

HPLC 测定关黄柏中生物碱的含量

刘颖¹, 李世颂², 刘娟^{1*}

(1. 佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 佳木斯市药品检验所, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 同时测定黑龙江省 10 个不同产地关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀的含量。方法: HPLC 色谱条件, Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液 (25:75, 每 100 mL 加 0.10 g 十二烷基硫酸钠), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 345 nm, 柱温 30 ℃。结果: 盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀分别在 12.08 ~ 144.96 mg·L⁻¹ ($r=0.9993$), 1.60 ~ 25.60 mg·L⁻¹ ($r=0.9993$), 7.26 ~ 87.12 mg·L⁻¹ ($r=0.9993$) 线性关系良好, 3 种生物碱的平均回收率 ($n=9$) 分别为 102.51%, 103.47%, 102.89%。结论: 方法简便准确, 重复性好, 适用于黄柏类药材小檗碱、药根碱、巴马汀的含量测定; 不同产地关黄柏中生物碱含量差异较大。

[关键词] 高效液相色谱; 关黄柏; 小檗碱; 药根碱; 巴马汀; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0088-04

[doi] 10.11653/syjf2013160088

Determination of Alkaloids in Phellodendri Amurensis Cortex by HPLC

LIU Ying¹, LI Shi-song², LIU Juan^{1*}

(1. Pharmacy School, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;

2. Jiamusi Medicine Inspecting Institute, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** HPLC was used to measure the content of berberine, jatrorrhizine and palmatine in Phellodendri Amurensis Cortex from ten different areas of Heilongjiang Province simultaneously. **Method:** A Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisting of acetonitril-0.1% phosphonic acid (25:75, 0.10 g sodium lauryl sulfate was added per 100 mL). The flow rate was 1 mL·min⁻¹; the detecting wavelength was set at 345 nm, and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** The calibration curves of berberine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride and palmatine hydrochloride were linear within the ranges of 12.08-144.96 mg·L⁻¹ ($r=0.9993$), 1.60-25.60 mg·L⁻¹ ($r=0.9993$), 7.26-87.12 mg·L⁻¹ ($r=0.9993$) respectively. The average recoveries ($n=9$) were 102.51%, 103.47%, 102.89%, respectively. **Conclusion:** This method is proved to be convenient, reliable and accurate, it can be used in content determination of berberine, jatrorrhizine, palmatine in Phellodendri Amurensis Cortex. There are significant differences in the Alkaloid content in Phellodendri Amurensis Cortex from different areas.

[Key words] HPLC; Phellodendri Amurensis Cortex; berberine; jatrorrhizine; palmatine; content determination

黄柏为常用中药, 芸香科植物黄皮树及黄檗除去栓皮的干燥树皮, 前者习称“川黄柏”, 后者习称“关黄柏”^[1]。关黄柏性苦、味寒, 入肾、膀胱经, 具

有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的疗效, 其主要活性成分有小檗碱、巴马汀、药根碱、黄柏碱等生物碱类, 除此之外还有黄柏内酯、黄柏酮以及白鲜皮酯等

[收稿日期] 20130204(007)

[基金项目] 佳木斯大学研究生创新科研项目(YJSCX2012-035JD)

[第一作者] 刘颖, 硕士研究生, 从事生药(中药)鉴定、品质评价研究, Tel:15945881161, E-mail:liuying19861112@163.com

[通讯作者] * 刘娟, 教授, 硕士生导师, 从事生药学研究, Tel:0454-8610567, E-mail:liujuan1949@163.com

柠檬苦素类成分。临床上用于治疗湿热泻痢、黄疸、带下、热淋、痔漏、盗汗、遗精、骨蒸劳热、风疹瘙痒及疮疡后伤口感染属阳证者。关黄柏的药理作用目前已有大量的研究报道^[2-5],归纳起来有以下几个方面:抗细菌、真菌、病毒及其他病原微生物的作用;抗心律失常、降血压等对心血管系统的作用;对消化系统有抗消化道溃疡、收缩或舒张肠管、促进胰腺分泌等作用,并有中枢神经系统抑制、细胞免疫反应抑制、降血糖作用等。

关黄柏中生物碱含量测定的报道较多^[6-7],但针对黑龙江省不同产地关黄柏生物碱的含量测定则未见报道。现对黑龙江省10个不同产地实地采样,参照文献^[8-12]方法,测定其小檗碱、药根碱和巴马汀的含量,以期为黄柏质量标准体系的建立和完善提供科学依据。

1 材料

岛津 LC-10A PLUS 型高效液相色谱仪(LC-10ATvp Plus 输液单元、SPD-10Avp Plus 紫外-可见双波长检测、LCsolution Lite 中文化 LC 工作站),ALC-110.4 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),KQ-250DE 型超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司),乙腈、甲醇(色谱纯,德国默克公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

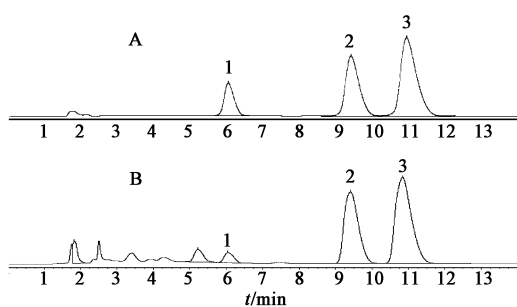
盐酸小檗碱(批号 20120521)、盐酸药根碱(批号 20120503)、盐酸巴马汀(批号 20120521)购于天津一方科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$ 。

关黄柏药材采于黑龙江省内的宁安市江东林场、桦南驼腰子林场、尚志市苇河林业局榆林林场、饶河县大岱林场、鸡西市四山林场、虎林市东方红林场、汤原县大亮子河林场、林口县林业局东升林场、伊春市红星林场、萝北县四方山林场共10个不同产地,采集时间为2011年7~8月,经佳木斯大学药学院生药学教研室刘娟教授鉴定为芸香科植物黄檗 *Phellodendri amurense* Rupr. 的干燥树皮。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(25:75, 每100 mL 加0.10 g 十二烷基硫酸钠),检测波长345 nm,流速1 mL·min⁻¹,柱温30 ℃,进样量10 μL。对照品、供试品溶液色谱图见图1。

2.2 供试品溶液的制备 取干燥关黄柏药材粉末(过3号筛)约0.20 g,精密称定,置于50 mL 锥形瓶中,加入50 mL 0.1% 的盐酸甲醇溶液,超声处理1 h



A. 对照品;B. 供试品;

1. 盐酸药根碱;2. 盐酸巴马汀;3. 盐酸小檗碱

图1 盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀 HPLC

(功率250 W,频率40 kHz),冷却至室温,定容至50 mL,摇匀静置,过滤,取滤液过0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品适量,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度241.60,64.00,145.20 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取2.3项下的对照品溶液盐酸小檗碱、盐酸巴马汀各1,2,3,4,5,6 mL,盐酸药根碱0.25,0.5,1,2,3,4 mL 分别置于10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。吸取上述对照品溶液,分别进样10 μL,记录对照品溶液色谱峰面积。以对照品溶液色谱峰面积(Y)为纵坐标,对照品溶液浓度(X, mg·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线并进行线性回归。 $Y_{\text{盐酸小檗碱}} = 2.4 \times 10^7 X + 60\ 875 (r = 0.999\ 3)$, $Y_{\text{盐酸药根碱}} = 2.5 \times 10^7 X + 9\ 125.6 (r = 0.999\ 3)$, $Y_{\text{盐酸巴马汀}} = 2.6 \times 10^7 X + 39\ 446 (r = 0.999\ 3)$ 。表明盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀分别在12.08~144.96,1.60~25.60,7.26~87.12 mg·L⁻¹线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取2.3项下的混和对照品溶液10 μL,注入液相色谱仪,在2.1项下的色谱条件,连续进样5次,测得盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀峰面积的RSD分别为0.49%,0.39%,0.52%,表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制样后的0,4,8,10,12,24 h 在2.1项下的色谱条件进样10 μL,盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀峰面积的RSD分别为1.10%,3.56%,1.10%,表明供试品溶液在24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批次关黄柏药材5份,每份0.2 g,按2.2项下的方法制备供试品溶液,在2.1项色谱条件下进样10 μL,盐酸小檗碱、

盐酸药根碱、盐酸巴马汀含量的 RSD 分别为 2.10% ,1.59% ,1.61% ,表明该法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量批次的关黄柏药材 0.1 g,分别精密加入低、中、高 3 个浓度的盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品溶液适量,按 2.2 项下的方法制备供试品溶液,在 2.1 项下的色谱条件进样 10 μL,结果见表 2~4。

表 2 盐酸小檗碱的加样回收率测定

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
1.052	0.604	1.688	105.30		
1.051	0.604	1.677	103.64		
1.054	0.604	1.680	103.64		
1.055	1.208	2.282	101.57		
1.053	1.208	2.256	99.59	102.51	2.00
1.054	1.208	2.263	100.08		
1.051	1.812	2.891	101.54		
1.051	1.812	2.955	105.08		
1.053	1.812	2.904	102.15		

表 3 盐酸药根碱的加样回收率测定

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
0.082	0.040	0.123	102.50		
0.083	0.040	0.124	102.50		
0.083	0.040	0.125	105.00		
0.082	0.080	0.167	106.25		
0.083	0.080	0.168	106.25	103.47	2.22
0.083	0.080	0.167	105.00		
0.083	0.160	0.246	101.87		
0.081	0.160	0.245	102.50		
0.084	0.160	0.243	99.38		

表 4 盐酸巴马汀的加样回收率测定

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
0.724	0.363	1.104	104.68		
0.723	0.363	1.106	105.51		
0.725	0.363	1.102	103.86		
0.725	0.726	1.467	102.20		
0.719	0.726	1.451	100.83	102.89	1.66
0.725	0.726	1.452	100.14		
0.722	1.089	1.842	102.85		
0.721	1.089	1.843	103.03		
0.723	1.089	1.844	102.94		

2.9 关黄柏药材样品测定 精密称取各批次关黄柏药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,在 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 5。

表 5 黑龙江省不同产地关黄柏药材 3 种生物碱含量测定 (n=3) %

No.	来源	盐酸小檗碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀
1	宁安	2.30	0.07	1.65
2	桦南	1.20	0.20	1.25
3	尚志	0.93	0.12	0.38
4	饶河	1.00	0.08	0.78
5	鸡西	0.43	0.07	0.30
6	虎林	0.78	0.14	0.50
7	汤原	1.40	0.21	0.25
8	林口	1.10	0.07	0.73
9	伊春	0.48	0.12	0.30
10	萝北	1.20	0.11	0.55

3 讨论

在前期测定波长考察过程中,以 345 nm 作为检测波长,发现此波长处小檗碱、药根碱、巴马汀检测灵敏度高,故检测波长确定为 345 nm。

比较了甲醇、60% 乙醇、0.1% 盐酸甲醇等 3 种提取溶剂,测定峰面积结果表明 0.1% 盐酸甲醇作为提取溶剂,提取效果最佳,故作为关黄柏药材的提取溶剂。

比较了不同比例流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液 (45:55,30:70,25:75 等),结果显示除正文所采用的流动相比例外,采用其他比例的流动相,峰的分离度不好且峰形较差,所以采用正文所使用的方法。

对黑龙江省不同产地关黄柏的 3 种生物碱含量同时进行了测定。结果不同产地关黄柏中 3 种生物碱的含量差异较大,产自宁安市关黄柏中的盐酸小檗碱、汤原县关黄柏中的盐酸药根碱、宁安市关黄柏中的盐酸巴马汀含量分别为最高。但不能仅以此结果简单的判断某地产关黄柏药材质量的优劣,因为关黄柏药材中生物碱的含量与药材的生长环境、采收时间等因素有关,其影响如何,有待进一步深究。

[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, 2010:137.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:664.

清肾颗粒中黄连的定性鉴别和定量分析

石金敏^{1,2}, 魏良兵³, 李烧烧^{1*}, 贾陆², 张志杰¹, 顾雪竹¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450003;
3. 安徽中医学院第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] 目的:制订清肾颗粒中黄连质量标准。方法:采用薄层色谱鉴别法对黄连进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定黄连中盐酸小檗碱的含量。色谱条件:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.033 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(25:75)为流动相,检测波长 345 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。结果:在实验条件下,薄层斑点清楚,阴性无干扰,分离效果较好,重复性良好。HPLC 方法学考察表明制剂中盐酸小檗碱在 0.028~0.892 μg($r = 0.9999$)峰面积与其进样量线性关系良好,平均回收率为 100.16%,RSD 1.87%($n = 6$)。结论:该方法准确、快速,可重复性好,可用于清肾颗粒中黄连的质量控制。

[关键词] 清肾颗粒; 黄连; 盐酸小檗碱; 薄层色谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0091-03

[doi] 10.11653/syfy2013160091

Study on Qualitation and Quantitation of *Coptis chinensis* in the Qingshen Granule

SHI Jin-min^{1,2}, WEI Liang-bin³, LI Rao-rao^{1*}, JIA Lu², ZHANG Zhi-jie¹, GU Xue-zhu¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China;
3. First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To study quality standard of *Coptis chinensis* in the Qingshen granule. **Method:**

[收稿日期] 20130214(003)

[基金项目] 中国中医科学院自选课题(ZZ2006096,2011xycz-12);北京自然科学基金面上项目(7112097)

[第一作者] 石金敏,硕士研究生,从事生药学研究,E-mail: weian510@163.com

[通讯作者] *李烧烧,从事中药炮制研究,Tel:010-64014411-2975,E-mail: leeraoao@163.com

- [3] 侯小涛,戴航,周江煜. 黄柏的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2):498.
- [4] 李峰,贾彦竹. 黄柏的临床药理作用[J]. 中医药临床杂志, 2004, 16(2):191.
- [5] 万德光. 中药品种品质与药效[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2007:813.
- [6] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 黄柏总生物碱提取方法及工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):3.
- [7] 张倩,蔡丽芬,钟国跃,等. RP-HPLC 法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):2061.
- [8] 徐敏,万德光. 不同产地和生长年限川黄柏中小檗碱的含量测定[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(1):93.
- [9] 沈娟,尹莲,段金廛. HPLC 法测定黄柏生物碱成分含量及在二妙丸类方中的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):31.
- [10] 王瑾. RP-HPLC 法测定黄柏中小檗碱、巴马汀和药根碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4):610.
- [11] 赵君颖,汪坤,张振杰. 一测多评法比较不同黄连炮制品中 4 种生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):11.
- [12] 夏荃,李灿明. HPLC 测定黄柏生品与不同炮制品中 3 种生物碱的含量[J]. 中成药, 2008, 30(7):1018.

[责任编辑 顾雪竹]