

高效毛细管电泳法测定三棵针中 3 种生物碱的含量

胡成刚,高言明,王柳卜,孙济平*,贾宪生
(贵阳中医学院,贵阳 550002)

[摘要] 目的:建立毛细管区带电泳同时测定不同产地三棵针中盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀含量的方法。方法:空心石英毛细管(75 cm × 50 μm)柱,以 50 mmol·L⁻¹硼砂-甲醇(2:1)的溶液为电泳介质,运行电压 25 kV,柱温 15 ℃,检测波长 230 nm。结果:盐酸小檗碱、盐酸药根碱及盐酸巴马汀分别在 0.816 8 ~ 32.672 0 mg·L⁻¹ ($r^2 = 0.999 4$), 0.852 0 ~ 8.520 0 mg·L⁻¹ ($r^2 = 0.999 5$), 0.815 2 ~ 8.152 0 mg·L⁻¹ ($r^2 = 0.999 6$) 线性关系良好;其平均加样回收率分别为 103.8% (RSD 1.14%), 100.7% (RSD 3.46%), 100.2% (RSD 2.87%)。结论:实验方法快速简便,准确可靠,适用于三棵针等药材中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀及盐酸药根碱的含量测定。

[关键词] 毛细管电泳法;三棵针;盐酸小檗碱;盐酸药根碱;盐酸巴马汀

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0071-04

Simultaneous Determination of Three Alkaloids in Sankezhen by High Performance Capillary Electrophoresis

HU Cheng-gang, GAO Yan-ming, WANG Liu-bu, SUN Ji-ping*, JIA Xian-sheng

(Department of Pharmacy Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an High Performance Capillary Zone Electrophoresis (HPCE) method to determine the content of berberine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride and palmatine hydrochloride in sankezhen simultaneously. **Method:** Fused silica capillary coated (75 cm × 50 μm) was used for separation in this study. The mobile phase consisted of 50 mmol·L⁻¹ borax solution acetateacetic acid in methanol (2:1). The applied voltage was 25 kV, and the column temperature was maintained at 15 ℃. The chromatogram was detected at 230 nm. **Result:** Berberine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride and palmatine hydrochloride obtained over the range of 0.816 8-32.672 0 mg·L⁻¹ ($r^2 = 0.999 4$) for palmatine, the range of 0.852 0-8.520 0 mg·L⁻¹ for jutrorrhizine, and the range of 0.815 2-8.152 0 mg·L⁻¹ for jutrorrhizine. The average recoveries were 103.8% (RSD 1.14%), 100.7% (RSD 3.46%) and 100.2% (RSD 2.87%) for berberine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride and palmatine hydrochloride in sankezhen sample respectively. **Conclusion:** The method is accurate, simple and rapid. It can be used for the quality control of Sankezhen and providing a experimental basis for development its resources.

[Key words] High Performance Capillary Electrophoresis; Sankezhen; berberine hydrochloride; jatrorrhizine hydrochloride; palmatine hydrochloride

三颗针为小檗科同属多种植物的干燥根,在全国广泛分布,是一味常用的中草药,民间常用来代替

[收稿日期] 2011-04-15

[基金项目] 贵州省中药现代化专项基金(黔科合社字[2009]5016号)

[第一作者] 胡成刚,教授,硕士生导师,主要从事中药生药与民族医药学研究, Tel: 0851-5652704, E-mail: hu_chenggang@yeah.net

[通讯作者] * 孙济平, Tel: 0851-5652303, E-mail: zyr540212@sohu.com

黄柏、黄连药用, 治疗范围广, 疗效确切^[1]。收载于《贵州省中药、民族药药材标准》的品种为豪猪刺 *Berberis julianae* Schneid.、古宗金花小檗 *Berberis wilsonae* Nems. var. *guntzunica* (Ahrendt) Ahrendt、贵州小檗 *Berberis cavaleriei* Lévl. 或壮刺小檗 *Berberis deinacantha* Schneid.^[2-3]。据报道, 三颗针根茎含多种异喹啉类生物碱, 为其主要有效成分, 具抗菌消炎, 清热解毒, 降压, 利胆, 燥湿, 杀虫等作用^[4], 其中以小檗碱含量最高, 多用于细菌性痢疾、肺结核等疾病^[5]。近年来关于三颗针及其制剂采用 HPLC 法测定中盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀含量的报道较多, 但是采用毛细管区带电泳法同时测定其 3 种有效成分未见报道。本研究建立了 HPCE 法, 在 230 nm 波长下同时测定三颗针中盐酸小檗碱、盐酸药根碱及盐酸巴马汀 3 种成分的含量, 并对其不同产地 3 种药材的不同部位中上述 3 种成分同时进行了含量测定, 为三颗针药材质量评价和资源合理开发利用提供综合性理论依据。

1 材料

1.1 仪器 HP^{3D}CE 高效毛细管电泳仪(安捷伦公司), DAD 检测器, 安捷伦化学工作站, 自动进样器; AE-240 双量程电子分析天平, (1/万, 1/10 万, 梅特勒-托利多上海有限公司); CX-250 型超声波清洗器(中国北京市医疗设备二厂)。

1.2 对照品及试剂 盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110713-200208), 盐酸药根碱(中国药品生物制品检定所, 批号 0733-200004), 盐酸巴马汀(中国药品生物制品检定所, 批号 0732-9604); 甲醇为色谱纯(天津科密欧公司), 硼砂、甲醇等为分析纯, 水为纯净水。

1.3 样品来源 三颗针药材购于北京同仁堂药房, 市售饮片, 产地云南(批号 091201, 生产日期 2009 年 12 月 4 日); 豪猪刺和古宗金花小檗均采自于贵州高坡, 经贵阳中医学院何顺志教授鉴定为豪猪刺 *Berberis julianae* Schneid. 和古宗金花小檗 *Berberis wilsonae* Nems. var. *guntzunica* (Ahrendt) Ahrendt。

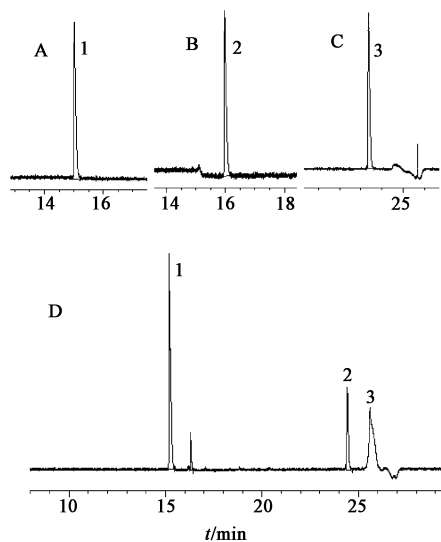
2 方法与结果

2.1 毛细管电泳条件 采用 50 $\mu\text{m} \times 75 \text{ cm}$ 的空心石英毛细管柱, 有效长度为 66.7 cm; DAD 检测器, 检测波长 230 nm; 50 mmol·L⁻¹ 硼砂-甲醇(2:1) 的溶液为电泳介质; 工作电压为 25 kV, 压力进样 50

mBar $\times 15 \text{ s}$, 电解质封口 50 mBar $\times 10 \text{ s}$; 柱温 15 $^{\circ}\text{C}$; 每次进样前用电解质冲柱 10 min。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度制备得每 1 mL 含盐酸小檗碱 40.84 μg 的储备液; 精密称取盐酸药根碱对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解稀释至刻度制备得每 1 mL 含盐酸药根碱 42.60 μg 的储备液; 精密称取盐酸巴马汀对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解稀释至刻度制备得每 1 mL 含盐酸巴马汀 40.76 μg 的储备液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(粉碎过 60 目筛)约 0.25 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 60 min, 静置过夜, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取续滤液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。在上述色谱条件下对照品与样品色谱见图 1。



1. 盐酸小檗碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸药根碱

图 1 对照品(A, B, C)和样品(D)的 HPCE 图

2.4 线性范围实验 分别精密吸取盐酸小檗碱对照品储备液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 得浓度梯度溶液, 按 2.1 项下的“毛细管电泳条件”进行分析测定, 以峰面积为横坐标, 以浓度为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1476.8X + 7.727$ ($r = 0.9997$), 表明盐酸小檗碱在 0.8168 ~ 32.6720 μg 线性关系良好; 分别精密吸取盐酸药根碱对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释定容至刻度, 摇匀,

得一浓度梯度溶液,按 2.1 项下的“毛细管电泳条件”进行分析测定,以峰面积为横坐标,以浓度为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2\ 105.5X - 1.685\ 8$ ($r = 0.999\ 7$),表明盐酸药根碱在 0.852 ~ 8.520 μg 线性关系良好;分别精密吸取盐酸巴马汀对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,置于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度,摇匀,得一浓度梯度溶液,按 2.1 项下的“毛细管电泳条件”进行分析测定,以峰面积为横坐标,以浓度为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\ 489.5X - 2.079\ 7$ ($r = 0.999\ 8$);表明盐酸巴马汀在 0.815 2 ~ 8.152 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 将同一供试品溶液连续进样 6 次,按 1.2 项下的“毛细管电泳条件”进行测定,记录电泳图,结果盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 1.76%, 2.27%, 1.80%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 将同一供试品溶液,按 1.2 项下的“毛细管电泳条件”分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进行分析测定,记录电泳图,盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 3.05%, 2.73%,

4.29%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批次样品粉末 6 份,每份约 0.25 g,置锥形瓶中,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,按 1.2 项下的“毛细管电泳条件”进行分析测定,记录电泳图,计算样品中盐酸小檗碱平均含量为 3.22%, RSD 为 1.81%;盐酸药根碱平均含量 0.81%, RSD 为 1.99%;盐酸巴马汀平均含量 0.35%, RSD 为 2.62%。表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称定已知盐酸小檗碱含量为(3.22%),盐酸药根碱含量(0.81%)及盐酸巴马汀含量(0.35%)的同一批样品 5 份,每份约 0.12 g,分别精密加入浓度 0.042 82 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸小檗碱对照品溶液 10.0 mL,浓度为 0.037 04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸药根碱对照品溶液 3.0 mL 以及 0.043 72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸巴马汀对照品溶液 1.0 mL,按 2.3 项下方法制备,按 1.2 项下的“毛细管电泳条件”进行分析测定,记录电泳图,结果盐酸小檗碱平均回收率为 103.8%, RSD 为 1.14%;盐酸药根碱平均回收率为 100.7%, RSD 为 3.46%;盐酸巴马汀平均回收率为 100.2%, RSD 为 2.78%。结果见表 1。

表 1 样品中盐酸小檗碱、盐酸药根碱及盐酸巴马汀的回收率试验 ($n = 5$)

测定成分	称样量/g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	检出量 /mg	回收率 /%	平均 回收率/%	RSD/%
盐酸小檗碱	0.127 0	4.089 4	4.282 0	8.541 0	103.96	103.76	1.14
	0.127 2	4.095 8	4.282 0	8.601 0	105.21		
	0.127 9	4.118 4	4.282 0	8.574 0	104.05		
	0.127 2	4.095 8	4.282 0	8.462 0	101.97		
	0.126 8	4.083 0	4.282 0	8.528 0	103.81		
盐酸药根碱	0.127 0	1.028 7	1.111 2	2.143 0	100.27	100.74	3.46
	0.127 2	1.030 3	1.111 2	2.175 0	103.01		
	0.127 9	1.036 0	1.111 2	2.109 0	96.56		
	0.127 2	1.030 3	1.111 2	2.126 0	98.60		
	0.126 8	1.027 1	1.111 2	2.197 0	105.28		
盐酸巴马汀	0.127 0	0.444 5	0.437 2	0.890 0	101.90	100.16	2.78
	0.127 2	0.445 2	0.437 2	0.883 0	100.14		
	0.127 9	0.447 7	0.437 2	0.894 0	102.09		
	0.127 2	0.445 2	0.437 2	0.890 0	101.74		
	0.126 8	0.443 8	0.437 2	0.860 0	95.20		

2.9 样品测定结果 将三颗针样品,按不同药用部位分别照 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下的

毛细管电泳条件进行分析测定,结果见表 2。

表 2 三颗针中不同药用部位盐酸小檗碱、盐酸药根碱及盐酸巴马汀的含量测定 (n = 12)

品种	产地	部位	盐酸小檗碱		盐酸药根碱		盐酸巴马汀	
			含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
三颗针	云南	根木	0.75	0.02	0.14	0.00	0.087	0.82
		根皮	3.62	2.15	0.99	0.00	0.30	2.39
		茎木	-	-	-	-	-	-
		茎皮	-	-	-	-	-	-
		全药材	3.27	2.38	0.67	1.08	0.35	4.04
古宗金花小檗	贵州高坡	根木	0.54	2.62	0.04	3.48	0.10	0.00
		根皮	1.69	1.26	1.36	1.57	0.33	0.28
		茎木	0.57	1.25	0.07	1.02	0.11	0.63
		茎皮	1.45	2.45	1.69	2.94	0.58	0.49
		全药材	2.82	0.25	0.32	4.42	0.40	1.79
豪猪刺	贵州高坡	根木	0.35	2.05	0.03	0.67	0.07	1.08
		根皮	4.49	1.10	1.11	1.89	0.65	1.10
		茎木	0.28	2.57	0.05	1.55	0.06	1.27
		茎皮	2.15	1.65	1.14	1.24	0.37	3.82
		全药材	1.43	0.50	0.38	1.89	0.17	4.29

注：“-”表示未测定。

3 结果与讨论

由测定结果显示,贵州、云南两省产的 3 种三颗针药材,因品种、产地及药用部位的不同,其 3 种成分的含量均有一定差异。其中,云南产的三颗针盐酸小檗碱、盐酸药根碱含量较高,但是盐酸巴马汀含量又相对偏低;贵州产古宗金花小檗盐酸药根碱、盐酸巴马汀含量较高,盐酸小檗碱含量略低于云南产样品;贵州产豪猪刺盐酸小檗碱及盐酸巴马汀含量虽然偏低,但是盐酸药根碱含量较高。且测定结果还显示出 3 种样品中根皮、茎皮部位盐酸小檗碱、盐酸药根碱及盐酸巴马汀的含量均高于根木、茎木部位的含量。

本实验在同等条件下对回流、超声 2 种提取方法进行了考察,经比较选择了超声提取。对不同缓冲液溶液进行了筛选,经比较采用以 50 mmol·L⁻¹ 硼砂-甲醇(2:1)的溶液为电泳介质,盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀的分离度符合要求,分离效果较好。

毛细管电泳法具有低消耗,高柱效,低污染,样品处理简单等特点,采用该法对贵州及云南产 3 种三颗针中的 3 种生物碱成分进行测定,可为多品种

来源药材的质量控制提供实验依据;根据实验结果皮部位 3 种生物碱的含量均高于木部位,且茎及茎皮部位含量也不低,故从资源合理开发利用的角度,可选择利用其地上部分;根据所含 3 种成分的高低不均,可由不同成分药理作用差异进行品种优选,扩大药源。同时,也为三颗针 GAP 基地建设及其相关医药工业生产提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 王朝碧,魏俊莲,张凤兰,等. 贵州三颗针的分布与应用[J]. 贵阳中医学院学报. 2002, 22(3): 59.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:22.
- [3] 何顺志,徐文芬. 贵州中草药资源研究[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2007:281.
- [4] 王志东,宋宝安,杨松,等. 贵州中草药三颗针化学成分研究[J]. 贵州大学学报. 2009,26(3):11.
- [5] 杨志学,陈百双,黄爱华,等. 正交试验优选三颗针中盐酸小檗碱的提取工艺[J]. 中国民族医药杂志. 2004, S1:184.

[责任编辑 蔡仲德]