

HPLC 同时测定“三热论”方各纯化部位中药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量

皮文霞*, 朱鑫仙, 方婷, 赵冕
(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] 目的:测定“三热论”方各纯化部位中药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量。方法:“三热论”复方经 HPD 400 大孔树脂,分别用 10%、30%、60%、90% 的乙醇洗脱后,采用 HPLC 测定 4 个洗脱部位中 5 种生物碱的含量。结果:HPD 400 大孔树脂纯化后,30% 乙醇洗脱部位生物碱含量最高。结论:大孔树脂纯化法简单易行,30% 纯化部位经 HPLC 检测,其中生物碱含量最高,为有效部位筛选奠定了基础。

[关键词] “三热论”方; 药根碱; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0110-04

Simultaneous Determination of Jatrorrhizine, Epiberberine, Coptisine, Palmatine and Berberine Hydrochloride in Purification Parts of ‘Sanrelun’ Compound Decoction by HPLC

PI Wen-xia*, ZHU Xin-xian, FANG Ting, ZHAO Mian

(School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To determination of jatrorrhizine, epiberberine, coptisine, palmatine and

[收稿日期] 20110920(002)

[通讯作者] * 皮文霞,副教授,从事中药物质基础研究及新药开发, Tel:025-85811512, E-mail: piwenxia@163.com

用柠檬黄的处方药标签上被要求明示这种不良反应发生的可能^[7]。本实验测得染色样品中色素含量已超过多数种类食品中的限量^[6],因此会临床使用带来一定风险。

本研究收集的所有 30 余批射干样品中,正品射干均未染色,5 批伪品中 4 批均为川射干,说明川射干是射干的主流伪品。从染色样品的地区分布看,染色样品均是从没有使用习惯的广东、安徽等地收集,说明染色的目的是将其染黄使之能在市场上作为射干顺利销售。鉴于川射干已经收入 2010 年版《中国药典》,其功效也与射干一致,射干苷含量远高于射干,完全可以在全国范围内合法流通。将川射干染色充射干使用,增加了药物安全性方面的风险,有害无益,值得相关药品研究与生产单位注意。

[参考文献]

[1] 秦文艳,赵金明,齐越,等.射干提取物体内体外抑菌作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17

(4):147.

- [2] 蔡鹰,余国祥.复方桔梗袋泡茶质量标准的研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(4):16.
- [3] 蔡少青,王旋.常用中药材品种整理和质量研究.北方编.第 6 册[M].北京:北京医科大学出版社,2003:334.
- [4] 秦民坚,徐国钧,徐珞珊,等.射干类药材商品调查和鉴定[J].基层中药杂志,1998,12(2):15.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.35-2003 食品中合成着色剂的测定[S].北京:中国标准出版社,2004:275.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 2760-2007 食品添加剂使用卫生标准[S].北京:中国标准出版社,2008:52.
- [7] [美] R. C. 罗, P. J. 舍斯基, P. J. 韦勒. 药用辅料手册[M]. 4 版. 郑俊民译. 北京:化学工业出版社,2004:200.

[责任编辑 顾雪竹]

berberine hydrochloride in purification parts of ‘Sanrelun’ compound. **Method:** ‘Sanrelun’ compound through HPD 400 macroporous resin with 10%, 30%, 60%, 90% ethanol eluted, then was determined the five alkaloids in four purification parts by HPLC. **Result:** The highest content of alkaloids was the part of 30% EtOH purified by HPD 400 macroporous resin. **Conclusion:** In this study, the method of macroporous resin purification is simple, alkaloid content which was determined by HPLC is highest in the part of 30% of the purified, which provide the foundation for effective parts selection.

[**Key words**] ‘Sanrelun’ compound; jatrorrhizine; epiberberine; coptisine; palmatine; berberine hydrochloride

“三热论”方来源于“国医大师”周仲瑛教授临床治疗糖尿病的基础方,是周老从近千个医治糖尿病的复方中提取出的精髓,由地骨皮、鬼箭羽、黄连、山茱萸4味药组成。该方运用独特的“三热”理论辨证组方,即以地骨皮清“燥热”,黄连清“湿热”,鬼箭羽祛“瘀热”,山茱萸治阴虚,临床疗效显著^[1]。其中,黄连是治疗糖尿病的中药复方中常用的一味药,经药效学研究证明,其总生物碱为有效部位^[2],其作用机理①提高糖尿病大鼠胰岛素水平,起到降糖作用;②调节脂代谢,改善血流黏滞度;③通过调节超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA),降低氧化应激反应的生成^[3]。

大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂,具有较好的吸附性能,近年来开始应用于中草药化学成分的提取分离^[4]。HPD400大孔树脂主要用于复方的提取分离,本实验选用此种大孔树脂纯化“三热论”复方,采用HPLC测定该方中不同纯化部位药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量,旨在建立本复方研究中黄连生物碱的含量测定方法,筛选出富含黄连生物碱的部位,探索黄连在“三热论”方中的作用,从而为研究本复方治疗糖尿病的有效成分提供依据。

1 仪器与试剂

515型系列高效液相色谱仪(美国Waters公司),包括G1312A四元梯度泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、UV检测器、Chemstation6.01色谱工作站,紫外分光光度计,UV-2401,AG285电子天平(METTLER, Switzerland),电子天平,SHANGPING FA2104, KQ-500E型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

鬼箭羽(Ramulus Euonymi Alati),产地湖北,批号080916,山茱萸(Fructus Corni),产地河南,批号080916,黄连(Rhizoma Coptidis),产地四川,批号080916,均购自安徽亳州药材市场,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定。

药根碱对照品(YY20101220),表小檗碱对照品(YY20110225)、黄连碱对照品(YY20110330)、巴马汀对照品(YY20100209),均购自上海源叶生物科技有限公司(经检测纯度均>98%),小檗碱对照品(YY20101217),购自中国药品生物制品检定所。

甲酸为分析纯,甲醇为色谱醇,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),甲醇-0.5%甲酸水(30:70),检测波长345 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,进样量10 μL。

2.2 “三热论”方纯化物的制备 “三热论”全方用70%乙醇回流提取2次,合并提取液,减压回收溶剂并干燥,得醇提干燥物,加适量蒸馏水,超声溶解并定容至0.5 g·mL⁻¹作为上样液;取上样生药量2倍的HPD400大孔树脂,预处理后加上样液,依次用蒸馏水、10%乙醇、30%乙醇、60%乙醇、90%乙醇洗脱,分别收集各部分的醇洗脱液,回收溶剂后减压干燥,即得各洗脱部位的纯化物。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取大孔树脂10%, 30%, 60%, 90%洗脱物浸膏各0.019 4, 0.020 1, 0.020 7, 0.021 6 g,分别置于10 mL量瓶中,加适量甲醇超声30 min,放冷,用甲醇定容至刻度,0.45 μm微孔滤膜滤过即得。

2.4 对照品溶液的制备 分别精密称取药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱对照品适量,置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解制成混合对照品溶液,质量浓度分别为143, 126.2, 155, 189, 202.4 mg·L⁻¹, 0.45 μm微孔滤膜滤过即得。

2.5 测定波长的选择 吸收波长的确定是采用盐酸小檗碱对照品溶液,在200~800 nm采用紫外分光光度计进行扫描,结果在345 nm处有最大吸收,故检测波长确定为345 nm。

2.6 方法学考察

2.6.1 标准曲线的绘制 分别精密称取药根碱对

照品 0.007 15 g, 表小檗碱对照品 0.006 31 g, 黄连碱对照品 0.007 75 g, 巴马汀对照品 0.009 45 g, 盐酸小檗碱对照品 0.010 12 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度。分别精密吸取各对照品溶液, 用甲醇稀释, 制成质量浓度分别为 0.48, 35.75, 71.50, 107.25, 143.00 mg·L⁻¹ 黄连碱对照品溶液, 质量浓度分别为 1.00, 31.55, 63.10, 94.65, 126.20 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液, 质量浓度分别为 0.78, 38.75, 77.50, 116.25, 155.00 mg·L⁻¹ 黄连碱对照品溶液, 质量浓度分别为 1.02, 31.50, 63.00, 126.00, 189.00 mg·L⁻¹ 巴马汀对照品溶液, 质量浓度分别为 0.84, 50.60, 101.20, 151.80, 202.40 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液, 各精密吸取 10 μL 进样检测, 以质量浓度 *C* (g·L⁻¹) 为横坐标, 峰面积 *A* 为纵坐标做标准曲线, 各对照品溶液的回归方程及线性范围见表 1。

表 1 药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的标准曲线及线性范围

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 /mg·L ⁻¹
药根碱	$Y = 40\ 477X - 38\ 406$	0.999 7	0.48 ~ 143.00
表小檗碱	$Y = 31\ 101X - 25\ 384$	0.999 7	1.00 ~ 126.20
黄连碱	$Y = 42\ 044X - 22\ 252$	0.999 8	0.78 ~ 155.00
巴马汀	$Y = 65\ 797X - 64\ 782$	0.999 9	1.02 ~ 189.00
盐酸小檗碱	$Y = 27\ 884X - 59\ 398$	0.999 6	0.84 ~ 202.40

2.6.2 精密度试验 取 2.4 项下的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测得药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.98%, 1.67%, 1.74%, 1.82%, 1.51%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 按 2.3 项下供试品溶液的制备, 取其中一种洗脱物, 同法制备 6 份, 进样 10 μL, 测得药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.88%, 1.65%, 1.76%, 1.89%, 1.54%, 表明该方法的重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样 10 μL, 测得药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.38%, 1.64%, 1.79%, 1.49%, 1.91%, 可见供试品在 24 h 内稳定。

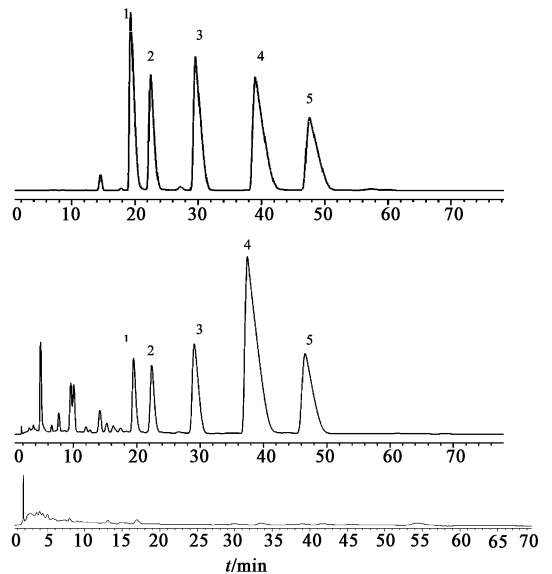
2.6.5 加样回收率试验 分别取 6 份已测知这 5 种生物碱含量的纯化物各约 10 mg, 精密称定, 分别精密加入药根碱对照品 0.18 mg、表小檗碱 0.25 mg、黄连碱 0.38 mg、巴马汀 0.91 mg、小檗碱

0.88 mg, 按供试液制备和含量测定方法操作, 结果见表 2。

表 2 5 种生物碱加样回收率试验 (*n* = 6)

组分	称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
药根碱	10.02	0.184	0.361	0.361	98.5	1.37
表小檗碱	10.24	0.258	0.506	0.506	99.1	1.98
黄连碱	9.93	0.374	0.38	0.760	101.6	2.31
巴马汀	10.01	0.911	0.91	1.829	100.9	2.06
小檗碱	9.98	0.885	0.88	1.780	101.7	1.83

2.7 含量测定 分别精密吸取 2.3 项下的供试品溶液和 2.4 项下的混合对照品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件测定。色谱图和含量测定结果见图 1 和表 3。



A. 混合对照品; B. 30% 洗脱物样品; C. 样品的黄连阴性对照图;
1. 药根碱; 2. 表小檗碱; 3. 黄连碱; 4. 巴马汀; 5. 盐酸小檗碱

图 1 生物碱对照品和样品 HPLC 图

表 3 “三热论”方各纯化部位中各种生物碱的含量测定 %

	药根碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	盐酸小檗碱	5 种生物碱
10% 洗脱物	0.073	0.094	0.070	0.103	0.152	0.492
30% 洗脱物	1.84	2.52	3.77	9.10	8.87	26.1
60% 洗脱物	0.79	0.61	0.77	5.12	2.00	9.29
90% 洗脱物	0.87	0.47	0.34	3.67	1.01	6.36

3 讨论与分析

“三热论”方为临床中筛选出的治疗糖尿病及其并发症的复方, 方中黄连用于治疗糖尿病已有悠久的历史。用于治疗糖尿病及其并发症的含黄连的

复方有黄连解毒汤、复方黄连降糖片、降糖胰生胶囊、黄连消渴颗粒、复方黄连胶囊等,已被证实有较好的效果^[5]。俞森^[6]等研究发现小檗碱型生物碱在正常大鼠体内的生物利用度较差,但在糖尿病模型大鼠体内,5种生物碱的 C_{max} 提高了1.7~3.3倍, AUC_{0-24} 提高了1.5~3.5倍,提示糖尿病可能对5种生物碱在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程中一个或多个环节产生影响,提高了其体内生物利用度,有利于其治疗作用的发挥。小檗碱是黄连中的主要单体之一,具有明显改善2型糖尿病大鼠高血糖、高血脂的作用,并且发现小檗碱既能改善靶组织的胰岛素抵抗,又能促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[7]。药根碱也是黄连中的一种异喹啉生物碱,为小檗碱的同系物;付燕等^[8]通过实验证实药根碱能剂量依赖性降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠和正常小鼠血糖,提示药根碱也是黄连治疗糖尿病的有效成分之一。黄连碱、表小檗碱为黄连中的专有成分,黄连碱具有降低血糖、清除自由基、抗氧化、抗肿瘤、保护胃黏膜、抗菌、降血糖等生理活性^[9]。

基于以上分析,故选择药根碱、表小檗碱等5种生物碱为“三热论”方中黄连总生物碱含量测定的指标性成分。据文献报道,测定此类生物碱分别采用了不同的色谱条件^[10],方法复杂;另有实验显示,同一色谱条件尚未能将此5种生物碱完全分开^[11-12]。而《中国药典》采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充柱,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pH 4.0)为流动相,检测波长为345 nm^[13],此法缺陷在于流动相中加盐对填充柱损伤较大^[14]。因此本实验通过对多种流动相进行摸索,最终确定了甲醇-0.5%甲酸水(30:70)的流动相。

通过比较发现,30%乙醇洗脱物中生物碱含量最高,其值为26.1%,其次是60%乙醇洗脱物和90%乙醇洗脱物,10%乙醇洗脱物含量最少。因此在今后关于该方总生物碱的研究中,可选择本实验筛选出30%洗脱部位进行干预糖尿病及其并发症作用的研究。

[参考文献]

- [1] 叶丽红,王敬卿.周仲瑛治疗糖尿病经验[J].中医杂志,2003,44(12):900.
- [2] 陈奇,邓雁如,于静,等.弱酸性离子交换树脂纯化黄连总生物碱[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):9.
- [3] 赵启鹏,崔秋兵,张艺,等.黄连用于治疗糖尿病的研究进展[J].中药与临床,2010,1(1):55.
- [4] 李云涛,王丽娜.加味四逆颗粒水提取大孔树脂精制工艺的研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(1):16.
- [5] 马燕,袁月新,张俊梅,等.黄连相关中药复方治疗糖尿病及其并发症的研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):272.
- [6] 俞森,俞蕴莉,卢守四,等.黄连中5种小檗碱型生物碱在糖尿病大鼠体内的药动学[J].中国药科大学学报,2008,39(6):526.
- [7] 陈广,陆付耳,王增四,等.小檗碱改善2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗与PI-3K、GLUT4蛋白相关性的研究[J].中国药理学通报,2008,24(8):1007.
- [8] 付燕,胡本容,汤强,等.药根碱、小檗碱、黄连煎剂及模拟方对小鼠血糖的影响[J].中草药,2005,36(4):548.
- [9] 蒋小飞,李学刚,汤琳,等.8-烷基黄连碱同系物的合成及体外降糖作用[J].中草药,2011,42(4):640.
- [10] 纪丽莎,张先福,喻卫武,等.HPLC法测定黄连复方汤中盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀和甘草酸[J].中草药,2011,42(2):285.
- [11] 阳勇,李铁刚,朱晶晶,等.HPLC法测定黄连药材及其炮制品中主要生物碱的含量[J].中成药,2010,32(9):1540.
- [12] 罗文汇,李养学,胥爱丽,等.HPLC法测定不同产地黄连饮片中生物碱的含量[J].中国医药指南,2010,8(30):223.
- [13] 中国药典.一部[S].2010:285.
- [14] 章志青.含盐流动相损坏色谱柱原因探讨[J].山东化工,2009,38(9):45.

[责任编辑 顾雪竹]