

HPLC同时测定黄柏中6种化学成分含量

廉莲^{1*}, 万国盛², 贾伟利², 高慧媛²

(1. 辽宁科技学院生物医药与化学工程学院, 辽宁 本溪 117004;
2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立川黄柏、关黄柏中6种有效成分含量的同时测定方法。方法:以HPLC采用Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),乙腈-水(1%乙酸, 2 mmol 醋酸铵)为流动相梯度洗脱,检测波长280 nm,柱温25℃,流速1 mL·min⁻¹。结果:绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱分别在20.00~320.00, 18.75~130.00, 25.00~200.00, 5.00~100.00, 20.00~200.00, 0.09~1.80 mg·L⁻¹峰面积和质量浓度线性关系良好($r \geq 0.999 0$),平均加样回收率分别为98.1%, 99.4%, 97.5%, 97.3%, 104.0%, 98.5%, RSD分别为0.5%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.4%, 0.9%。结论:含量测定方法简便、稳定、重复性好,为黄柏药材质量控制和评价提供了依据。

[关键词] 黄柏; 绿原酸; 黄柏碱; 木兰花碱; 药根碱; 巴马汀; 小檗碱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0094-04

Simultaneous Determination of Six Components in Huangbai by HPLC

LIAN Lian^{1*}, WAN Guo-sheng², JIA Li-wei², GAO Hui-yuan²

(1. Biological Pharmaceutical and Chemical Engineering School, Liaoning Institute of Science and Technology, Benxi 117004, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for simultaneous determination of 6 active components. **Method:** Simultaneous determination of chlorogenic acid, phellodendrine, magnoflorine, jatrorrhizine, palmatine and berberine in Huangbai was carried out by HPLC. A Diamonsil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase was acetonitrile-water (1% acetic acid, 2 mmol ammonium acetate) solution in gradient elution. The detection wavelength was set at 280 nm, the column temperature was kept at 25℃ and the flow rate was 1 mL·min⁻¹. **Result:** The linear range of chlorogenic acid, phellodendrine, magnoflorine, jatrorrhizine, palmatine and berberine was 20.00-320.00, 18.75-130.00, 25.00-200.00, 5.00-100.00, 20.00-200.00, 0.09-1.80 mg·L⁻¹ separately. The average recovery was 98.1%, 99.4%, 97.5%, 97.3%, 104.0%, 98.5% separately; and RSD was 0.5%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.4%, 0.9% separately. **Conclusion:** The method is convenient, stable, reliable and suitable for quality control of Huangbai.

[Key words] Huangbai; chlorogenic acid; phellodendrine; magnoflorine; jatrorrhizine; palmatine; berberine; determination

黄柏为芸香科植物黄檗黄皮树的干燥树皮,习称为“关黄柏”(PA)和“川黄柏”(PC)^[1]。川黄柏主产于湖北、湖南西北部、四川东部;关黄柏主产于东北和华北各省,河南、安徽北部、宁夏也有分布,内蒙古有少量栽种^[2]。

黄柏始载于《神农本草经》,原名“檗木”,列为上品^[3]。《中国药典》1995年版(一部)在黄柏药材项下列出黄柏来源为川黄柏和关黄柏,并做了性状

[收稿日期] 20120717(009)

[基金项目] 辽宁省博士科研启动基金项目(20101049);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2011129)

[通讯作者] *廉莲,副教授,博士,从事中药活性成分及中药炮制原理研究, Tel: 0414-5861231, E-mail: lotus0216@126.com

描述。随着研究的深入,自2005年版《中国药典》一部开始将“川黄柏”和“关黄柏”分列为两种药材,但对其功能主治叙述相同。即二者性味苦寒,有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮、退虚热等作用,临床常用于治疗湿热痢疾、泄泻、黄疸、骨蒸劳热、皮肤湿疹等病症^[4]。

虽然药典主述川、关黄柏有相同的功效和性味,但随着现代分析技术的进步,二者在成分构成及含量上还存在差异,进而在药理、生物活性上有不同的侧重。为对二者的主要活性成分生物碱、酚酸等有进一步认识,更好的控制两种黄柏药材的质量,我们参考了有关文献^[5-10]采用高效液相色谱法对2种黄柏6种共有成分建立了同时进行含量测定的方法,并对含量进行了测定。

1 仪器与试剂

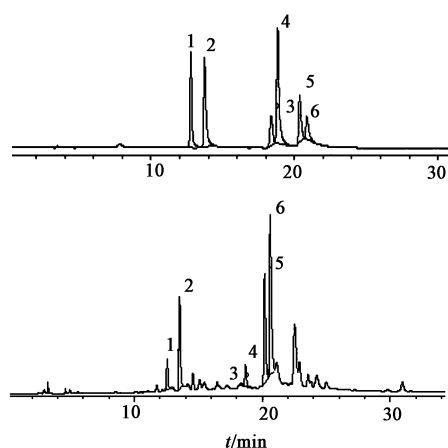
LC-20AB型高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-M20A PDA 检测器(日本岛津公司),Diamonsil® C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱(迪马公司),AB135-S型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

川黄柏药材(四川省大邑中药材有限公司第一分公司)、关黄柏药材(购自辽宁本溪)经沈阳药科大学路金才教授鉴定分别为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮和芸香科植物黄树皮 *P. chinense* Schneid. 的干燥树皮,绿原酸对照品、黄柏碱对照品、木兰花碱对照品、药根碱对照品、巴马汀对照品、小檗碱对照品均为本研究室自制(经HPLC测定纯度均>98%);甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 迪马 Diamonsil® C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 280 nm,流动相乙腈、水(1%乙酸,2 mmol·L⁻¹醋酸铵)梯度洗脱,梯度洗脱 A 为乙腈、B 为水相,0 min, 5%; 20 min, 35%; 35 min, 50%; 45 min, 85%。在此色谱条件下,样品中各目标组分与其他成分之间分离度良好,见图 1。

2.2 对照品储备液的制备 分别精密称取对照品黄柏碱 13.0 mg、木兰花碱 10.0 mg、绿原酸 16.0 mg、药根碱 10.0 mg、巴马汀 10.0 mg、小檗碱 18.0 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 1.3 g·L⁻¹黄柏碱、1.0 g·L⁻¹木兰花碱、1.6 g·L⁻¹绿原酸、1.0 g·



A. 混合对照品; B. 关黄柏供试品

1. 黄柏碱; 2. 木兰花碱; 3. 绿原酸; 4. 药根碱; 5. 巴马汀; 6. 小檗碱

图 1 关黄柏样品及混合对照品 HPLC

L⁻¹药根碱、1.0 g·L⁻¹巴马汀、1.8 g·L⁻¹小檗碱的对照品储备液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称黄柏药材粉末 1.0 g,置于 50 mL 三角瓶中,加入体积分数为 75% 甲醇 10 mL,超声提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液。取续滤液 25 mL 转移至 50 mL 量瓶中,以 75% 甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品溶液备用。

2.4 线性关系考察 精密量取黄柏碱、木兰花碱、绿原酸、药根碱、巴马汀和小檗碱的对照品储备液各适量分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,分别制成质量浓度为 0.13, 0.2, 0.32, 0.1, 0.2, 0.9 g·L⁻¹的对照品溶液,再经逐级稀释,分别制成 5 个质量浓度的系列对照品溶液。分别精密吸取 20 μL 上述系列浓度的对照品溶液,注入液相色谱仪,按 2.1 项下的色谱条件进样分析,记录色谱峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,各对照品的线性回归方程、相关系数和线性范围见表 1。

2.5 精密度试验 取质量浓度为 0.13 g·L⁻¹黄柏碱、0.2 g·L⁻¹木兰花碱、0.32 g·L⁻¹绿原酸、0.1 g·L⁻¹药根碱、0.2 g·L⁻¹巴马汀、0.9 g·L⁻¹小檗碱对照品溶液各 1 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,配制成混合对照品溶液,摇匀。按 2.1 项色谱条件测定,连续进样 6 次,测得峰面积,计算黄柏碱、木兰花碱、绿原酸、药根碱、巴马汀和小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 0.6%, 0.5%, 0.7%, 1.3%, 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取川黄柏供试品溶液,分别在

表 1 6 种化合物的回归方程、相关系数和线性范围

对照品	标准曲线	<i>r</i>	线性范围 /mg·L ⁻¹
黄柏碱	$Y = 17\ 784X - 172\ 569$	0.999 4	18.75 ~ 130.00
木兰花碱	$Y = 31\ 083X - 309\ 766$	0.999 0	25.00 ~ 200.00
绿原酸	$Y = 10\ 740X - 165\ 394$	0.999 6	20.00 ~ 320.00
药根碱	$Y = 43\ 051X - 13734$	0.999 7	5.00 ~ 100.00
巴马汀	$Y = 26\ 983X - 370\ 827$	0.999 0	20.00 ~ 200.00
小檗碱	$Y = 60\ 000\ 000X - 4\ 000\ 000$	0.999 2	0.09 ~ 1.80

0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定, 黄柏碱、木兰花碱、绿原酸、药根碱、巴马汀和小檗碱在 0 ~ 24 h 峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 0.6%, 0.8%, 1.7%, 1.5%, 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性考察 精密称定川黄柏药材粉末约 1.0 g, 平行称取 6 份。按 2.3 项下方法制备成供试品溶液, 按 2.1 项下方法进样分析, 测定峰面积, 计算含量。测得黄柏碱、木兰花碱、绿原酸、药根碱、巴马汀和小檗碱的平均含量分别为 115, 29, 361.7, 8.2, 20.5, 1 150 mg·L⁻¹。RSD 分别为 2.3%, 1.2%, 1.3%, 1.7%, 1.4%, 1.5%, 表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 平行称取 9 份已知含量的川黄柏药材粉末约 0.5 g, 平均分 3 组, 每组中分别加入质量浓度为 1.3 g·L⁻¹ 黄柏碱、1.0 g·L⁻¹ 木兰花碱、1.6 g·L⁻¹ 绿原酸、1.0 g·L⁻¹ 药根碱、1.0 g·L⁻¹ 巴马汀、1.8 g·L⁻¹ 小檗碱的对照溶液(每种分别相当于供试品药材原有含量质量分数的 80%, 100%, 120%) 适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 6 种成分加样回收率试验 (*n* = 9)

组分	样品含量	加入量	测得量	平均回收率	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%
黄柏碱	2.865	2.210	2.177	99.4	0.6
	2.876	2.210	2.206		
	2.783	2.210	2.179		
	2.794	2.730	2.722		
	2.830	2.730	2.714		
	2.842	2.730	2.700		
	2.798	3.380	3.363		
	2.778	3.380	3.373		
	2.905	3.380	3.390		
	木兰花碱	0.754	0.600		
0.757		0.600	0.589		

续表 2

组分	样品含量	加入量	测得量	平均回收率	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%
绿原酸	0.732	0.600	0.591	98.1	0.5
	0.735	0.750	0.727		
	0.745	0.750	0.730		
	0.748	0.750	0.731		
	0.736	0.900	0.887		
	0.731	0.900	0.866		
	0.764	0.900	0.871		
	7.942	6.400	6.323		
	7.972	6.400	6.278		
	7.714	6.400	6.221		
药根碱	7.745	7.840	7.652	97.3	1.0
	7.845	7.840	7.722		
	7.878	7.840	7.683		
	7.756	9.280	9.085		
	7.700	9.280	9.113		
	8.052	9.280	9.132		
	0.201	0.160	0.157		
	0.202	0.160	0.157		
	0.195	0.160	0.154		
	0.196	0.200	0.193		
巴马汀	0.199	0.200	0.194	104.0	1.4
	0.199	0.200	0.196		
	0.196	0.240	0.232		
	0.195	0.240	0.237		
	0.204	0.240	0.231		
	0.528	0.420	0.437		
	0.530	0.420	0.430		
	0.513	0.420	0.433		
	0.515	0.520	0.547		
	0.521	0.520	0.545		
小檗碱	0.524	0.520	0.550	98.5	0.9
	0.515	0.630	0.638		
	0.512	0.630	0.659		
	0.535	0.630	0.660		
	27.997	22.320	21.896		
	28.104	22.320	22.030		
	27.195	22.320	21.918		
	27.303	27.900	27.091		
	27.655	27.900	27.314		
	27.772	27.900	27.788		
27.342	32.940	32.281			
27.146	32.940	32.578			
28.387	32.940	32.874			

2.9 供试品含量测定 取关黄柏及川黄柏药材, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件下进行 HPLC 分析, 每批样品平行测定 3 次, 采

用外标一点法计算两种黄柏药材当中黄柏碱、木兰花碱、绿原酸、药根碱、巴马汀和小檗碱的含量,结果见表3。

表3 样品中6种成分含量测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

药材	川黄柏	关黄柏
黄柏碱	5.75	1.675
木兰花碱	1.45	2.54
绿原酸	15.835	1.043
药根碱	0.41	0.385
巴马汀	1.025	4.015
小檗碱	55.75	5.68

3 讨论

利用PDA检测器,比较不同波长的吸收情况发现280 nm波长处各化合物吸收峰形良好,杂质吸收低,因此选择该波长作为检测波长。参照现行药典所载关黄柏中小檗碱和巴马汀的色谱条件^[11]进行试验,发现多个成分不能达到良好的分离效果,故经过改进以乙腈-水(0.1%乙酸,2 mmol 醋酸铵)为流动相采用梯度洗脱法使各成分达到了良好的分离效果。

从含量数据看,本实验所测得川黄柏中小檗碱和黄柏碱的含量以及关黄柏中小檗碱和巴马汀的含量均符合2010年版《中国药典》的规定。经分析发现,两种黄柏药材中6种共有成分含量差异明显,其中犹以主要药理成分小檗碱最为明显,川黄柏当中小檗碱含量几乎是关黄柏当中的10倍,这与药典规定的含量差异趋势一致。另外,两种黄柏药材中绿原酸的含量差异也非常大,在进一步研究黄柏药效机制时亦应引起重视。因而,认为二者同作黄柏正品入药使用时,无法保证成药当中化学成分及其含量的均一、稳定,不易于药品质量的控制。不建议同作黄柏正品使用,临床用药当中应当加以区分和注意。应当分别对二者化学成分进行更加深入研究,

明确其化学成分的差异,为临床合理用药服务。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 中国植物志 第2册[M]. 北京:科学出版社,1997:99.
- [3] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:375.
- [4] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2005:100,214.
- [5] ZHU Shuang-lai, DOU Sheng-shan, LIU Xin-ru. Qualitative and quantitative analysis of alkaloids in cortex Phellodendri by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD [J]. CHEM RES CHINESE UNIVERSITIES, 2011, 27(1):38.
- [6] 林俊芝,傅超美,毛茜,等. 黄柏饮片与煮散颗粒在不同煎煮时间点盐酸小檗碱含量和干膏收率的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):41.
- [7] 韦亚洁,谢明全. 炮制对黄柏中3种生物碱含量的影响[J]. 中国药房,2010,21(15):1419.
- [8] 沈娟,尹莲,段金彪. 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.
- [9] 尹萌,孟月兰,闻琰毓. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评”[J]. 中草药,2011,42(6):1093.
- [10] Yong Mei Hua, Guang Hai Sub, Stephen Cho-Wing Szea, et al. Quality assessment of Cortex Phellodendri by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2010, 24: 438.
- [11] 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.

[责任编辑 顾雪竹]