

HPLC-UV-ELSD 同时测定知母黄柏药对提取物中 盐酸小檗碱、黄柏碱、知母皂苷 B II

叶雪兰¹, 高英², 李卫民^{1*}, 黄江剑¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学新药研究开发中心, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立知母黄柏药对提取物中盐酸小檗碱、黄柏碱、知母皂苷 B II 的 HPLC-UV-ELSD 含量测定方法。方法: 采用 HPLC-UV-ELSD 方法, 色谱柱: Dikma C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 冰醋酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, UV 检测波长 280 nm, 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 46 ℃, 氮气压力 1.5 Bar。结果: 盐酸小檗碱、黄柏碱及知母皂苷 B II 的线性范围分别是 1.008 ~ 3.528 μg ($r = 0.999 5$), 0.322 ~ 1.127 μg ($r = 0.999 6$), 0.702 ~ 2.457 μg ($r = 0.999 8$), 平均加样回收率分别为 100.11%, 98.97%, 99.56%; 其 RSD 分别为 1.08%, 0.90%, 1.37%。结论: 该法简便快速, 重复性良好, 结果准确可靠, 可用于知母黄柏药对提取物中主要有效成分的含量测定。

[关键词] 知母黄柏药对提取物; 生物碱; 知母皂苷 B II; 高效液相-紫外-蒸发光散射法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0122-03

Quantitative Determination of Berberine Hydrochloride, Phellodendrine and Timosaponin B II in Common Anemarrhena Rhizome and Amur Corktree Bark Extraction

YE Xue-lan¹, GAO Ying², LI Wei-min^{1*}, HUANG Jiang-jian¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. New Drug R & D Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of berberine hydrochloride, phellodendrine and timosaponin B II in common anemarrhena rhizome and amur corktree bark extraction. **Method:** HPLC-UV-ELSD was used in quantitative analysis with condition as follows: Dikma C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used in analysis; mobile phase was acetonitrile-0.2% acetic acid, gradient elution; flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; column temperature was at 30 ℃. Both UV and ELSD were used as detector. UV wavelength of 280 nm; evaporative light scattering detector drift tube temperature was at 46 ℃; nitrogen pressure: 1.5 Bar. **Result:** The linear ranges of berberine hydrochloride, phellodendrine and timosaponin B II were 1.008-3.528 μg ($r = 0.999 5$), 0.322-1.127 μg ($r = 0.999 6$), 0.702-2.457 μg ($r = 0.999 8$), the average recoveries were 100.11%, 98.97%, 99.56% with the RSD 1.08%, 0.90%, 1.37%. **Conclusion:** This quantitative determination method is simple, well reproducible, accurate and reliable.

[Key words] common anemarrhena rhizome and amur corktree bark extraction; berberine hydrochloride; timosaponin B II; HPLC-UV-ELSD

[收稿日期] 20101220(009)

[第一作者] 叶雪兰, 在读硕士研究生, 从事中药新药研究与开发, Tel: 13570413629, E-mail: ziluolanxue1@126.com

[通讯作者] * 李卫民, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 020-39358290, E-mail: 13925023915@139.com

知母黄柏药对配伍最早出自金代李杲《兰室秘藏》滋肾丸,具有滋阴降火等多种药理作用^[1-2],是临床常用的清热药对之一。知母中主要有效成分是皂苷类化合物^[3],黄柏中主要活性成分是生物碱类化合物^[4]。目前对于知母黄柏药对中皂苷和生物碱类成分的HPLC法含量测定研究,主要集中于以UV为检测器检测有紫外吸收的有效成分如盐酸小檗碱等^[5],或以ELSD为检测器测定甾体皂苷等有效成分;而对于两者连用同时测定该药对中多种有效成分的研究报道较少。本实验采用HPLC-UV-ELSD联用方法,经色谱条件优化,实现了同时对知母黄柏药对提取物中盐酸小檗碱、黄柏碱及知母皂苷B II的含量测定,为控制知母黄柏药对提取物及含有知母黄柏药对的中成药的质量提供方法和依据。

1 仪器与试剂

SHIMADZU LC 10AT vp plus 高效液相色谱仪, SHIMADZU SPD 10A vp plus 紫外检测器, SHIMADZU CBM 10A vp plus 化学工作站; Sartorius 电子分析天平(德国, $d = 0.01 \text{ mg}$); 奥泰蒸发光散射检测器, 浙大 N2000 色谱工作站; 乙腈为色谱纯, 水为制备纯水, 其他试剂为分析纯; 盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110713-200208), 黄柏碱对照品(天津马克生物技术有限公司, 批号 HBJ20100509, 含量 $\geq 98\%$), 知母皂苷 B II 对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 A0338, 含量 $\geq 98\%$)。药材(知母产地河北, 黄柏产地四川), 由本院黄海波教授鉴定, 知母为单子叶植物百合科植物知母 *Anemarrhena asphode loides* Bge. 的干燥根茎; 黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮。知母黄柏药对提取物由本实验室自制。

2 方法与结果

2.1 供试溶液制备

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 分别用 70% 乙醇制成含盐酸小檗碱为 $0.252 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄柏碱为 $0.0805 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、知母皂苷 B II 为 $0.1755 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 称取黄柏知母提取物 0.02 g 加 70% 乙醇溶于 25 mL 量瓶中, 摇匀, 过滤, 即得。

2.2 色谱条件及系统适用性 Dikma C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) 色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 以 0.2%

冰醋酸溶液为流动相 B, 按表 1 进行梯度洗脱, 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长为 280 nm 。漂移管温度 $46 \text{ }^\circ\text{C}$, 氮气压力 1.5 bar 。进样量为 $20 \mu\text{L}$ 。供试品溶液色谱中与各对照品对应的吸收峰的理论塔板数均不低于 6 000 对应的色谱峰的分离度均大于 1.5, 拖尾因子在 $0.95 \sim 1.05$ 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 5	2 ~ 20	98 ~ 78
5 ~ 18	20 ~ 40	78 ~ 60
18 ~ 30	40	60

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取上述对照溶液 $2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 \text{ mL}$ 置 10 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 制得系列混合对照品溶液。各取 $20 \mu\text{L}$ 进样, 在上述色谱条件下测定峰面积。以峰面积 Y 对进样量 X 进行线性回归, 结果盐酸小檗碱及黄柏碱的回归方程分别为 $Y = 5.0 \times 10^9 X - 1.0 \times 10^6$ ($r = 0.9992$); $Y = 3.0 \times 10^9 X + 137945$ ($r = 0.9996$)。知母皂苷 B II 以峰面积的对数为 Y 轴, 以含量的对数为 X 轴, 作线性回归方程为 $Y = 1.4036X + 3.3627$, $r = 0.9998$ 。线性范围分别为 $1.008 \sim 3.528 \mu\text{g}$, $0.322 \sim 1.127 \mu\text{g}$, $0.702 \sim 2.457 \mu\text{g}$ 。

2.3.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液, 注入液相色谱仪, 重复 6 次, 所得盐酸小檗碱, 黄柏碱及知母皂苷 B II 峰面积 RSD 分别为 1.05% , 1.13% , 0.96% 。表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液, 注入液相色谱仪, 重复 6 次, 所得峰面积 RSD 分别为 1.14% , 0.96% , 0.93% 。表明本法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 于 $0, 1, 2, 4, 8 \text{ h}$, 分别精密吸取同一供试品溶液, 注入液相色谱仪, 所得峰面积 RSD 分别为 0.96% , 0.66% , 0.92% 。表明在 8 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 称取同批次知母黄柏提取物 0.02 g , 6 份, 精密称定, 分别精密加入盐酸小檗碱, 黄柏碱, 知母皂苷 B II 对照品溶液适量, 同 2.1.2 方法处理, 测定, 计算加样回收率, 结果各对照品的平均加样回收率分别为 100.11% , 98.97% , 99.56% ; 其 RSD 分别为 1.42% , 1.26% , 1.37% 。

2.4 样品含量测定 称取 9 批知母黄柏提取物, 同

2.1.2 方法处理,精密吸取上述供试溶液各 20 μ L, 注入高效液相色谱仪分析,结果见表 2,图 1。

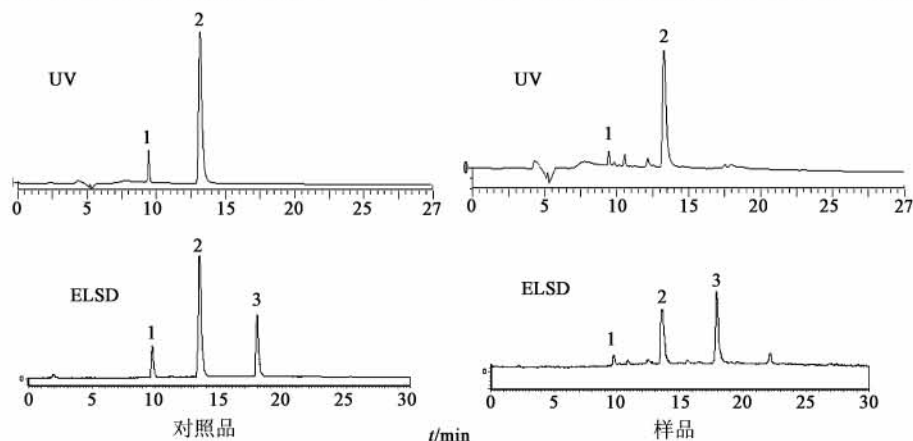


图 1 3 种成分的 HPLC

1. 黄柏碱;2. 盐酸小檗碱;3. 知母皂苷 B II

表 2 9 批知母黄柏提取物盐酸小檗碱、黄柏碱、知母皂苷 B II 含量测定 ($\bar{x} \pm s, n=12$) %

No.	黄柏碱	RSD	盐酸小檗碱	RSD	知母皂苷 B II	RSD
1	3.12	0.85	14.17	0.49	9.99	0.97
2	3.11	1.16	13.75	1.08	8.45	0.83
3	3.34	0.52	16.26	0.80	9.49	1.02
4	2.97	1.01	15.04	0.92	7.09	1.12
5	3.03	0.87	15.66	1.05	14.05	0.63
6	2.89	0.92	13.84	0.88	12.86	0.94
7	2.95	0.59	13.37	0.97	16.52	0.76
8	2.67	0.99	10.37	0.95	12.31	0.90
9	2.87	0.70	13.27	0.53	13.06	0.73

3 结果与讨论

知母黄柏药对提取物多成分含量测定的检测波长,精密吸取供试品溶液,注入高效液相色谱仪,分别在 254, 260, 265, 284 nm 波长处检测,综合各个因素,选择 280 nm 波长。

参照现行药典有关知母药材中知母皂苷 B II 及黄柏药材中盐酸小檗碱及黄柏碱的流动相,试验发现均不能同时把 3 种成分测出。本实验经比较甲醇-水、乙腈-0.1% 冰醋酸溶液、乙腈-0.1% 二乙胺溶液、乙腈-0.2% 四氢呋喃溶液等梯度洗脱条件,选择了优化的乙腈-0.2% 冰醋酸溶液溶剂系统。

从 9 批知母黄柏提取物测定结果可知,各批次

盐酸小檗碱、黄柏碱、知母皂苷 B II 存在着差异。其中平均含量以盐酸小檗碱含量最高为 13.97%,知母皂苷 B II 含量为 11.54%,黄柏碱 2.99%。

通过 HPLC-UV 及 HPLC-ELSD 两者的比较,知母皂苷 B II 是甾体皂苷,无紫外吸收。而 HPLC-ELSD 法采用蒸发光检测器进行检测,不依赖于样品的光学特性,不受官能团的影响,该方法分离度、重复性好且结果准确,故适用于知母皂苷 B II 的含量测定。其中盐酸小檗碱及黄柏碱在蒸发光上也有响应值,但与紫外相比,样品中黄柏碱由于含量较小在蒸发光上不能被很好的检测出来。所以用紫外进行含量测定的结果较为准确。

[参考文献]

- [1] 吕景山. 施今墨对药[M]. 4 版. 北京:人民军医出版社,2006:19,31.
- [2] 丁元庆.《兰室秘藏》应用知母黄柏之浅识[J]. 中医函授通讯,1995,2:14.
- [3] 杨丽蓉. 知母的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国外医学·中医中药分册,2002,24(4):207.
- [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] 易博,孙赫,原源,等. RP-HPLC 法测定知母黄柏药对中新芒果苷、芒果苷和盐酸小檗碱[J]. 中草药,2007,38(6):856.

[责任编辑 蔡仲德]