

黄柏及其不同炮制品的 HPLC 指纹图谱分析

徐珊¹, 张凡^{1,2}, 刘蓬蓬¹, 赵远¹, 孙娜¹, 贾天柱^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;

2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**建立黄柏生品、酒炙品和盐炙品的 HPLC 指纹图谱,比较不同产地黄柏及其炮制品指纹特征的差异。**方法:**采用 HPLC 比较 10 批黄柏生品、酒炙品和盐炙品的指纹图谱,流动相乙腈(A)-水(含 0.3% 磷酸和 0.3% 二乙胺,B)梯度洗脱(0~10 min,10%~14% A;10~20 min,14%~25% A;20~45 min,25% A;45~50 min,25%~65% A;50~55 min,65%~70% A;55~60 min,70%~75% A;60~70 min,75%~100% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,检测波长 284 nm,分析时间 70 min。**结果:**酒黄柏、盐黄柏与生黄柏的指纹图谱基本一致,但各成分间的相对含量存在差异,对其中的绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯进行了归属。10 批黄柏生品、酒炙品和盐炙品共有模式色谱峰相似度均 >0.9。**结论:**建立的指纹图谱具有很好的精密度、重复性和稳定性,可作为黄柏及其炮制品质量评价的依据。

[关键词] 黄柏; 炮制工艺; 指纹图谱; 生物碱; 绿原酸; 盐酸巴马汀; 黄柏内酯

[中图分类号] R283.1;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0010-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141211.1449.001.html>

[网络出版时间] 2014-12-11 14:49

HPLC Fingerprint Analysis Among Different Processed Products of Phellodendri Chinensis Cortex

XU Shan¹, ZHANG Fan^{1,2}, LIU Peng-peng¹, ZHAO Yuan¹, SUN Na¹, JIA Tian-zhu^{1,2*} (1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC fingerprint analysis method of Phellodendri Chinensis Cortex and compare fingerprint differences of its processed products and the raw from different habitats. **Method:** HPLC was employed to compare fingerprint of ten batches of Phellodendri Chinensis Cortex and its processed products with mobile phase consisting acetonitril (A) -water (containing 0.3% phosphoric acid and 0.3% diethylamine, B) for gradient elution (0-10 min, 10%-14% A; 10-20 min, 14%-25% A; 20-45 min, 25% A; 45-50 min, 25%-65% A; 50-55 min, 65%-70% A; 55-60 min, 70%-75% A; 60-70 min, 75%-100% A), detection wavelength was set at 284 nm, column temperature was 40 ℃, flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and analytic time was 70 min. **Result:** Its processed products had a similar fingerprint chromatogram to the raw of Phellodendri Chinensis Cortex, but existing a little difference in relative content of each component. Some of peaks in HPLC chromatogram were identified as chlorogenic acid, phellodendrine, magnoflorine, jatrorrhizine, berberrabine, palmatine chloride, berberine hydrochloride, obaculactone. Similarities of total mode peaks among ten batches of raw materials, wine and salt baked products were more than 0.9. **Conclusion:** This established fingerprint has good precision, reproducibility and stability, it can be used as a quality control method of Phellodendri Chinensis Cortex and its processed products.

[Key words] Phellodendri Chinensis Cortex; processed products; fingerprint; alkaloids; chlorogenic acid; palmatine chloride; obaculactone

[收稿日期] 20140515(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274083)

[第一作者] 徐珊,在读硕士,从事中药炮制方向研究,Tel:13050731621,E-mail:xushan_1@163.com

[通讯作者] *贾天柱,教授,博士生导师,从事中药炮制方向研究,Tel:0411-85890135,E-mail:jiazh@126.com

黄柏为中医传统的清热燥湿药,主产于四川、贵州、湖北、云南等地,习称“川黄柏”,味苦,性寒,归肾、膀胱、大肠经,功效清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮^[1],主要化学成分包括生物碱类和柠檬苦素类^[2]。生黄柏具苦寒之性,清热燥湿作用较强。黄柏的炮制品种有酒黄柏和盐黄柏,酒炙缓和苦寒之性,又引药上行,生寒熟缓,属相反为制;而盐炙则可缓和苦燥之性,引药下行入肾,增强滋阴降火作用,寒者益寒,属相资为制。关于生黄柏的 HPLC 指纹图谱研究已有报道^[3-6],但黄柏不同炮制品间 HPLC 指纹图谱的相互比较研究尚未有文献报道。本实验拟比较不同市售地区黄柏及其自制炮制品种的指纹图谱,对绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯进行归属,为黄柏及其各炮制品的质量评价提供实验依据。

1 材料

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), DFT-100 型粉碎机(浙江温岭市迈邦机械设备有限公司), FA1004 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), ME204E 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

黄酒(浙江古泉酿酒有限公司,批号 201301),精制盐(江苏井神盐化股份有限公司,批号 201212),绿原酸、木兰花碱、小檗红碱对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为 130411, 130212, 130403, 纯度均 $\geq 98\%$),黄柏碱、药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 121209, 130121, 130403, 121217, 130327, 纯度均 $\geq 98\%$),甲醇、乙腈、乙酸、磷酸为色谱纯,水为纯净水,其余试剂为分析纯。

10 批生黄柏样品分别购自四川成都、四川绵阳、贵州贵阳、广东湛江、北京、四川广元、贵州六盘、四川简阳、四川北川、广西桂林,批号分别为 130411, 130503, 130325, 130511, 130427, 130413, 130327, 130423, 130419, 130510, 编号 S1, S2, …… S10, 经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮。酒黄柏和盐黄柏依据前期优选的炮制工艺制备而得^[2]。

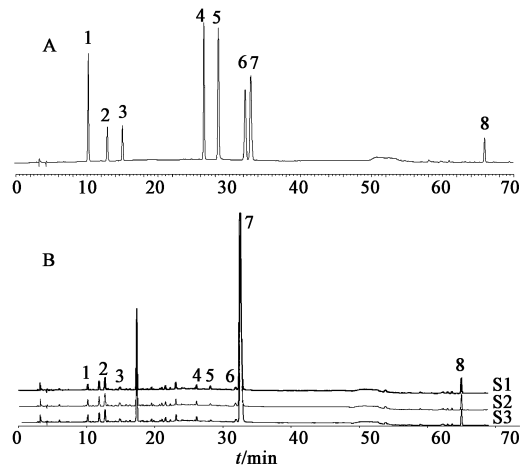
2 方法和结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯对照品适量,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分

别为 46.2, 36.2, 46.8, 39.6, 40.6, 35.6, 45.0, 43.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取黄柏生品及其不同炮制品药材粗粉各约 0.2 g,置于锥形瓶中,精密加入乙酸-甲醇(1:100)混合液 50 mL,密塞,称定质量,超声 30 min 后放冷,加混合液补足减失的质量,滤过,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(含 0.3% 磷酸和 0.3% 二乙胺,B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~14% A; 10~20 min, 14%~25% A; 20~45 min, 25%~25% A; 45~50 min, 25%~65% A; 50~55 min, 65%~70% A; 55~60 min, 70%~75% A; 60~70 min, 75%~100% A),流速 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 284 nm,进样量 5 μL ,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; S1. 生品; S2. 酒炙品; S3. 盐炙品; 1. 绿原酸; 2. 黄柏碱; 3. 木兰花碱; 4. 药根碱; 5. 小檗红碱; 6. 盐酸巴马汀; 7. 盐酸小檗碱; 8. 黄柏内酯

图1 黄柏不同炮制品 HPLC 指纹谱

Fig.1 HPLC fingerprint spectrum of different processed products of *Phellodendri Chinensis Cortex*

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取编号 S1 黄柏生品粗粉,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件重复进样 6 次,记录色谱图。结果各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别为 0.1%~0.3% 和 0.3%~1.4%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取 2.4.1 项下供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 按 2.3 项下色谱条件测定,结果各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别为 0.02%~0.6% 和 0.7%~

1.2%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取编号S1黄柏生品粗粉6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下色谱条件测定,计算各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值的RSD分别为0.04%~0.4%和0.4%~1.3%,表明该方法重复性较好。

2.5 指纹图谱的建立与技术参数

2.5.1 指纹图谱的建立 按2.2项下方法制备生黄柏、酒黄柏和盐黄柏的供试品溶液各10批,按2.3项下色谱条件测定,分别将指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A版软件,对

保留时间9~70 min的色谱峰进行多点校正后自动匹配,生成生黄柏的HPLC指纹图谱,见图2。结果共分离出30个色谱峰,经相似度计算,选定其中25个共有的色谱峰为共有指纹峰,经对照品定性,色谱峰1,3,5,20,21,22,23,25号分别鉴定为绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯。其中盐酸小檗碱分离度好,出峰时间适中且峰面积较稳定,因此选其作为参照峰,标记为S,得各色谱峰的相对保留时间及峰面积值见表1,每个样品的非共有峰面积均小于总面积的10%,符合指纹图谱要求。

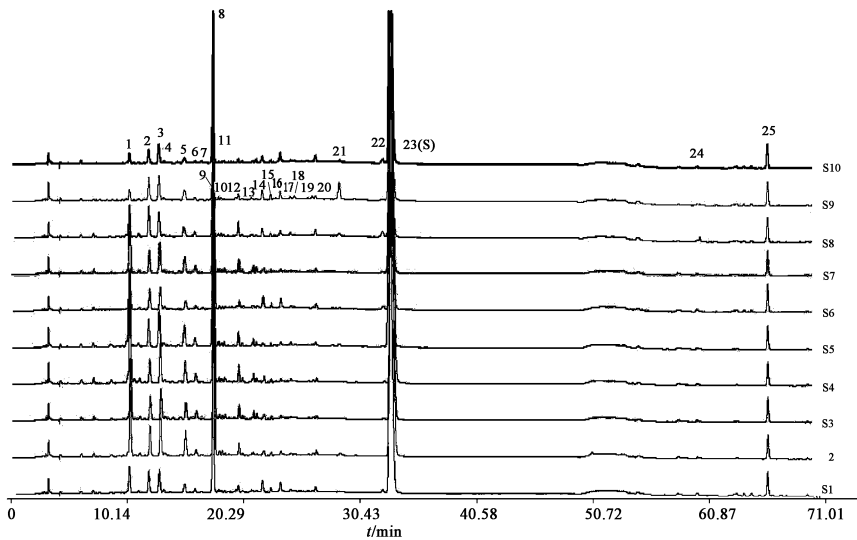


图2 10批生黄柏HPLC指纹谱

Fig.2 HPLC fingerprint of ten batches of raw products of Phellodendri Chinensis Cortex

2.5.2 指纹图谱的相似度计算 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A版软件计算均值相似度,结果10批生黄柏指纹图谱的相似度分别为0.998,0.993,0.988,0.995,0.998,0.993,0.997,0.998,0.998,0.995,表明不同产地生黄柏的成分含量存在一定差异。10批酒黄柏指纹图谱的相似度分别为0.966,0.965,0.995,0.985,0.973,0.975,0.935,0.989,0.967,0.987;10批盐黄柏指纹图谱的相似度分别为0.983,0.974,0.965,0.976,0.983,0.975,0.978,0.996,0.998,0.972。表明不同市售的黄柏在酒炙和盐炙后含量存在一定差异。10批酒黄柏、盐黄柏与生黄柏共有模式色谱图比较,相似度均>0.9,结合图1表明炮制品与生品中化学成分含量有一定差异。

3 讨论

3.1 提取条件考察 预试验考察了供试品溶液的提取溶剂[甲醇,盐酸-甲醇(1:100),乙酸-甲醇(1:

100),60%乙醇及70%乙醇]和提取方法[浸渍法(室温静置16 h)、回流法(30 min)、超声法(30 min)],结果表明选择乙酸-甲醇(1:100)为提取溶剂时,各指标成分的提取效果最佳,分离效果理想。浸渍法提取效果较差,超声法与回流法含量差别不大,但超声法操作简便,耗能较少,故选择超声法。选择15,30,45,60 min进行超声时间考察,结果显示超声30 min时指标成分提取量较15 min明显增加,且与提取45,60 min相比未见明显差异,故采用超声时间30 min。

3.2 色谱条件优化 本文考察了甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水、乙腈-水(含0.3%磷酸和0.3%二乙胺)、乙腈-2 mmol·L⁻¹乙酸铵、乙腈-0.4 mol·L⁻¹氯化铵等色谱系统,结果发现选择乙腈-水(含0.3%磷酸和0.3%二乙胺)梯度洗脱时,色谱峰信息量丰富、各色谱峰分离度较好。

表 1 黄柏生品、酒炙品和盐炙品指纹图谱的相对保留时间和相对保留峰面积

Table 1 Fingerprint relative retention time and relative peak area of *Phellodendri Chinensis Cortex* and its processed products

No.	相对保留时间			相对保留峰面积		
	生品	酒炙品	盐炙品	生品	酒炙品	盐炙品
1	0.313	0.313	0.313	0.017	0.016	0.012
2	0.364	0.364	0.364	0.025	0.025	0.024
3	0.390	0.391	0.391	0.035	0.035	0.033
4	0.403	0.404	0.404	0.004	0.004	0.003
5	0.456	0.457	0.458	0.012	0.013	0.012
6	0.485	0.486	0.486	0.004	0.005	0.004
7	0.534	0.534	0.535	0.203	0.210	0.189
8	0.547	0.548	0.548	0.002	0.002	0.002
9	0.554	0.555	0.555	0.003	0.003	0.003
10	0.561	0.562	0.562	0.003	0.003	0.003
11	0.573	0.573	0.574	0.002	0.002	0.001
12	0.586	0.587	0.588	0.002	0.002	0.001
13	0.600	0.601	0.601	0.007	0.007	0.007
14	0.609	0.610	0.610	0.003	0.003	0.003
15	0.646	0.647	0.647	0.006	0.007	0.007
16	0.685	0.685	0.685	0.004	0.004	0.004
17	0.710	0.711	0.711	0.015	0.014	0.015
18	0.737	0.735	0.737	0.003	0.003	0.003
19	0.795	0.796	0.795	0.002	0.002	0.003
20	0.803	0.804	0.804	0.011	0.011	0.010
21	0.866	0.866	0.866	0.004	0.005	0.010
22	0.980	0.980	0.980	0.011	0.012	0.011
23	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
24	1.811	1.000	0.903	0.003	0.003	0.003
25	1.996	2.001	1.999	0.042	0.041	0.038

3.3 检测波长选择 采用全波长紫外扫描各样品,并对各波长下色谱图进行比较,结果发现在 210, 220, 230 nm 处,黄柏内酯色谱峰明显,但其他色谱峰信息较少;在 284 nm 处色谱信息最丰富,特征最为明显,图谱中各指纹峰信号强,分离效果较好,故选择检测波长 284 nm。

3.4 分析时间考察 吸取 S1 供试品溶液 5 μL,注入高效液相色谱仪,运行 100 min,记录色谱峰,结果发现 70 min 后无黄柏所含化学成分色谱峰,故分析

时间定 70 min。

3.5 黄柏饮片的质量评价 通过比较 10 批不同市售地区的生黄柏饮片,发现不同批次黄柏饮片所含化学成分基本一致,仅含量存在一定差异,可能是因为地理环境、采收时间及贮藏条件影响了化学成分含量。收集的饮片均为川黄柏,但产地分散于四川、贵州、广西等地,所以化学成分含量有所不同。黄柏饮片以北京地区市售为最优,主要色谱峰分离度好,含量高。

3.6 指纹图谱分析 试验发现黄柏生、制品可检测出 25 个共有色谱峰,但各成分含量有一定差异。炮制品中绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量较生品均有所降低,但小檗红碱、药根碱及黄柏内酯含量均有所升高。原因可能是由于加热使某些成分发生了转变,但不同炮制温度对化学成分的转化有所不同,或因经辅料炮制后某些成分溶出率的变化所致。研究发现黄柏炮制后,小檗红碱含量增加是由盐酸小檗碱转化而来^[2]。黄柏生熟药效有异,生品性寒而沉,酒炙后缓和苦寒之性,免伤脾阳,并借酒升腾之力,引药上行,清血分湿热;盐炙后缓和苦燥之性,不伤脾胃,引药下行入肾,增强资肾阴、泻肾火的作用。通过指纹图谱比较,发现黄柏炮制前后存在化学成分的变化,这可能是导致其药效发生变化的原因。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:286-287.

[2] 张凡. 黄柏相反为制的炮制原理研究[D]. 大连:辽宁中医药大学, 2011.

[3] 张水寒,郭伟伟,蔡光先. HPLC 指纹图谱结合系统聚类法对不同产地关黄柏药材的分析研究[J]. 科技导报, 2006, 24(9):51-53.

[4] 杨宏,王天志,常艳波,等. 川黄柏的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国天然药物, 2006, 4(5):360-362.

[5] 高源,胡昌江,吴珊珊,等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分对黄柏饮片的等级研究[J]. 中成药, 2012, 34(12):2395-2399.

[6] 张子龙,刘东辉,黄月纯,等. 关黄柏、黄柏及其精制提取物 HPLC 指纹图谱的相关性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5):549-553.

[责任编辑 刘德文]