

关黄柏炒炭前后饮片化学成分的变化规律分析

岳琳¹, 李丽², 刘颖², 肖永庆^{1,2*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**探究关黄柏炒炭前后饮片化学成分的变化规律,为关黄柏和关黄柏炭饮片的质量标准制定提供依据。**方法:**采用 HPLC 测定,流动相乙腈-0.4 mol·L⁻¹氯化铵水溶液梯度洗脱,柱温 35 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 215 nm。分析关黄柏炒炭前后饮片化学成分组成及含量的变化,对其中 7 种主要化学成分进行定量分析。**结果:**10 批关黄柏饮片中,木兰花碱、盐酸黄柏碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮的质量分数分别为 2.468~6.783, 1.947~4.197, 0.209~0.506, 3.049~4.557, 5.869~13.168, 5.141~7.337, 1.798~4.975 mg·g⁻¹。关黄柏炒炭后,除个别企业样品外,各化学成分含量均有减少,其中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀等生物碱类成分几乎殆尽;黄柏酮、黄柏内酯等小极性成分保存较多,9 批关黄柏炭饮片中,黄柏内酯、黄柏酮的质量分数分别为 3.164~6.483, 0.281~1.614 mg·g⁻¹。**结论:**关黄柏饮片炒炭后,外观性状和内在成分变化明显,关黄柏饮片的质量标准难以应用于关黄柏炭。所购关黄柏炭饮片也因此难以做到炒炭程度统一,应根据关黄柏炒炭后的成分变化规律控制炒炭程度,进一步规范关黄柏和关黄柏炭饮片的质量标准。

[关键词] 关黄柏; 关黄柏炭饮片; 化学成分; 生物碱; 黄柏内酯; 黄柏酮

[中图分类号] R283.3; R284.1; R943.1; R283.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0007-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050007

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1605.032.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:05

Analysis on Change Law of Chemical Constituents in *Phellodendri Amurensis* Cortex Before and After Being Processed

YUE Lin¹, LI Li², LIU Ying², XIAO Yong-qing^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the change law of chemical constituents in *Phellodendri Amurensis* Cortex before and after being processed, and to provide the basis for the quality standard of its decoction pieces. **Method:** HPLC was performed by taking acetonitrile-0.4 mol·L⁻¹ ammonium chloride solution as mobile phase, column temperature at 35 ℃, the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength of 215 nm. Chemical constituents in *Phellodendri Amurensis* Cortex before and after being processed was analyzed and 7 main constituents were measured. **Result:** Among 10 batches of *Phellodendri Amurensis* Cortex decoction pieces, the contents of magnoflorine, phellodendrine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, obaculactone and obakunone were 2.468-6.783, 1.947-4.197, 0.209-0.506, 3.049-4.557, 5.869-13.168, 5.141-7.337, 1.798-4.975 mg·g⁻¹. After being processed, in addition to a sample, all the constituents reduced, among which alkaloids like berberine and palmatine, almost disappeared, however, obakunone and obaculactone existed. Among 9 batches of *Phellodendri Amurensis* Cortex decoction pieces, the contents of obaculactone and obakunone were 3.164-6.483,

[收稿日期] 20160905(005)

[基金项目] 国家科技基础性科研专项重点项目(2014FY111100)

[第一作者] 岳琳,在读硕士,从事中药炮制及质量评价研究, Tel:17701320016, E-mail:4803387@qq.com

[通讯作者] *肖永庆,研究员,博士生导师,从事中药炮制及质量评价研究, Tel:010-84040221, E-mail:x.heqi@163.com

0.281-1.614 mg·g⁻¹。 **Conclusion:** The appearance and internal components of *Phellodendri Amurensis Cortex* after being processed obviously change. The quality standard, which applies to *Phellodendri Amurensis Cortex*, can't apply to charred *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces. So the process degree of samples is different, the process degree should be controlled according to the laws.

[**Key words**] *Phellodendri Amurensis Cortex*; charred *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces; chemical constituents; alkaloids; obaculactone; obakunone

中药饮片是中医临床用药的主要形式,也是中成药生产的原料,其质量直接影响着中医临床疗效及整个中药产业的健康发展。关黄柏饮片为临床常用饮片,功效清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮、退虚热,被广泛用于治疗湿热痢疾、泄泻、黄疸、骨蒸劳热、皮肤湿疹等证。关黄柏为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* 的干燥树皮,在 2000 年版《中国药典》以前,与黄柏(川黄柏,芸香科植物黄皮树 *P. chinense* 的干燥树皮)列于同一项下,但由于二者基源和主要化学成分等方面的差异,自 2005 年版《中国药典》起,关黄柏与黄柏分列。关黄柏药材以黄柏酮为定性指标,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀为定量指标^[1]。此外,还有学者对关黄柏药材中盐酸药根碱^[2]、盐酸黄柏碱^[3]和微量元素^[4]进行含量测定,但鲜有同时测定 7 种化学成分的研究。近年来,有学者采用 LC-MS 技术测定了关黄柏中各组分含量^[5],GC-MS, HPLC-NMR, HPLC-DAD-MS 等技术也被广泛应用在关黄柏各组分的含量测定中。但 HPLC 仍是目前含量测定中最常用且较为简单快捷的方法。

2015 年版《中国药典》中,关黄柏项下收录了 3 种饮片,其中包含了关黄柏和关黄柏炭饮片,但关黄柏饮片的定量标准与药材相同,而关黄柏炭饮片标准中尚无定量指标。炒炭是中药炮制方法中一种加热程度较为剧烈的方法,饮片无论是外观性状还是功能主治方面都发生了较为显著的改变,这些改变必然与其内在物质基础的变化密切相关。本文采用 HPLC 对关黄柏炒炭前后饮片中主要化学成分组成及量比关系的变化进行分析,以揭示炒炭前后关黄柏饮片中化学成分的变化规律,为进一步揭示炮制与其生物活性的相关性奠定基础,达到完善关黄柏及关黄柏炭饮片的质量评价标准的目的。

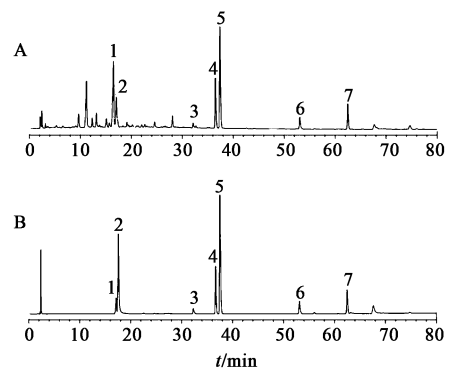
1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),FA2204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),XS105 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。关黄柏饮片 10 批,关黄柏炭饮片 9 批,均购自

北京盛世龙药业有限公司等企业,经中国中医科学院中药研究所肖永庆研究员鉴定;盐酸药根碱、木兰花碱、盐酸巴马汀、盐酸黄柏碱对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-12032313, MUST-12022901, MUST-12022707, MUST-12021407),盐酸小檗碱对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 110620),黄柏酮、黄柏内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111923-201102, 110800-201406),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 35 °C,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 215 nm,流动相乙腈(A)-0.4 mol·L⁻¹氯化铵水溶液(B)梯度洗脱(0~55 min, 5%~45% A; 55~80 min, 45%~70% A)。此色谱条件下,各目标成分分离度良好,见图 1。



A. 供试品; B. 混合对照品; 1. 木兰花碱; 2. 盐酸黄柏碱; 3. 盐酸药根碱; 4. 盐酸巴马汀; 5. 盐酸小檗碱; 6. 黄柏内酯; 7. 黄柏酮

图 1 关黄柏饮片 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces

2.2 供试品溶液的制备 精密称取饮片粉末(过三号筛)0.5 g,加入甲醇 20 mL,称重,超声处理 45 min,放冷,用甲醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取木兰花碱、

盐酸黄柏碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮对照品适量,加甲醇定容至不同的 10 mL 量瓶中,制成质量浓度分别为 0.259,0.058,0.037,0.175,0.360,0.201,0.129 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.4 线性关系考察 以 2.3 项下对照品溶液为母液,加甲醇分别稀释 1,2,4,8,16 倍,按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,计算回归方程,见表 1。

表 1 关黄柏饮片中各指标成分的线性关系考察

Table 1 Linear relationship investigation of seven components in *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces

成分	回归方程	R ²	线性范围/μg
木兰花碱	$Y = 3\,423\,340X - 207\,875$	0.999 7	0.162 ~ 2.590
盐酸黄柏碱	$Y = 3\,416\,040X - 4\,986.9$	0.999 9	0.036 ~ 0.580
盐酸药根碱	$Y = 2\,847\,480X - 26\,476$	0.999 8	0.023 ~ 0.365
盐酸巴马汀	$Y = 2\,895\,220X - 96\,875$	0.999 5	0.109 ~ 1.750
盐酸小檗碱	$Y = 2\,551\,120X - 91\,599$	0.999 7	0.225 ~ 3.604
黄柏内酯	$Y = 593\,241X - 4\,206$	0.999 9	0.126 ~ 2.008
黄柏酮	$Y = 2\,238\,150X - 35\,735$	0.999 9	0.080 ~ 1.286

2.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算各成分峰面积的 RSD 在 0.9% ~ 1.7%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密称取关黄柏饮片 1 号样品 0.5 g,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,分别于 0,2,4,6,12,24 h 按 2.1 项下色谱条件进样分析,计算各成分峰面积的 RSD 在 0.5% ~ 1.8%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取关黄柏 1 号样品 6 份,每份 0.5 g,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,按 2.1

项下色谱条件测定,以盐酸小檗碱为参照计算相对峰面积,结果木兰花碱、盐酸黄柏碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、黄柏内酯、黄柏酮含量的 RSD 分别为 1.0%,2.3%,0.7%,0.4%,1.6%,1.5%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量关黄柏饮片 1 号样品 9 份,随机等分成 3 组,依次分别精密加入低、中、高质量浓度的对照品溶液(木兰花碱 91.29,101.98,112.66 μg,盐酸黄柏碱 60.00,66.88,73.75 μg,盐酸药根碱 19.05,24.50,29.94 μg,盐酸巴马汀 335.20,419.00,502.80 μg,盐酸小檗碱 819.84,1 024.80,1 229.76 μg,黄柏内酯 495.56,619.45,743.34 μg,黄柏酮 226.31,318.52,410.72 μg),按 2.2 项下方法制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率分别为 99.62%,99.09%,100.93%,97.98%,98.04%,99.26%,99.66%,RSD 依次为 3.4%,3.2%,2.5%,1.9%,2.9%,3.5%,3.4%。

2.9 样品测定 取关黄柏和关黄柏炭饮片粉末(过三号筛)0.5 g,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定(n=3),结果见表 2。发现不同企业关黄柏饮片的图谱差异不显著,而关黄柏炭饮片因各企业所用原料药材产地及炮制工艺的差异而呈现出一定的差别,见图 2~3。主要表现在保留时间 5~40 min 的色谱峰差异较为显著,这种差异在饮片的外观性状上也有一定的体现,如河北百草康神药业有限公司等企业(S6~S9)的关黄柏炭饮片质地较轻,断面与表面颜色一致,碳化程度较高,“炒炭存性”不够,其保留时间 5~25 min 的色谱峰面积较小甚至消失。

关黄柏和关黄柏炭饮片的特征图谱见图 4。

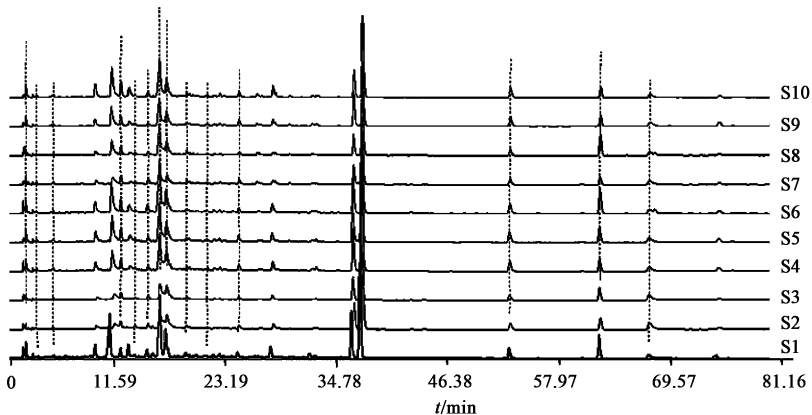


图 2 不同企业关黄柏饮片的 HPLC 比较

Fig. 2 Comparison on HPLC chromatograms between *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces from different companies

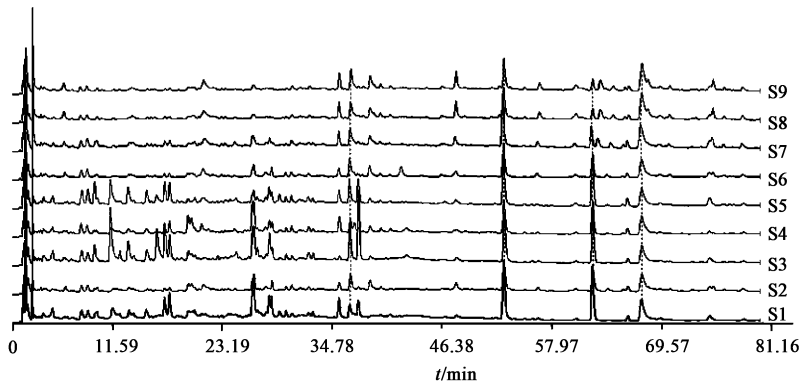


图 3 不同企业关黄柏炭饮片 HPLC 比较

Fig. 3 Comparison on HPLC chromatograms between charred *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces from different companies

表 2 关黄柏不同饮片中各指标成分的含量测定

Table 2 Determination of seven components in *Phellodendri Amurensis Cortex* decoction pieces

mg·g⁻¹

饮片	No.	生产厂家	批号	木兰花碱	盐酸黄柏碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	黄柏内酯	黄柏酮
关黄柏	1	北京盛世龙药业有限公司	20150702	6.783	3.353	0.506	4.557	11.747	6.564	3.329
	2	北京盛世龙药业有限公司	20150729	4.279	2.413	0.313	4.236	10.556	6.330	2.947
	3	北京盛世龙药业有限公司	20150811	5.065	3.399	0.325	4.129	11.434	6.307	3.493
	4	湖北天济中药饮片有限公司	20150902	4.758	3.125	0.280	4.267	10.384	6.946	1.900
	5	河北百草康神药业有限公司	20160316	4.625	3.437	0.273	3.856	10.879	7.337	2.410
	6	上海华宇药业有限公司-德华国药	20160321	4.607	3.607	0.255	4.148	13.168	6.919	3.979
	7	广东和翔制药有限公司	HX15G01	2.468	1.947	0.209	3.049	5.869	5.141	1.798
	8	湖北红土地现代中药有限公司	20160217	4.832	4.197	0.302	3.116	12.425	5.832	4.975
	9	亳州市沪谯药业有限公司	1511060952	3.691	2.752	0.308	4.003	9.020	7.119	1.893
	10	亳州市京皖中药饮片厂	150802	3.664	2.965	0.273	3.390	9.105	6.030	2.889
关黄柏炭	1	北京盛世龙药业有限公司	20150702	-	0.354	0.093	0.334	0.328	6.483	1.476
	2	北京盛世龙药业有限公司	20150729	-	-	-	-	-	3.257	0.284
	3	北京盛世龙药业有限公司	20150811	-	-	-	-	-	3.164	0.281
	4	北京盛世龙药业有限公司	1602094	-	-	-	-	-	5.126	0.528
	5	湖北天济中药饮片有限公司	20151191	-	-	-	-	-	3.224	0.666
	6	河北百草康神药业有限公司	20160316	0.820	0.649	0.154	0.796	1.495	5.948	1.582
	7	广东和翔制药有限公司	20160323	-	0.144	-	-	-	3.668	0.989
	8	湖北红土地现代中药有限公司	20160217	0.271	0.393	-	0.534	0.549	5.946	1.614
	9	亳州市沪谯药业有限公司	1412199482	-	-	-	-	-	3.885	0.586

注：“-”表示未检出。

关黄柏饮片中主要有 16 个色谱峰,其中以 12 号色谱峰(盐酸小檗碱)峰面积最高;炒炭后,色谱峰数量显著减少,与生品相比仅有 5 个主要色谱峰,其中 1~10 号色谱峰几乎消失,11 和 12 号色谱峰面积大幅降低,13~16 号色谱峰变化幅度较小,还出现了 2 个新色谱峰。此外,含量测定结果也显示,关黄柏炒炭后,木兰花碱、盐酸黄柏碱、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀含量大幅降低,多数降幅达 90%

以上;而黄柏内酯的含量降低幅度较小,约为关黄柏饮片的 50%;黄柏酮的含量则因炒炭程度的不同略有差异。

3 讨论

本文采用梯度洗脱,发现选择乙腈-0.1% 十二烷基磺酸钠水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液等为流动相时,目标成分色谱峰分离效果差。而参考文献[6]选择

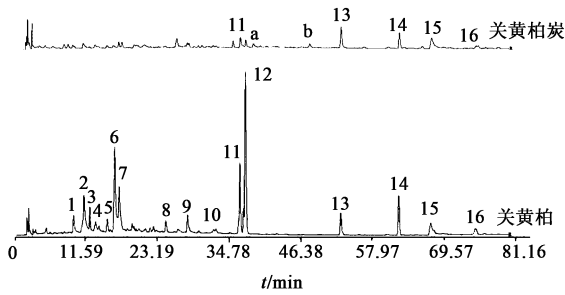


图 4 关黄柏和关黄柏炭饮片特征谱比较
Fig. 4 Comparison on HPLC chromatograms between Phellodendri Amurensis Cortex decoction pieces and charred Phellodendri Amurensis Cortex decoction pieces

乙腈-0.4 mol·L⁻¹氯化铵水溶液为流动相时,各组分离良好,优化梯度后选为本研究的流动相。虽然盐酸小檗碱、盐酸巴马汀等生物碱类成分在 280 nm 和 365 nm 等波长下均有较大吸收,但考虑到同时测定黄柏酮、黄柏内酯 2 种成分,故将检测波长定为 215 nm,可兼顾生物碱类成分和柠檬苦素类成分。

本文采用 HPLC 同时测定了关黄柏饮片中 7 种化学成分的含量,通过对关黄柏炒炭前后主要化学成分进行分析,发现关黄柏饮片中的生物碱类成分在炒炭过程中稳定性较差,随炒炭程度的加深而降低,而柠檬苦素类成分的热稳定性较好,炒炭过程中含量变化幅度较小。本研究结果提示可分别制定关黄柏和关黄柏炭饮片的质量评价标准。关黄柏饮片可选择盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀为指标;而关黄柏炭饮片由于上述成分含量降低较为显著,可选择黄柏内酯、黄柏酮为指标成分进行质量控制。

关黄柏饮片清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮;关黄柏炭饮片功在止血。结合本文研究结果可初步推测关黄柏饮片的清解作用可能与生物碱类成分的活性相关,而关黄柏炭饮片的止血功能则有赖于小极性分子的作用。关黄柏饮片炒炭后的图谱显示,有极少量的新物质生成(图 4),其化学结构有待于后续实验确定^[7]。中药炮制中“炒炭存性”的理论,在关黄柏炭中“存性”体现为小极性化合物的存留。对比 2 类化合物的生物活性、药效学差异和临床关黄柏、关黄柏炭的应用区别,可深入探讨关黄柏炒炭的原理,这有待于更深入的研究证实。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:146-147.
- [2] 刘颖,李世颂,刘娟. HPLC 测定关黄柏中生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):88-91.
- [3] 何佳佳,廉莲. HPLC 同时测定关黄柏中多组分化学成分含量的方法研究[J]. 辽宁科技学院学报,2015,17(4):33-35.
- [4] 李爱英,刘丽丽. ICP-AES 法测定关黄柏中的 5 种微量元素[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(7):1698-1699.
- [5] ZHU S L, DOU S S, LIU R H, et al. Qualitative and quantitative analysis of alkaloids in Cortex Phellodendri by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD [J]. Chem Res Chinese U, 2011, 27(1):38-44.
- [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.
- [7] 薛娟,曾伟民,王长福,等. 关黄柏总多糖的分离纯化及其对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):44-48.

[责任编辑 刘德文]