

双波长 HPLC 同时测定黄连 及金芪降糖片中 6 种生物碱的含量

陈芳, 邓雁如*, 许妍妍, 夏娜, 高瓔

(天津中医药大学, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定黄连及金芪降糖片中木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种生物碱含量的方法。方法: Waters Symmetry Shield™ RP₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺) (A)-水 (0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺) (B) 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 345, 270 nm, 柱温 25 °C。结果: 木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀及盐酸小檗碱线性范围分别为 0.012 06 ~ 0.241 2, 0.038 24 ~ 0.764 8, 0.088 02 ~ 1.760 4, 0.016 55 ~ 0.331 0, 0.036 08 ~ 0.721 6, 0.189 41 ~ 3.788 2 μg ($r \geq 0.999 8$), 平均加样回收率 95% ~ 105%。结论: 方法专属性强、灵敏度高、重复性好、简便易行, 可用于同时测定黄连及金芪降糖片中木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量, 可为金芪降糖片的现代制剂研究和质量控制提供依据。

[关键词] 金芪降糖片; 黄连; 木兰花碱; 表小檗碱; 黄连碱; 盐酸药根碱; 盐酸巴马汀; 盐酸小檗碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0060-06

[doi] 10.11653/syjf2013170060

Simultaneous Determination of Six Alkaloids in Coptidis Rhizoma and Jinqi Jiangtang Tablets by Double Wavelengths and HPLC

CHEN Fang, DENG Yan-ru*, XU Yan-yan, XIA Na, GAO Ying

(Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Analysis, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for simultaneous determination of magnoflorine, epiberberine, coptisine, jatronhizine, palmatine and berberine in Coptidis Rhizoma and Jinqi Jiangtang Tablets. **Method:** The chromatographic conditions were: Waters Symmetry Shield™ RP₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile (0.3% formic acid and 0.3% triethylamine) (A) and water (0.3% formic acid and 0.3% triethylamine) (B) as mobile phases for gradient elution; flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 345 nm and 270 nm and the column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** The linear ranges of magnoflorine, epiberberine, coptisine, jatronhizine, palmatine and berberine were 0.012 06-0.241 2, 0.038 24-0.764 8, 0.088 02-1.760 4, 0.016 55-0.331 0, 0.036 08-0.721 6, 0.189 41-3.788 2 μg ($r \geq 0.999 8$). The average recoveries were between 95% -105%. **Conclusion:** This is a specific, sensitive, repeatable and simple method for determining magnoflorine, epiberberine, coptisine, jatronhizine, palmatine and berberine in Coptidis Rhizoma and Jinqi Jiangtang Tablets. The method is available for the quality control of Jinqi Jiangtang Tablets.

[Key words] Jinqi Jiangtang Tablets; Coptidis Rhizoma; magnoflorine; epiberberine; coptisine; jatronhizine; palmatine; berberine

[收稿日期] 20121019(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073033); 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB523003)

[第一作者] 陈芳, 在读硕士研究生, 从事药物分析研究, Tel: 15350707697, E-mail: chen34@163.com

[通讯作者] * 邓雁如, 教授, 从事中药化学研究, Tel: 022-59596221, E-mail: dyanru@sina.com

金芪降糖片是由黄连、金银花和黄芪组成的一种纯中药制剂,具有清热益气,生津止渴等功效,主要用于气阴两虚并有内热症候的糖尿病患者。主要活性成分为黄连中含有的多种生物碱类成分,包括小檗碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱、药根碱、木兰花碱及非洲防己碱等。2010 年版《中国药典》黄连含量测定项是以小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀为指标成分^[1]。目前,对金芪降糖片中生物碱含量测定的报道中最多只测定了 3 种生物碱(药根碱、巴马汀、小檗碱)^[2]。为体现中药制剂多成分、多途径、多靶点的作用特点,本实验建立了双波长 HPLC 梯度洗脱法同时测定黄连及金芪降糖片中木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种生物碱成分的含量,为进一步完善金芪降糖片的质量控制方法提供依据。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪,2998 PDA 检测器(美国 Waters 公司),KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Sartorius LE225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);盐酸小檗碱(批号 110713-200910)、盐酸药根碱(批号 110732-200907)和盐酸巴马汀(批号 110733-200806)对照品购自于中国药品生物制品检定所,木兰花碱(批号 M-026-110623)购自于成都瑞芬思生物科技有限公司,黄连碱和表小檗碱对照品为本实验室自制,质量分数均 >98%。黄连药材由天津市中新药业提供(批号 10101701, 10122001, 11041304, Y0905146, Y0910340, Y1001039, Y1001050, Y1002076, Y1004146, Y1004150, Y1110226),经天津中医药大学马琳教授鉴定为黄连药材 *Coptidis Rhizoma*。金芪降糖片为市售(天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂,批号 0902417, 0902422, 0904435, 0905459, 0910498, 0911475, 0912506, 1001514, 1103628, 1105655, 1108683),缺黄连阴性对照样品(自制)。乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析纯(天津市江天化工技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symmetry ShieldTM RP₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺)(A)-水(0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺)(B),梯度洗脱(0~10 min, 16% A; 10~20 min, 16%~19% A; 20~26 min, 19% A; 26~50 min, 19%~42% A; 50~60 min, 42%~100% A),体积流

量 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 345, 270 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取木兰花碱 4.02 mg,表小檗碱 4.78 mg,黄连碱 3.26 mg,盐酸药根碱 3.31 mg,盐酸巴马汀 4.51 mg,盐酸小檗碱 4.03 mg,置 10 mL 量瓶中,用盐酸-甲醇(1:99)溶解稀释,配制成分别为 0.402, 0.478, 0.326, 0.331, 0.451, 0.403 g·L⁻¹的母液。分别移取木兰花碱母液 0.3 mL,表小檗碱母液 0.8 mL,黄连碱母液 2.7 mL,盐酸药根碱母液 0.5 mL,盐酸巴马汀母液 0.8 mL,盐酸小檗碱母液 4.7 mL 于同一 10 mL 量瓶中,用盐酸-甲醇(1:99)定容至刻度,摇匀,即得。

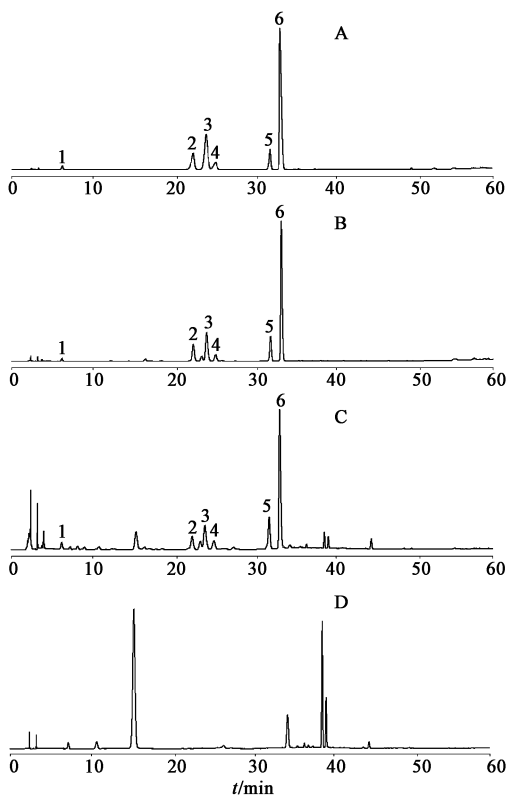
2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 黄连药材提取液的制备 黄连药材 60 ℃干燥 2 h,粉碎,过 60 目筛,混合均匀,称取样品 0.1 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加盐酸-甲醇(1:99)约 49 mL,超声提取 1 h,冷却至室温,加盐酸-甲醇(1:99)至刻度,摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液为供试液,按 2.1 项下色谱条件测定。以木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种生物碱的对照品确定色谱峰的归属,外标一点法定量。

2.3.2 金芪降糖片提取液的制备 取同一批号的金芪降糖片 20 片,除去包衣,称取平均片重,粉碎,过 60 目筛,混合均匀,称取 0.5 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加盐酸-甲醇(1:99)约 49 mL,超声提取 1 h,冷却至室温,加盐酸-甲醇(1:99)至刻度,摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液为供试液,按 2.1 项下色谱条件测定。以木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种生物碱的对照品确定色谱峰的归属,外标一点法定量。

2.4 阴性样品溶液的制备 取除黄连以外的各原药材,按 2.3.2 项下方法制备金芪降糖片的阴性对照液,并在 2.1 项下色谱条件进行测定。结果表明,本试验条件下,金芪降糖片中的黄芪、金银花对实验结果没有影响。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取对照品混合液 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积。以对照品的进样量为横坐标($X, \mu\text{g}$),以峰面积为纵坐标(Y)分别得到 6 种成分的回归方程(表 1),结果表明 6 个成分在各自线性范围内,峰面积值与进样量具有良好的线性关系。



A. 混和对照品; B. 黄连; C. 金芪降糖片; D. 缺黄连阴性对照液;
1. 木兰花碱; 2. 表小檗碱; 3. 黄连碱;
4. 盐酸药根碱; 5. 盐酸巴马汀; 6. 盐酸小檗碱

图1 混合对照品、黄连、金芪降糖片及缺黄连阴性对照液的HPLC

表1 6种成分的回归方程和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
木兰花碱	$Y = 1.631 \times 10^6 X + 7.666 \times 10^3$	0.999 8	0.012 06 ~ 0.241 2
表小檗碱	$Y = 3.979 \times 10^6 X - 2.548 \times 10^4$	0.999 8	0.038 24 ~ 0.764 8
黄连碱	$Y = 3.826 \times 10^6 X - 6.465 \times 10^4$	0.999 9	0.088 02 ~ 1.760 4
盐酸药根碱	$Y = 4.672 \times 10^6 X - 1.305 \times 10^4$	0.999 8	0.016 55 ~ 0.331 0
盐酸巴马汀	$Y = 3.563 \times 10^6 X - 2.662 \times 10^4$	0.999 9	0.036 08 ~ 0.721 6
盐酸小檗碱	$Y = 4.239 \times 10^6 X - 1.296 \times 10^5$	0.999 9	0.189 41 ~ 3.788 2

2.6 精密度试验

2.6.1 黄连药材 精密称取同一批黄连粉末 0.1 g, 按 2.3.1 项下制备黄连的提取液, 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算。木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.12%、2.26%、2.27%、2.21%、2.35%、2.23%。

2.6.2 金芪降糖片 精密称取同一批金芪降糖片粉末 0.5 g, 按 2.3.2 项下制备金芪降糖片的提取液, 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面

积, 计算。木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 2.24%、0.18%、1.15%、1.15%、0.76%、1.23%。

2.7 稳定性试验

2.7.1 黄连 精密称取同一批黄连粉末 0.1 g, 按 2.3.1 项下制备黄连的提取液, 按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样, 测定峰面积, 计算。木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 2.46%、1.80%、1.76%、1.73%、1.84%、1.74%。

2.7.2 金芪降糖片 精密称取同一批金芪降糖片粉末 0.5 g, 按 2.3.2 项下制备金芪降糖片的提取液, 并在 2.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样, 测定峰面积, 计算。木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 2.02%、1.07%、1.17%、1.40%、0.96%、0.77%。

2.8 重复性试验

2.8.1 黄连 精密称取同一批次黄连粉末 6 份, 各 0.1 g, 按 2.3.1 项下制备黄连的提取液, 并在 2.1 项下色谱条件进样, 测定峰面积, 计算。木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量的 RSD 分别为 1.66%、1.59%、1.45%、1.64%、1.66%、1.51%。

2.8.2 金芪降糖片 精密称取同一批次金芪降糖片粉末 6 份, 各 0.5 g, 按 2.3.2 项下制备金芪降糖片的提取液, 并在 2.1 项下色谱条件进样, 测定峰面积, 计算。木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量的 RSD 分别为 2.74%、1.55%、1.91%、2.63%、1.38%、1.58%。

2.9 加样回收率试验

2.9.1 黄连 精密称取已知含量的黄连粉末 9 份, 各 0.05 g, 加入各对照品的量相当于黄连中各对照品量的 80%、100%、120%。按 2.3.1 项下制备黄连提取液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以外标法计算各成分的含量及回收率, 见表 2。

2.9.2 金芪降糖片 精密称取已知含量的金芪降糖片粉末 9 份, 每份 0.25 g, 加入各对照品的量相当于金芪降糖片中各对照品量的 80%、100%、120%。按 2.3.2 项下制备金芪降糖片的提取液, 并在 2.1 项下色谱条件进行测定, 以外标法计算各成分的含量, 计算回收率, 见表 3。

2.10 样品的含量测定

2.10.1 黄连药材的含量测定 精密称取不同批次

表 2 黄连药材加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
木兰花碱	0.281	0.225	0.503	98.7	99.0	2.19
	0.281	0.225	0.497	96.0		
	0.282	0.225	0.512	102.2		
	0.281	0.281	0.566	101.4		
	0.283	0.281	0.561	98.9		
	0.281	0.281	0.564	100.7		
	0.282	0.338	0.608	96.4		
	0.282	0.338	0.618	99.4		
	0.281	0.338	0.610	97.3		
	表小檗碱	0.640	0.512	1.157		
0.640		0.512	1.142	98.0		
0.641		0.512	1.146	98.6		
0.640		0.640	1.255	96.1		
0.644		0.640	1.289	100.8		
0.640		0.640	1.259	96.7		
0.643		0.769	1.402	98.7		
0.641		0.769	1.396	98.2		
0.640		0.769	1.377	95.8		
黄连碱		1.093	0.874	1.977	101.1	100.2
	1.093	0.874	1.957	98.9		
	1.095	0.874	1.963	99.3		
	1.092	1.092	2.154	97.3		
	1.099	1.092	2.225	103.1		
	1.092	1.092	2.211	102.5		
	1.098	1.312	2.413	100.2		
	1.095	1.312	2.381	98.0		
	1.093	1.312	2.422	101.3		
	盐酸药根碱	0.232	0.186	0.424	103.2	
0.232		0.186	0.413	97.3		
0.232		0.186	0.417	99.5		
0.232		0.232	0.462	99.1		
0.233		0.232	0.455	95.7		
0.232		0.232	0.467	101.3		
0.233		0.278	0.506	98.2		
0.232		0.278	0.516	102.2		
0.232		0.278	0.511	100.4		
盐酸巴马汀		0.990	0.792	1.792	101.3	100.9
	0.990	0.792	1.811	103.7		
	0.992	0.792	1.807	102.9		

续表 2

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%	
木兰花碱	0.990	0.990	1.974	99.4	97.9	2.12	
	0.996	0.990	2.008	102.2			
	0.990	0.990	1.967	98.7			
	0.995	1.189	2.163	98.2			
	0.992	1.189	2.205	102.0			
	0.991	1.189	2.176	99.7			
	盐酸小檗碱	3.545	2.836	6.291			96.8
		3.545	2.836	6.333			98.3
		3.550	2.836	6.417			101.1
		3.543	3.543	7.108			100.6
3.564		3.543	6.930	95.0			
3.542		3.543	7.066	99.5			
3.560		4.255	7.690	97.1			
3.552		4.255	7.677	96.9			
3.546		4.255	7.638	96.2			

表 3 金芪降糖片加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
木兰花碱	0.386	0.309	0.683	96.1	99.0	1.93
	0.386	0.309	0.691	98.7		
	0.386	0.309	0.688	97.7		
	0.386	0.386	0.782	102.6		
	0.386	0.386	0.774	100.5		
	0.386	0.386	0.769	99.2		
	0.386	0.463	0.843	98.7		
	0.386	0.463	0.837	97.4		
	0.386	0.463	0.850	100.2		
	表小檗碱	0.497	0.397	0.901		
0.497		0.397	0.884	97.5		
0.497		0.397	0.890	99.0		
0.497		0.497	0.993	99.8		
0.497		0.497	0.978	96.8		
0.497		0.497	1.005	102.2		
0.497		0.596	1.111	103.0		
0.497		0.596	1.102	101.5		
0.497		0.596	1.094	100.2		
黄连碱		0.914	0.731	1.637	98.9	99.3
	0.914	0.731	1.624	97.1		
	0.913	0.731	1.631	98.2		

续表 3

成分	样品含量 /mg	加入对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
	0.913	0.913	1.832	100.7		
	0.914	0.913	1.812	98.4		
	0.913	0.913	1.795	96.6		
	0.913	1.096	2.010	100.1		
	0.913	1.096	2.023	101.3		
	0.913	1.096	2.037	102.6		
盐酸药根碱	0.204	0.163	0.363	97.5	100.1	2.40
	0.204	0.163	0.361	96.3		
	0.204	0.163	0.371	102.5		
	0.204	0.204	0.412	102.0		
	0.204	0.204	0.404	98.0		
	0.204	0.204	0.407	99.5		
	0.204	0.244	0.456	103.3		
	0.204	0.244	0.451	101.2		
	0.204	0.244	0.450	100.8		
盐酸巴马汀	0.927	0.741	1.665	99.6	101.1	1.97
	0.927	0.741	1.658	98.7		
	0.926	0.741	1.676	101.2		
	0.926	0.926	1.887	103.8		
	0.927	0.926	1.874	102.3		
	0.927	0.926	1.881	103.0		
	0.927	1.112	2.020	98.3		
	0.927	1.112	2.043	100.4		
	0.926	1.112	2.069	102.8		
盐酸小檗碱	3.343	2.673	6.018	100.1	98.8	1.78
	3.344	2.673	6.043	101.0		
	3.341	2.673	6.009	99.8		
	3.341	3.340	6.602	97.6		
	3.343	3.340	6.570	96.6		
	3.341	3.340	6.618	98.1		
	3.341	4.010	7.338	99.7		
	3.342	4.010	7.374	100.5		
	3.341	4.010	7.196	96.1		

黄连粉末各 0.1 g, 按 2.3.1 项下制备黄连提取液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 结果见表 4。

2.10.2 金芪降糖片的含量测定 精密称取不同批次金芪降糖片粉末 0.5 g, 按 2.3.2 项下制备金芪降糖片提取液, 并在 2.1 项下色谱条件进行测定, 结果见表 5。

表 4 黄连药材测定 (n=3)

批号	木兰花碱	表小檗碱	黄连碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱
10092001	5.611	12.776	21.808	4.627	19.761	70.735
10101701	3.051	13.754	21.860	4.774	20.979	57.671
10122001	4.188	12.413	27.583	5.012	23.179	67.407
11041304	4.353	12.862	19.488	4.098	18.858	60.200
Y0905146	2.967	11.727	18.675	4.544	14.702	60.004
Y0910340	4.642	10.606	15.708	4.420	19.496	53.514
Y1001039	5.565	11.532	18.407	4.997	20.433	71.019
Y1001050	4.545	7.020	19.616	3.300	12.457	51.151
Y1002076	5.159	13.588	20.282	4.482	17.804	66.182
Y1004146	4.212	11.531	24.238	4.457	17.062	53.990
Y1004150	4.404	7.545	26.564	4.627	18.057	53.146
Y1110226	3.877	7.426	22.314	4.339	13.680	54.613

表 5 金芪降糖片含量测定 (n=3)

批号	木兰花碱	表小檗碱	黄连碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱
0902417	0.661	0.909	1.614	0.335	1.543	5.577
0902422	0.557	0.829	1.531	0.319	1.418	5.027
0904435	0.701	0.949	1.897	0.404	1.859	6.780
0905459	0.643	0.700	1.434	0.298	1.558	5.436
0910498	0.567	0.966	1.652	0.319	1.560	5.675
0911475	0.612	0.788	1.447	0.323	1.469	5.297
0912506	0.663	1.120	2.059	0.434	1.848	6.778
1001514	0.554	0.878	1.613	0.340	1.473	5.421
1103628	0.536	0.959	1.798	0.361	1.601	5.761
1105655	0.547	0.709	1.380	0.295	1.463	4.996
1108683	0.561	0.686	1.479	0.290	1.600	5.563

3 讨论

黄连中含有多种生物碱, 包括小檗碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱、药根碱、木兰花碱及非洲防己碱等, 其中小檗碱含量最高。目前, 黄连中生物碱含量测定的方法中最常用的是高效液相色谱法, 大部分仅测定了 3~5 种生物碱^[3-7]。耿志鹏等同时测定了黄连中药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱 6 种生物碱的含量^[8]。而对木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种生物碱同时进行测定则未见报道。由表 4 可以看出 12 批黄连药材中, 有 6 批木兰花碱的含量高于盐酸药根碱, 11 批金芪降糖片中木兰花碱的含量均高于盐酸药根碱。本试验首次通过双波长同时测

定黄连药材及金芪降糖片中木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种生物碱的含量,而且分离度良好,专属性强,灵敏度高,方法简便、准确,可用于黄连及金芪降糖片中生物碱的含量测定,为金芪降糖片的现代制剂研究和质量控制提供依据。

流动相的选择:2010 年版药典测定黄连中生物碱含量的方法为高效液相色谱法,其流动相为乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g,再以磷酸调节 pH 4.0)^[1]。由于十二烷基硫酸钠不易冲洗干净,且对色谱柱损伤较大,出于对色谱柱的保护,不选择药典中的流动相。王静竹等测定 3 种中成药中小檗碱和巴马汀的含量试验中选用的流动相为甲醇-乙腈-0.02 mol·L⁻¹ H₃PO₄ 溶液(10:28:62)^[9],此流动相为三元系统较复杂,且不能同时分离 6 种生物碱。试验中考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈(0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺)-水(0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺)、乙腈-0.2% 碳酸氢铵水溶液、乙腈-0.2% 氯化铵水溶液。综合峰型及峰的数量,最终确定选用乙腈(0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺)-水(0.3% 甲酸和 0.3% 三乙胺)。

检测波长的选择:通过三维图谱提取表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的光谱,表明这 5 种生物碱在 345,273 nm 具有最大吸光度。通过三维图谱提取木兰花碱光谱表明木兰花碱在 345 nm 无吸收,但其在 270,302 nm 有最大吸收,且 270 nm 的吸光度 > 302 nm。其余 5 种生物碱在 302 nm 的吸光度较小。从色谱图看,以 270 nm 为检测波长时,木兰花碱的含量变化和峰面积响应以及线性关系都较好;以 302 nm 为检测波长时,6 种生物碱的丰度均较小,基线波动较大;以 345 nm 为检测波长时,基线平稳,除木兰花碱以外的 5 种生物碱丰度较高,且 5 种生物碱的含量变化和峰面积响应以及线性关系都优于 270 nm。因此,选择 345 nm 检测表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱,270 nm 检测木兰花碱。选用双波长进行测定可使各被测成分均有最大吸收,赵静宜、刘嘉坤等均选用双波长进行测定^[10-11]。

采用高效液相色谱法对 12 批黄连、11 批金芪降糖片进行了检测,建立了同时测定黄连和金芪降糖片中木兰花碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的方法,本方法结果可靠、专属性强、灵敏度高、重复性好、简便易行,为进一步完善金芪降糖片的质量控制方法提供了依据。

[致谢]天津中医药大学马琳教授对黄连药材鉴定;天津中医药大学许妍妍老师、王晖老师提供仪器。

[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, 2010:285.
- [2] 宁娜,周晶,刘芳,等. RP-HPLC 同时测定黄连及金芪降糖片中 3 种小檗型生物碱[J]. 中成药, 2009, 31(9):551.
- [3] 崔国辉,袁汉尧,周克元. RP-HPLC 测定 3 种黄连中的生物碱含量[J]. 海南医药, 2010, 21(6):4.
- [4] 袁久荣,魏英勤,袁浩,等. RP-HPLC 法同时测定黄连中 4 种原小檗型生物碱的含量[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(6):36.
- [5] 龚千锋,杨金梅,郑晗. RP-HPLC 同时测定黄连及酒黄连中 3 种生物碱的含量[J]. 江西中医学院学报, 2009, 21(4):41.
- [6] 叶玉兰,赵莘莘,罗泽澜. 黄连及其炮制品中 5 种生物碱含量测定[J]. 中成药, 1996, 18(9):16.
- [7] 赵君颖,汪坤,张振凌,等. 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.
- [8] 耿志鹏,郑海杰,张艺,等. RP-HPLC 法测不同产地黄连中 6 种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19):2576.
- [9] 王静竹,刘舒平,赵鹏. 3 种中成药中小檗碱和巴马汀的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(1):2.
- [10] 赵静宜,陆洋,杜守颖,等. 双波长 HPLC 同时测定延胡索中 3 种生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):107.
- [11] 龚卫红,赵希贤. 双波长高效液相色谱法测定山茱萸中多种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):58.

[责任编辑 顾雪竹]