

黄柏及黄柏炭饮片的 HPLC 特征图谱比较

苏慧¹, 岳琳², 刘颖², 霍雨佳¹, 扶垭东², 李丽^{2*}, 王成永^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230038; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立黄柏及黄柏炭饮片的 HPLC 特征图谱,分析黄柏饮片炒炭前后特征图谱的变化规律。方法:采用 HPLC 分析黄柏及黄柏炭饮片的特征图谱,色谱条件为 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(B)(磷酸调 pH 3.4)梯度洗脱(0~5 min,5%~10% A;5~20 min,10%~14% A;20~50 min,14%~32% A;50~80 min,32%~70% A),检测波长 215 nm,柱温 35 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:11 批黄柏饮片中均标示出 16 个特征峰,并归属了其中的 9 个色谱峰,分别为绿原酸、隐绿原酸、盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮。通过对色谱峰的分析,黄柏炭仅能检出黄柏中的 3 个共有峰,且峰面积相差较大;另外标示出了 2 个特征峰,其中相对比例较高的特征峰经分析验证,确认其为盐酸小檗碱的加热分解产物——小檗红碱。结论:黄柏饮片炒炭前后的特征图谱存在显著差异。该方法准确可靠、重复性好,为黄柏和黄柏炭饮片的质量标准制定提供参考依据。

[关键词] 黄柏;黄柏炭;饮片;特征图谱;绿原酸;隐绿原酸;黄柏酮;盐酸小檗碱

[中图分类号] R283;R943.1;R284;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0041-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240041

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1011.002.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:11

Comparison on HPLC Specific Chromatograms Between Phellodendri Chinensis Cortex and Charred Phellodendri Chinensis Cortex Decoction Pieces

SU Hui¹, YUE Lin², LIU Ying², HUO Yu-jia¹, FU Ya-dong², LI Li^{2*}, WANG Cheng-yong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC specific chromatograms of Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces and charred Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces, and to study on the change law of HPLC specific chromatograms of Phellodendri Chinensis Cortex before and after being processed. **Method:** HPLC was employed with the ZORBAX SB-C₁₈ column, acetonitrile-0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (phosphoric acid regulated pH to 3.4) was employed as a mobile phase in gradient elution, the detection wavelength was 215 nm, column temperature was at 35 ℃ and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Eleven batches of Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces were marked with sixteen characteristic peaks, and chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, phellodendrine, magnoflorine, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, obaculatone and obakunone were assigned. Based on the analysis of characteristic peaks, only three common peaks were detected in charred Phellodendri Chinensis Cortex decoction

[收稿日期] 20170613(008)

[基金项目] 国家科技基础性科研专项重点项目(2014FY111100)

[第一作者] 苏慧,在读硕士,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:15256099012,E-mail:463228043@qq.com

[通讯作者] *李丽,博士,研究员,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:lili7755@163.com;

*王成永,教授,硕士生导师,从事中药制剂研究,Tel:0551-5169237,E-mail:chyw.hf@163.com

pieces, and the area of these peaks was quite different; in addition, two feature peaks were identified, with the relative high proportion of the characteristic peak being analyzed and verified to be berberrabine, the product of the heat decomposition of berberine hydrochloride. **Conclusion:** There are significant differences in the specific chromatograms of *Phellodendri Chinensis* Cortex decoction pieces before and after being processed. The method is accurate and reproducible, which can provide the basis for the quality standard of *Phellodendri Chinensis* Cortex decoction pieces and charred *Phellodendri Chinensis* Cortex decoction pieces.

[**Key words**] *Phellodendri Chinensis* Cortex; charred *Phellodendri Chinensis* Cortex; decoction pieces; specific chromatograms; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; obakunone; berberine hydrochloride

黄柏习称“川黄柏”,是著名的川产道地药材^[1]。黄柏作为大宗常用中药,目前已被应用于中国传统医学的各种疾病治疗,如肝硬化、痢疾、肺炎、肺结核等^[2]。现代研究表明生物碱类和柠檬苦素类均为黄柏的主要活性成分^[3-4]。2015 年版《中国药典》中,黄柏项下收录了 3 种饮片,其中包含黄柏和黄柏炭饮片,但黄柏饮片的质量评价标准仍沿用药材的评价内容,缺乏专属性,而黄柏炭饮片仅有外观性状的规定,定性和定量标准完全缺失^[5]。目前文献报道较多的是黄柏饮片的质量标准研究,主要集中在以生物碱类成分为指标进行黄柏饮片的鉴别及含量测定^[6-7],但很少有同时测定多类活性成分的报道。本实验拟通过 HPLC 建立黄柏及黄柏炭饮片的特征图谱,并以生物碱类和柠檬苦素类成分为指标归属了 9 个特征峰,通过比较主要特征峰的峰面积,明确了黄柏炒炭前后特征图谱的变化规律。同时,采用单成分模拟炮制试验分析并验证了盐酸小檗碱在炒炭过程中的变化规律,为完善黄柏及黄柏炭饮片的质量标准评价体系提供了科学依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),XS105 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),FA2204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),PHSJ-3F 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司)。盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、黄柏内酯、黄柏酮、绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-201212, 111895-201202, 110800-201406, 111923-201102, 110753-201415, 纯度依次为 86.7%, 98%, 99.91%, 98.9%, 96.2%),木兰花碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、隐绿原酸、小檗红碱对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-12022901, MUST-12022707, MUST-12032313, MUST-16022403, MUST-16110711, 纯度依次为 98%, 98%, 95.5%, 98%, 98%),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。黄

柏饮片 11 批,黄柏炭饮片 10 批,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为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* 的干燥树皮,具体信息见表 1。

表 1 不同黄柏饮片的采购信息

Table 1 Informations of *Phellodendri Chinensis* Cortex decoction pieces from different companies

饮片	编号	生产厂家	批号
黄柏	S1	北京盛世龙药业有限公司	20150712
	S2	北京盛世龙药业有限公司	20150729
	S3	北京盛世龙药业有限公司	20150811
	S4	浙江中医药大学中药饮片有限公司	161001
	S5	亳州市沪谯药业有限公司	1611190042
	S6	四川新荷花中药饮片股份有限公司	1611043
	S7	安徽协和成药业饮片有限公司	16040415
	S8	上海德华国药制品有限公司	KD16033101
	S9	四川省中药饮片有限责任公司	160617
	S10	广东和翔制药有限公司	HX16B01
	S11	安徽人民中药饮片有限公司	160601
黄柏炭	S1	北京盛世龙药业有限公司	20150712
	S2	北京盛世龙药业有限公司	20150729
	S3	北京盛世龙药业有限公司	20150811
	S4	浙江中医药大学中药饮片有限公司	151201
	S5	上海德华国药制品有限公司	2016090608
	S6	广东和翔制药有限公司	HX16B01
	S7	安徽友信药业有限公司	161201
	S8	芍花堂国药股份有限公司	161117
	S9	安徽捷众生物化学有限公司	20170413
	S10	河北百草康神药业有限公司	1704011

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相选择乙腈(A)-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(B)(使用磷酸调 pH 3.4)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 10% A; 5 ~ 20 min,

10% ~ 14% A; 20 ~ 50 min, 14% ~ 32% A; 50 ~ 80 min, 32% ~ 70% A), 检测波长 215 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、木兰花碱、黄柏内酯、黄柏酮、绿原酸、隐绿原酸、小檗红碱对照品适量, 加甲醇定容至不同的 10 mL 量瓶中, 制成质量浓度分别为 1.226, 0.190, 0.010, 0.019, 0.111, 0.100, 0.021, 0.282, 0.015, 0.122 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取饮片粉末(过三号筛)0.2 g, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 取出, 放冷, 加甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 精密称取黄柏饮片 S1 号样品 0.2 g, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 16 个特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 5.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 精密称取黄柏饮片 S1 号样品 6 份, 每份 0.2 g, 按 2.3 项下方法分别制成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算 16 个特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 5.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 精密称取黄柏饮片 S1 号样品 0.2 g, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算 16 个特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 5.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 样品测定 取 11 批黄柏饮片和 10 批黄柏炭饮片, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 见图 1 ~ 2。结果发现不同企业黄柏饮片的图谱基本一致; 而黄柏炭饮片的图谱呈现出一定的差异, 主要表现在不同企业样品中部分色谱峰面积差异较为显著, 甚至消失, 这可能归因于不同企业所用的原料药材来源及炮制工艺的差异。

2.6 特征图谱的建立及色谱峰归属 根据样品测定的结果, 黄柏饮片共标示出 16 个特征峰; 黄柏炭饮片共标示出 5 个特征峰, 包括与黄柏饮片相同的 3 个共有峰及炒炭后新生成的 2 个特征峰。构建了黄柏及黄柏炭饮片的 HPLC 特征图谱, 可作为黄柏

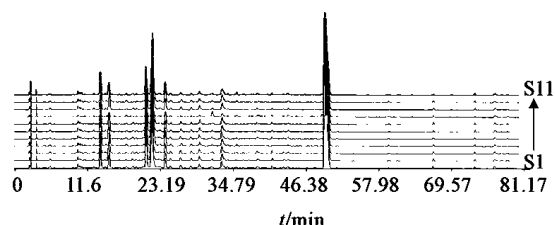


图 1 11 批黄柏饮片的 HPLC 特征谱
Fig. 1 HPLC specific chromatograms of 11 batches of Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces

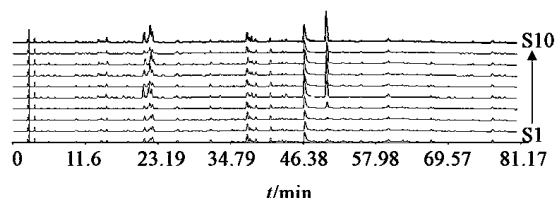
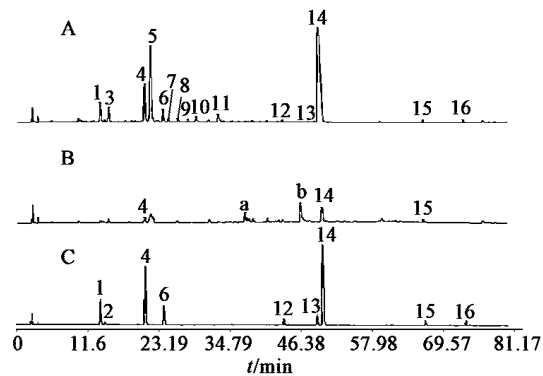


图 2 10 批黄柏炭饮片的 HPLC 特征谱
Fig. 2 HPLC specific chromatograms of 10 batches of charred Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces

及黄柏炭饮片的质量评价内容。此外, 通过与已知对照品对照, 黄柏饮片特征图谱中归属了 9 个特征峰, 分别为绿原酸、隐绿原酸、盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮, 而黄柏炭饮片特征图谱中仅归属了 3 个特征峰, 见图 3。



A. 黄柏; B. 黄柏炭; C. 混合对照品; 1. 绿原酸; 2. 隐绿原酸; 4. 盐酸黄柏碱; 6. 木兰花碱; 12. 盐酸药根碱; 13. 盐酸巴马汀; 14. 盐酸小檗碱; 15. 黄柏内酯; 16. 黄柏酮

图 3 黄柏及黄柏炭饮片的 HPLC 特征谱归属
Fig. 3 HPLC specific chromatograms of Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces and charred Phellodendri Chinensis Cortex decoction pieces

2.7 黄柏及黄柏炭饮片特征图谱的比较 通过对黄柏及黄柏炭饮片特征图谱的比较发现, 除黄柏内酯(峰 15)的变化幅度较小外, 在黄柏饮片中峰面积相对较高的盐酸黄柏碱(峰 4), 峰 5 和盐酸小檗碱(峰 14)在炒炭后峰面积分别降低了 6, 12, 10 倍, 1 ~ 3 号, 6 ~ 13 号和 16 号色谱峰几乎消失。黄柏和黄柏炭饮片特征图谱中仅有的 3 个共有峰(峰 4,

14,15) 的差异也极为显著,生品中峰 15,4,14 的峰面积比值为 1:17:109,而在炭品中 3 个共有峰面积比值为 1:2:10,炒炭前后色谱峰数目、峰面积及特征峰峰面积比值均发生显著变化,为黄柏和黄柏炭饮片的有效鉴别提供了量化指标。此外,与黄柏饮片相比,黄柏炭饮片的特征图谱中出现了 2 个新的色谱峰(a 和 b),特别是峰 b,图谱中显示其在黄柏炭饮片中的峰面积相对比例较高。通过紫外吸收发现,峰 b 与盐酸小檗碱的吸收较为相近,且黄柏炒炭后盐酸小檗碱色谱峰面积显著降低,推测这 2 种成分之间可能存在一定的关系。

2.8 盐酸小檗碱成分转化的模拟炮制验证 为了进一步分析黄柏炭特征图谱中色谱峰 b 与盐酸小檗碱的关系,采取单成分模拟炮制试验进行分析。精密称取盐酸小檗碱对照品 5 份,每份 0.5 g,置培养皿中,置于烘箱中,分别在 0,160,180,200,220 °C 加热 5 min 后取出,置干燥器内放冷后制备成相同质量浓度的盐酸小檗碱对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,见图 4。结果发现盐酸小檗碱经高温加热后含量逐渐下降,同时色谱峰 b 开始生成,并且随着温度的升高,峰 b 呈现明显的上升趋势,同时盐酸小檗碱经过高温加热后其外观性状也发生了明显的改变,随着加热温度的升高,盐酸小檗碱的颜色由黄色变为赤红色。通过与已知对照品对照,可以确定峰 b 是盐酸小檗碱的加热分解产物——小檗红碱,其结构转化见图 5,这与文献报道的结果相一致^[8]。

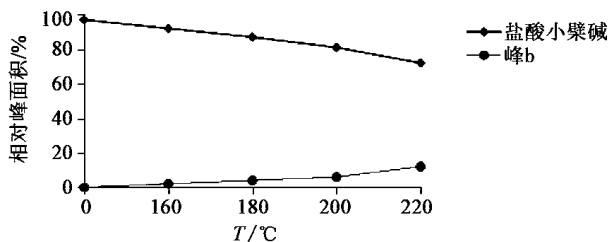


图 4 盐酸小檗碱在不同温度下的含量和转化分析
Fig. 4 Content and transformation analysis of berberine hydrochloride at different temperatures

3 讨论

在查阅文献的基础上^[9-11],本文考察了甲醇,乙酸-甲醇(1:100),盐酸-乙醇(1:100)3 种提取溶剂的提取效果,结果显示提取溶剂中加入盐酸会使主要色谱峰的稳定性大大降低,而以甲醇为提取溶剂时,各色谱峰的稳定性较好且峰形较尖锐,故选择甲醇为提取溶剂。同时考察了乙腈-0.2% 磷酸溶液、乙腈-0.4 mol·L⁻¹氯化铵溶液、乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液等流动相系统,结果发现

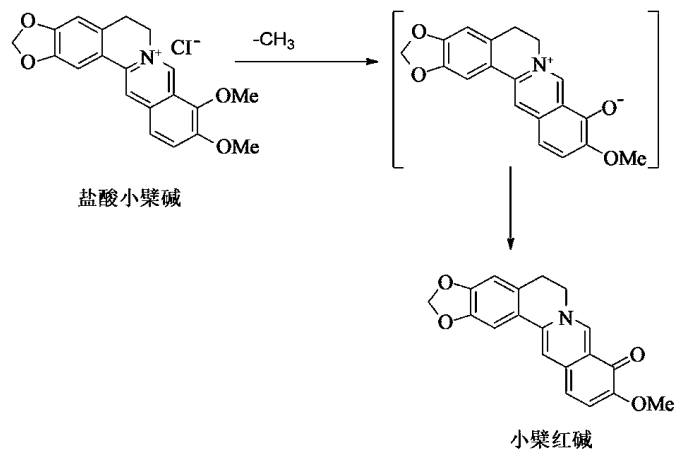


图 5 盐酸小檗碱的结构转化
Fig. 5 Structural transformation of berberine hydrochloride

乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液为流动相时,较前两者的色谱峰信息丰富,但盐酸黄柏碱和木兰花碱色谱峰无法得到有效的分离,所以尝试加入磷酸调节流动相的 pH,最终确定以乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 3.4)作为流动相,结果各成分色谱峰得到很好的分离。

通过对黄柏和黄柏炭饮片特征图谱的比较分析,发现黄柏炒炭后色谱峰数目明显减少,多数色谱峰面积随炒炭程度的加深而降低。此外,盐酸小檗碱在炒炭过程中受高温影响,一部分完全破坏,另一部分脱去 1 个甲基转变为小檗红碱,从而导致其含量显著降低。鉴于炮制前后生品和炭品的成分显著变化,应分别制定黄柏和黄柏炭饮片的质量评价标准。黄柏饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和绿原酸 3 种成分的相对比例较高,且具有药理活性,可作为指标性成分;而黄柏炭可选择黄柏内酯和小檗红碱作为质量控制的指标。本文采用 HPLC 建立了能同时归属出 9 个色谱峰的黄柏饮片特征图谱,通过色谱峰面积等量化指标比较了黄柏饮片炒炭前后特征图谱的变化差异,并采用单成分模拟炮制试验发现了黄柏炭饮片特征图谱中特有的成分——小檗红碱,为黄柏生、制品之间的鉴别增加了 1 个定性指标,提高了饮片质量评价和真伪鉴别的可靠性和专属性。

黄柏性味苦寒,具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之效;黄柏炭临床用于止血。结合现有研究报道^[12-13],苦味药多用于治热证,而黄柏饮片中所含的生物碱和柠檬苦素类成分是其苦寒药性的主要物质基础,但黄柏炒炭后这些成分已大部分分解或破坏,并有少量新物质生成,从而使其苦寒之性大减,收涩之性增强,这可能是导致其功效发生改变的主要原因。深入研究黄柏炒炭前后物质基础与其功效

的相关性,可为揭示黄柏饮片炮制原理、完善黄柏饮片质量评价标准等提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 寇兴明,徐敏,顾永祚,等.微波消解/ICP-MS法测定川黄柏中微量重金属元素[J].光谱学与光谱分析,2007,27(6):1197-1200.
- [2] Ryuk J A,ZHENG M S,Lee M Y, et al. Discrimination of *Phellodendron amurense* and *P. chinense* based on DNA analysis and the simultaneous analysis of alkaloids [J]. Arch Pharm Res,2012,35(6):1045-1054.
- [3] 陈阳峰,钟晓红.黄柏的药理作用及其活性成分提取[J].作物研究,2015,29(5):564-568.
- [4] 张冠英,董瑞娟,廉莲.川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J].沈阳药科大学学报,2012,29(10):812-821.
- [5] 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,2015:305-306.
- [6] 姜昕易,张晖芬,王胜男,等.ILs-HPLC同时测定黄柏中5种生物碱含量[J].中国中药杂志,2014,39(19):3808-3812.
- [7] 黄群莲,罗颖,李芹,等.黄柏配方颗粒高效液相色谱指纹图谱[J].医药导报,2016,35(10):1113-1116.
- [8] 祁东利,贾天柱,廉莲.黄柏炮制后化学成分转化研究[J].中成药,2010,32(3):443-447.
- [9] 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.
- [10] 徐珊,张凡,刘蓬蓬,等.黄柏及其不同炮制品的 HPLC 指纹图谱分析[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(3):10-13.
- [11] 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.
- [12] 岳琳,李丽,刘颖,等.关黄柏炒炭前后饮片化学成分的变化规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):7-11.
- [13] 董文博,王雪莹,杨洲.柠檬苦素的性质及其生理功能的研究进展[J].食品与发酵科技,2012,48(2):1-4.

[责任编辑 刘德文]