

5 种小檗属药用植物总生物碱及小檗碱的含量测定

李路扬, 龙妮芳, 万定荣*, 张飞, 丁奇, 梅之南

(中南民族大学药学院, 武汉 430074)

[摘要] 目的: 对 5 种小檗属植物(拟豪猪刺、川鄂小檗、芒齿小檗、湖北小檗、汉源小檗, 均为药材三颗针来源)根和茎中活性物质总生物碱和小檗碱进行研究, 比较 5 种植物根和茎的总生物碱和小檗碱的含量, 为三颗针药材的资源与质量评价提供参考。方法: 分别通过酸性染料比色法和高效液相色谱法进行总生物碱及小檗碱含量测定研究。结果: 5 种植物根和茎的总生物碱含量范围分别为 1.60% ~ 4.72% 和 0.76% ~ 2.70%, 小檗碱的含量范围分别为 0.70% ~ 2.92% 和 0.23% ~ 1.07%。湖北小檗、汉源小檗和拟豪猪刺根的总生物碱及小檗碱的含量均较高, 是优质的三颗针药材来源, 其茎中的总生物碱和小檗碱的含量也较高。结论: 所建立的总生物碱和小檗碱的含量测定方法准确、可行, 为该药材的质量评价提供了可靠方法。

[关键词] 酸性染料比色法; 总生物碱; 小檗碱; 三颗针; 小檗属

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0091-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014170091

Quantitative Determination of Total Alkaloids and Berberine in Five Medicinal *Berberis* Plants

LI Lu-yang, LONG Wei-fang, WAN Ding-rong*, ZHANG Fei, DING Qi, MEI Zhi-nan
(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** The major activity ingredients of *Berberis* plants are alkaloids. To compare the total alkaloids and individual alkaloid (berberine) contents in roots and stems from five origins of *Berberis* plants (*Berberis soulieana* Schneid., *B. henryana* Schneid., *B. triacanthophora* Fedde, *B. gagnepainii* Schneid. and *B. bergmanniae* Schneid.), whose roots are widely used as a traditional Chinese medicine called “Sankezhen”, and provide some references for resource and quality evaluation of the medicine. **Method:** Acid dye colorimetry and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to measure contents of the total alkaloids and berberine, respectively. **Result:** Contents for the total alkaloids in root and stem samples were in the range of 1.60% to 4.72% and 0.76% to 2.70%, while those of the berberine were 0.70% to 2.92% and 0.23% to 1.07%. With higher contents of the total alkaloids and berberine, the roots of *B. soulieana* Schneid., *B. gagnepainii* Schneid. and *B. bergmanniae* Schneid. are good sources of *Sankezhen*, meanwhile the contents were also high in stems of the three plants. **Conclusion:** The methods established for determination of total alkaloids and berberine were simple, rapid and reliable. Furthermore, the present study provided valuable research methods for the quality evaluation of the plants.

[Key words] acid dye colorimetry; total alkaloids; berberine; quality evaluation

三颗针(*Berberidis Radix*)是一种常用中药,具有清热燥湿、泻火解毒之功效。2010年版《中国药典》规定药材三颗针的来源为小檗属数种植物的干

燥根。该属植物有效成分有小檗碱(berberine)、药根碱(jatrorrhizine)等生物碱^[1]。药理研究认为这类生物碱及小檗碱具有消炎抗菌、降血压、降血脂、抗

[收稿日期] 20140318(004)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B06)

[第一作者] 李路扬, 硕士生, 从事中药民族药资源与品质研究, Tel:027-67841196, E-mail: zhongnanmindal@163.com

[通讯作者] * 万定荣, 博士, 教授, 从事中药民族药资源与品质研究, Tel:027-67841196, E-mail: wandr666@163.com

肿瘤、降血糖^[2-9]等药理活性。目前多用小檗属植物为原料提制小檗碱。近年来采用 HPLC 测定三颗针中小檗碱含量的文献较多,但通过酸性染料比色法测定其中总生物碱含量的方法未见报道。我们通过市场调查发现,除根入药外,商品三颗针还混有大量的地上茎。为了考察不同基源三颗针药材的质量,保证用药有效性,本文分别采用酸性染料比色法和 HPLC 法对拟豪猪刺等 5 种小檗属植物的根(包括茎)进行了总生物碱及小檗碱的含量测定研究,以期三颗针药材的质量评价与控制提供可靠的方法,为小檗属植物茎作为小檗碱新原料资源的研究提供依据。

1 材料

5 种基源的三颗针药材样品(茎随同采集)采自湖北建始和长阳,其原植物经万定荣教授鉴定,分别为拟豪猪刺(假豪猪刺) *Berberis soulieana* Schneid.、川鄂小檗 *B. henryana* Schneid.、芒齿小檗 *B. triacanthophora* Fedde、湖北小檗 *B. gagnepainii* Schneid. 以及汉源小檗 *B. bergmanniae* Schneid.。盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 1100713-200911),溴甲酚绿、溴百里香酚蓝试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号 20121010,20120917),乙腈(色谱纯),其他试剂均为分析纯。

ultimate 3000 型高效液相色谱仪(戴安),UV/V-16/18 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),PHSJ-3F 型实验室 pH 计(上海精科),CP64 型 1/万电子天平(奥豪斯有限公司)

2 方法与结果

2.1 酸性染料比色法测定样品总生物碱含量

2.1.1 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取样品干燥粉末 1.0 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,精密加入 90% 甲醇 40 mL,称重,回流提取 40 min,冷却,再次称重,90% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液。精密吸取续滤液 1.0 mL 于 25 mL 量瓶中,用 90% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 酸性染料的制备 0.03% 溴甲酚绿溶液的配制 取溴甲酚绿 15 mg,加磷酸盐缓冲液溶解至 50 mL,摇匀,即得。

0.03% 溴百里香酚蓝溶液的配制 取溴百里香酚蓝 15 mg,加 1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 0.25 mL 使溶解,加水稀释至 50 mL,即得。

2.1.4 显色方法 精密吸取一定量的待测溶液,蒸干,用 pH 5.0 的磷酸二氢钾缓冲液 4 mL 使溶解,转移至盛有酸性染料 3 mL 的分液漏斗中,摇匀,静置 30 min,加入三氯甲烷 5 mL,振摇 2 min,静置 10 min,分出下层,如此反复共萃取 3 次,合并三氯甲烷萃取液。

2.1.5 测定方法的确定 精密吸取一定量的待测溶液,蒸干,用 pH 4.5 的磷酸盐缓冲液 3 mL 使溶解,转移至盛有 0.03% 溴甲酚绿溶液 3 mL 的分液漏斗中,摇匀,静置 30 min,加入三氯甲烷 5 mL,振摇 2 min,静置 10 min,分出下层,如此反复共萃取 3 次,合并三氯甲烷萃取液。另取相同体积的 90% 甲醇同法操作后作为空白对照。分别在 418 nm 处测定吸光度。

2.1.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL,按 2.1.5 项方法进行测定。以对照品溶液质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算得回归方程: $Y = 0.0743X - 0.0076$ ($r = 0.9996$)。结果表明盐酸小檗碱在 1.16 ~ 11.57 mg·L⁻¹ 与吸光度具有良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 精密称取湖北小檗根粉末约 1.0 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液并按 2.1.5 项下要求操作,测定 6 次。其测定结果的 RSD 为 0.21%,说明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验 精密称取湖北小檗根粉末约 1.0 g,共 6 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液并按 2.1.5 项下操作进行测定。其测定结果的 RSD 为 2.52%,说明该方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 精密称取湖北小檗根粉末约 1.0g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液并按 2.1.5 项下操作,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 20, 24 h 测定。其测定结果的 RSD 为 1.22%,说明供试液中有关待测成分在 24 h 内稳定。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取湖北小檗根的干燥粉末(过 4 号筛)6 份,每份约 0.2 g,分别加入盐酸小檗碱对照品 6.94 mg,按 2.1.2 项方法制备供试品溶液并按 2.1.5 项方法测定、计算,得平均回收率为 99.3%,RSD 为 2.23%(表 1)。

2.1.11 样品总生物碱含量测定 分别取 5 种植物根、茎的干燥粉末 1.0 g,精密称定(平行 2 份),按 2.1.2 和 2.1.5 项下方法操作,并依据 2.1.6 项回归方程计算总生物碱的含量。见表 2。

2.2 HPLC 测定小檗碱含量

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱

表1 总生物碱加样回收率

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
6.90	6.94	13.52	97.7	99.3	2.23
6.91	6.94	13.74	99.2		
6.93	6.94	14.12	101.8		
6.90	6.94	13.63	98.5		
6.90	6.94	13.37	96.6		
6.92	6.94	14.15	102.1		

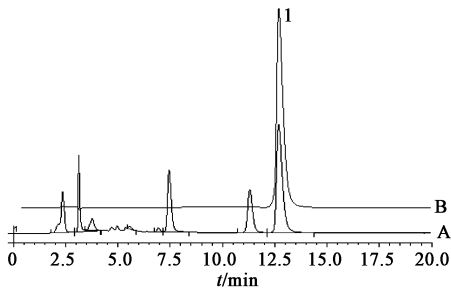
表2 5种小檗属植物(根和茎)总生物碱和小檗碱含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

样品	根		茎	
	总生物碱	小檗碱	总生物碱	小檗碱
川鄂小檗	16.01	6.97	16.31	10.12
湖北小檗	38.48	29.20	27.01	10.73
芒齿小檗	19.14	14.70	7.63	2.27
拟豪猪刺	47.20	14.84	26.49	2.50
汉源小檗	50.45	24.52	25.87	6.96

对照品适量,加甲醇制成每1 mL含50 μg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末约0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入90%甲醇70 mL,称定质量,回流提取40 min,放冷,再次称重,用90%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.2.3 色谱条件 Waters Symmetry C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.02%磷酸二氢钾溶液(26:74),检测波长265 nm,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,流速1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,进样量10 μL 。见图1。



A. 拟豪猪刺根样品;B. 对照品;1. 盐酸小檗碱

图1 拟豪猪刺根供试品与盐酸小檗碱对照品溶液 HPLC

2.2.4 线性关系考察 准确量取对照品溶液0.4, 1, 3, 5, 7, 10 mL,分别置于10 mL量瓶中,以甲醇定容至刻度,摇匀。在上述色谱条件下每种浓度的样品重复进样2次。分别以对照品的量(X)为横坐标,以峰面积积分值(Y)为纵坐标,制备标准曲线,得回归方程为 $Y = 75.585X + 0.0185$ ($r = 0.9998$)。结果表明,盐酸小檗碱在0.02 ~ 0.5 μg 与峰面积

积分值呈良好的线性关系。

2.2.5 方法学考察 通过对精密度和重复性进行考察,各有关测定数据的RSD分别为0.24% ($n = 6$)和0.88% ($n = 6$),表明仪器精密程度和实验方法重复性良好。稳定性实验考察了24 h,其测定结果的RSD为0.30%,说明供试液中待测成分在24 h内稳定。

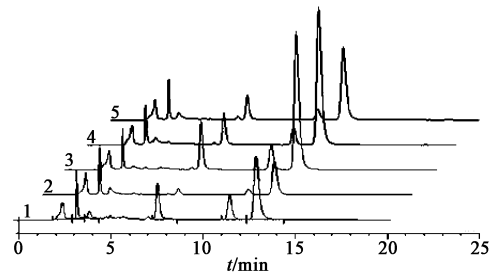
加样回收率试验 取拟豪猪刺根粉末(过4号筛)约0.1 g,分别加入盐酸小檗碱对照品1.56 mg,精密称定,按2.2.2项下的方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定并计算,得平均回收率为100.5%,RSD为2.76%(表3)。

表3 小檗碱加样回收率

测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
3.07	102.2	100.5	2.76
3.08	102.5		
2.97	95.8		
3.06	101.5		
3.02	98.5		
3.08	102.6		

注:样品中量均为1.48 mg,加入量均为1.56 mg。

2.2.6 样品含量测定 取5种小檗属植物的根、茎粉末,精密称定,按2.2.2项下的方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,按回归方程计算小檗碱含量(图2~3,表2)。



1. 拟豪猪刺根;2. 川鄂小檗根;3. 湖北小檗根;4. 汉源小檗根;5. 芒齿小檗根

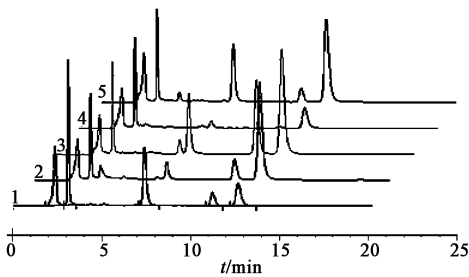
图2 5种小檗属植物根 HPLC

3 小结与讨论

3.1 测定波长与酸性染料种类的选择 对照品溶液与预试供试品溶液依法显色(无水甲醇作为空白对照),在400~760 nm扫描,结果对照品及供试品在418 nm附近均有最大吸收。

溴甲酚绿显色的吸光度明显小于溴百里香酚蓝溶液,故选用溴甲酚绿为本试验的酸性染料。

3.2 总生物碱测定条件的选择 考察酸性染料的用量、缓冲液pH及缓冲液用量对样品中总生物碱的提取率的影响,无水甲醇作为空白对照,结果表明



1. 拟豪猪刺茎; 2. 川鄂小檗茎; 3. 湖北小檗茎;
4. 芒齿小檗茎; 5. 汉源小檗茎

图3 5种小檗属植物茎 HPLC

酸性染料用量 3 mL、缓冲液 pH 4.5、缓冲液用量为 3 mL 时吸光度最大,即提取率最高。

3.3 总生物碱测定中供试品溶液制备方法 考察了提取溶剂(甲醇、无水乙醇)、提取方式(超声、回流提取法)、溶剂浓度(70%, 80%, 90%, 100%), 溶剂用量(30, 40, 50, 60 mL)及提取时间(30, 40, 50, 60 min)对提取效果的影响,确定了最佳提取方案。

3.4 小檗碱提取条件优化 考察了提取溶剂(甲醇、无水乙醇)、方式(超声、回流提取法)、时间(20, 40, 60, 80 min)、溶剂浓度(80%, 90%, 纯甲醇)及溶剂用量(30, 50, 70, 90 mL)对提取效率影响,结果显示以 90% 甲醇 70 mL 回流提取 40 min,小檗碱提取率较高。

《中国药典》2010 年版一部记载三颗针药材来源为小檗属数种植物的干燥根,采用 HPLC 测定小檗碱,规定其含量不得少于 0.6%。本实验 5 种小檗属植物根中的小檗碱含量均达到要求。研究表明,多数样品根的总生物碱含量明显高于其茎,说明《中国药典》对三颗针基源及药用部位的规定是合理的。但 5 种植物中拟豪猪刺、湖北小檗、汉源小檗茎的总生物碱含量也较高,接近或约占根的 2/3;川鄂小檗、湖北小檗、汉源小檗的茎中小檗碱含量也 > 0.6%,说明茎同样为重要的药用资源,可作为小檗碱提制的原料。此外,几种植物的根中小檗碱量均占总生物碱的较大比重,为生物碱中主要活性成分,说明中国药典选择小檗碱的含量测定为指标,对于控制该药材的质量也有较大意义。

5 种小檗属植物中根的总生物碱及小檗碱含量最高与最低者之间相差 3~4 倍,说明多基源药材的质量差别较大,应该有较明确的来源规定,以保证用药有效性和质量稳定性。测定样品结果表明,湖北

小檗、汉源小檗和拟豪猪刺根的总生物碱及小檗碱的含量均较高,可能为优质的三颗针药材来源。

所采集的拟豪猪刺根样品的总生物碱含量非常高,但其小檗碱含量却显著低于湖北小檗、汉源小檗,说明总生物碱与具体生物碱成分的含量高低在同一药材不同基源的样品中并非一定成对应关系,而《中国药典》中以小檗碱含量作为三颗针药材的质量控制指标,若加以总生物碱含量指标,可更准确地反映该药材的质量,更有效地评价不同来源药材的品质。

本研究中各个种的样品份数有限,其含量测定数据还有待收集更多样品以完善。

[参考文献]

- [1] Dan Y, Liu Y Z, Peng Y, et al. New collection of crude drugs in Chinese Pharmacopoeia 2010 II. *Sankezhen* (*Berberis* spp.) [J]. *Chin Herbal Med*, 2011, 3(4):268.
- [2] 杨伟丽,马志刚,祁梅. 甘肃不同产地三颗针不同部位生物碱的含量测定[J]. *甘肃医药*, 2009, 28(5):349.
- [3] 张淑清,陈晓雪. 生药三颗针的药理及临床应用简介[J]. *中医学报*, 1997, 25(2):38.
- [4] Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(8):999.
- [5] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. *Nat Med*, 2004, 10(12):1344.
- [6] Wang L H, Yu C H, Fu Y, et al. Berberine elicits anti-arrhythmic effects via IK1/Kir2.1 in the rat type 2 diabetic myocardial infarction model [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(1):33.
- [7] Tang J, Feng Y B, Tsao S W, et al. Berberine and coptidis rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 26(1):5.
- [8] Zhang H, Wei J, Xue R, et al. Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing insulin receptor expression [J]. *Metabolism*, 2010, 59(2):285.
- [9] Kulkarni S K, Dhir A. Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(3):317.

[责任编辑 顾雪竹]