mu\text{L}$ 时,萃取率达到最大,且继续增大用量萃取率变化很小,因此,确定 $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$ 的体积为 $70\ \mu\text{L}$ 。

2.1.4 样品溶液 pH 值的确定 溶液的 pH 值会影响被分析物的存在形式,从而影响萃取剂对其的萃取分离。为此,分别用 HCl 和 NaOH 溶液调节溶液的 pH 值为 $1.0 \sim 12.0$,考察溶液 pH 值对萃取结果的影响,结果如图 3 所示。当 pH 值为 2.0 时萃取剂对这 3 种成份的萃取率最大。当酸碱度增大或减小时萃取率减小,所以最终确定溶液的 $\text{pH} = 2.0$ 。

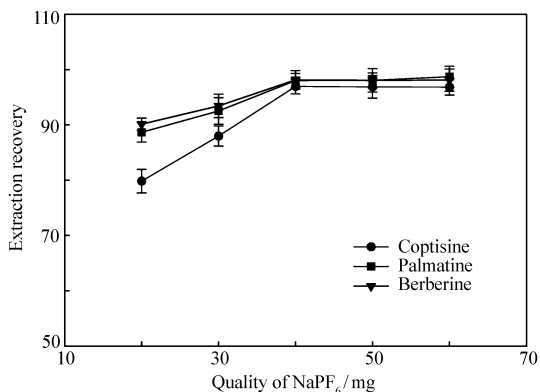


图1 NaPF_6 用量对生物碱萃取回收率的影响

Fig. 1 Effect of amount of NaPF_6 on extraction recovery of alkaloids

Experiment conditions: concentration of drugs, $10\ \mu\text{g/L}$; $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Br}]$, $70\ \mu\text{L}$; $\text{pH} = 2.0$; extraction time; $3\ \text{min}$; centrifugation time; $10\ \text{min}$

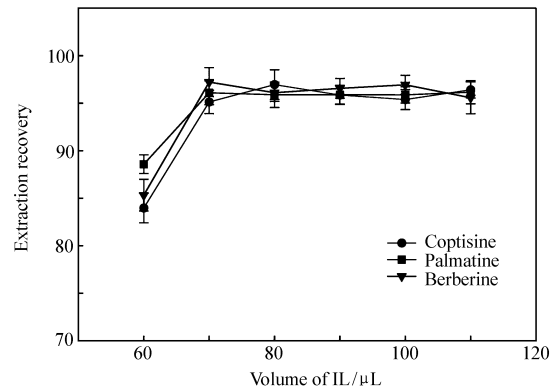


图 2 IL 体积对生物碱萃取回收率的影响

Fig. 2 Effect of the volume of [C₆MIM][Br] on extraction recovery of alkaloids

Experiment conditions: concentration of drugs, 10 μg/L; NaPF₆, 40 mg; pH=2.0; extraction time, 3 min; centrifugation time, 10 min

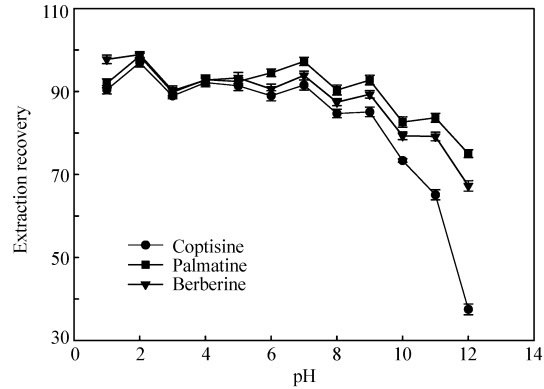


图 3 溶液 pH 值对生物碱萃取回收率的影响

Fig. 3 Effect of the sample pH on extraction recovery of alkaloids

Experiment conditions: concentration of drugs, 10 μg/L; [C₆MIM][Br], 70 μL; NaPF₆, 40 mg; extraction time, 3 min; centrifugation time, 10 min

2.1.5 萃取时间的选择 非水溶性离子液体能够在室温下原位生成,所以萃取平衡的温度确定为室温。本实验中萃取时间定义为离子对试剂 NaPF₆加入后生成浑浊液到离心分离之前的振荡混合时间。比较萃取时间在 0~10 min,实验发现,萃取时间对萃取率影响不大,萃取时间超过 3 min 后萃取率保持稳定,所以萃取时间选为 3 min。

2.1.6 离心时间的选择 离心控制着相分离过程,是一个关键步骤。当分离时间超过 10 min 萃取率保持不变,说明离子液体相已完全转移到离心试管的底部,因此,离心时间确定为 10 min。

2.2 分析方法考察

取 3 种生物碱的标准储备液,经稀释后配制一系列浓度的混合标准工作液,按照上述最佳萃取条件以及色谱条件进行分析,测定其线性范围、精密度和检出限等参数,结果见表 1。精密度是通过重复 6 次萃取测定浓度为 10 μg/L 标准溶液而得,以 3 倍的信噪比对应的药物浓度作为最低检出限(LOD)。

表 1 3 种生物碱的线性范围和检出限					
Table 1 Results of regression analysis on linear ranges and detection limits of three alkaloids					
Analyte	Linearity range/(μg·L ⁻¹)	R ²	Precision RSD/% (n=6)	Enrichment factor	LOD/(μg·L ⁻¹)
BER	1~2 000	0.999 8	1.24	98.9	0.5
PAL	1~2 000	0.999 6	1.61	98.5	0.5
COP	1~2 000	0.999 7	1.45	97.0	0.5

表 2 列出检测这 3 种生物碱各种方法的线性参数。与文献^[12-18]报道的方法相比,该方法有如下优

表 2 方法的线性和检出限比较							
Table 2 Comparison Linearity and LOD with other methods							
Technique	Linear range/(μg·L ⁻¹)			LOD/(μg·L ⁻¹)			Reference
	BER	PAL	COP	BER	PAL	COP	
HPLC-UV	50~50 000	—	—	10.0	—	—	[12]
HPLC-DAD	100 000~880 000	12 500~300 000	13 500~270 000	104	113	143	[13]
HPLC-MS-MS	1.0~250	1.0~250	—	1.0	1.0	—	[14]
HPLC-MS-MS	—	0.1~500	—	—	0.1	—	[15]
LC-ESI-MS	0.31~20	0.31~20	0.31~20	0.31	0.31	0.31	[16]
UPLC-PDA	322~96 600	375~12 500	—	60	75	—	[17]
UPLC-MS/MS	6.45~645	4.5~450	—	1.2	1.5	—	[17]
Sweeping-CE	10~50	10~50	10~50	2.5	2.5	2.5	[18]
IL-ISFME-HPLC	0.25~2 000	0.25~2 000	0.25~2 000	0.5	0.5	0.5	This work

点:萃取回收率高,用普通的高效液相色谱仪测定得到了较低的检出限,检测成本低;用离子液体代替有机溶剂为萃取剂安全、环保;萃取过程简单、易行、快速;离子液体用量少,实验成本低。

2.3 样品的分析检测

将该方法用于中草药黄连和黄柏提取液中小檗碱、巴马汀和黄连碱的分离检测。药材提取液及经离子液体萃取后的色谱图见图4。药材提取液中3种生物碱的检测值及加标回收率结果见表3。由表3可见,加标回收率为96.52%~104.34%。

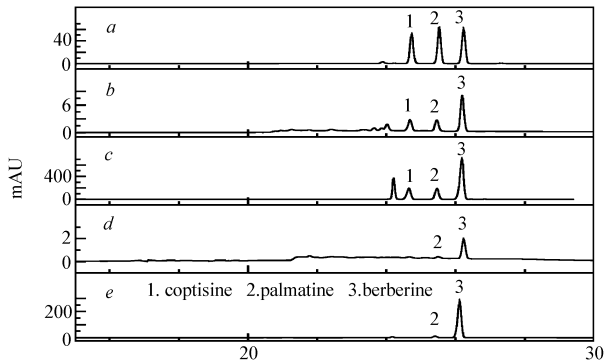


图4 3种生物碱的液相色谱图

Fig. 4 Typical chromatograms for determination of three alkaloids in Rhizoma coptidis and Cortex phellodendri
a. standard solution; b, c. Rhizoma coptidis sample solution before and after IL-ISFME; d, e. cortex phellodendri before and after IL-ISFME

表3 样品测定结果及回收率

Table 3 Analytical results of samples and recovery(%) for this method(n=5)

Sample	Base value/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			Quantity added/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			Recovery/%		
	BER	PAL	COP	BER	PAL	COP	BER	PAL	COP
Rhizoma coptidis	1 406.3	356.4	457.9	400	350	450	99.12 \pm 2.01	98.45 \pm 1.64	104.34 \pm 1.99
Cortex phellodendri	534.9	20.5	—	500	20	10	103.22 \pm 1.03	99.03 \pm 1.96	96.52 \pm 2.03

3 结 论

实验结果表明,用水溶性离子液体[C_6MIM][Br]和离子对试剂 NaPF_6 在样品水溶液中原位生成非水溶性离子液体微萃取法分离富集,再用高效液相色谱紫外检测分析,实现了对中草药提取液中小檗碱、巴马汀和黄连碱的检测。这种方法具有较宽的线性范围和较高的灵敏度,回收率高、富集因子大,具有操作简便和环保的优点。将其用于中草药黄连和黄柏中3种生物碱的测定取得了满意结果。

参 考 文 献

[1] Holbrey J D, Seddon K R. Ionic liquids[J]. *Clean Prod Processes*, 1999, 1(4): 223-236.
[2] Gutowski E K, Broker A G, Rogers D R, et al. Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-miscible Ionic Liquids and Water-structuring Salt for Recycle, Metathesis and Separations[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6632-6633.
[3] WANG Qiang, LIANG Hongze, BAO Weiliang. Preparation of Task-specific Ionic Liquids and Their Application in Organic Synthesis[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2007, 24(2): 117-122 (in Chinese).
王强, 梁洪泽, 包伟良. 功能化离子液体的制备及其在合成中的应用[J]. *应用化学*, 2007, 24(2): 117-122.
[4] Huddleston J G, Willauer H D, Swatoski R P, et al. Temperature Ionic Liquids as Novel Media for ‘Clean’ Liquid-Liquid Extraction[J]. *Chem Commun*, 1998, 16: 1765-1766.
[5] Poole C F, Poole S K. Extraction of Organic Compounds with Room Temperature Ionic Liquids[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 2268-2286.
[6] GUO Yanyan, YIN Weiping, LIU Pu, et al. Extraction and Separation of Isoflavonoids from Rhynchosia Volubilis Lour Using Ionic Liquid[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2011, 28(5): 537-541 (in Chinese).
郭燕燕, 尹卫平, 刘普, 等. 离子液体提取分离鹿藿中异黄酮化合物[J]. *应用化学*, 2011, 28(5): 537-541.
[7] Wu H, Du L M. Ionic Liquid-Liquid Phase Microextraction for the Sensitive Determination of Sanguinarine and Chelerythrine in Chinese Herbal Medicines and Human Urine[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2012, 35(12): 1662-1675.
[8] Yao C, Anderson J L. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Using an *in situ* Metathesis Reaction to Form an Ionic Liquid Extraction Phase for the Preconcentration of Aromatic Compounds from Water[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395: 1491-1502.

- [9] Mahpishanian S, Shemirani F. Preconcentration Procedure Using *in situ* Solvent Formation Microextraction in the Presence of Ionic Liquid for Cadmium Determination in Saline Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry[J]. *Talanta*, 2010, **82**:471-476.
- [10] Zeeb M, Ganjali M R, Norouzi P, *et al.* Separation and Preconcentration System Based on Microextraction with Ionic Liquid for Determination of Copper in Water and Food Samples by Stopped-flow Injection Spectrofluorimetry[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, **49**:1086-1091.
- [11] Mónica G H, Verónica P, Jared L A, *et al.* A Novel *in situ* Preconcentration Method with Ionic Liquid-based Surfactants Resulting in Enhanced Sensitivity for the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Toasted Cereals[J]. *J Chromatogr A*, 2012, **1227**(3):29-37.
- [12] Tsai Pilo, Tsai Tung hu. Simultaneous Determination of Berberine in Rat Blood, Liver and Bile Using Microdialysis Coupled to High-performance Liquid Chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2002, **961**(1):125-130.
- [13] Yin L H, Lu B N, Qi Y, *et al.* Simultaneous Determination of 11 Active Components in Two Well-known Traditional Chinese Medicines by HPLC Coupled with Diode Array Detection for Quality Control[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, **49**(4):1101-1108.
- [14] Deng Y T, Liao Q F, Li S H, *et al.* Simultaneous Determination of Berberine, Palmatine and Jatrorrhizine by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry in Rat Plasma and Its Application in a Pharmacokinetic Study after Oral Administration of Coptis Evodia Herb Couple[J]. *J Chromatogr B*, 2008, **863**(2):195-205.
- [15] Huang J M, Wang G Q, Jin Y, *et al.* Determination of Palmatine in Canine Plasma by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry with Solid-phase Extraction[J]. *J Chromatogr B*, 2007, **854**:279-285.
- [16] Yu S, Pang X Y, Deng Y X, *et al.* A sensitive and Specific Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Berberine, Palmatine, Coptisine, Epiberberine and Jatrorrhizine from Coptidis Rhizoma in Rat Plasma[J]. *Int J Mass Spectrom*, 2007, **268**:30-37.
- [17] Chen J H, Wang F M, Liu J, *et al.* Analysis of Alkaloids in Coptis Chinensis Franch by Accelerated Solvent Extraction Combined with Ultra Performance Liquid Chromatographic Analysis with Photodiode Array and Tandem Mass Spectrometry Detections[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, **613**(2):184-195.
- [18] Sun S W, Tseng H M. Sensitivity Improvement on Detection of Coptidis Alkaloids by Sweeping in Capillary Electrophoresis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, **37**(1):39-45.

HPLC Determination of Three Alkaloids in *Rhizoma coptidis* and *Cortex phellodend* Microextracted with *in situ* Formed Ionic Liquids

CAO Ximin*, WU Hao, ZHANG Jin, LIU Xia, DU Liming

(Analytical and Testing Center, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract NaPF₆ (as an ion-pairing agent) was added to the extraction solution of *Rhizoma coptidis* and *Cortex phellodend* containing [C₆MIM][Br] (as hydrophilic ionic liquid(IL)). A cloudy solution formed as a result of the formation of fine droplets of [C₆MIM][PF₆]. After centrifugation, the sedimented phase enriched with alkaloids was analyzed by HPLC with UV detection. In this method, several important parameters, such as the type and volume of ILs, the amount of NaPF₆, solution pH, extraction time and centrifugation time, influencing the extraction efficiency of IL-ISFME(*in situ* solvent formation microextraction) were optimized. Under optimal conditions, berberine, palmatine and coptisine exhibit good linearity, with correlation coefficients of 0.9998, 0.9996 and 0.9997, respectively, a linear range of 1 ~ 2000 µg/L and the detection limit of 0.5 µg/L. The spiked recovery for each analyte is in the range of 96.52% ~ 104.34%. The experimental results indicate that the proposed method is successfully applied to the analysis of three alkaloids in *Rhizoma coptidis* and *Cortex phellodend*.

Keywords alkaloids, ionic liquid, *in situ* solvent formation microextraction, high performance liquid chromatography