

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

沈娟¹, 尹莲^{1*}, 段金廛²

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;
2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 比较黄柏生物碱配伍二妙丸类方前后含量的变化, 探讨类方方剂物质基础配伍变化的特征。方法: 采用 HPLC, Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液 (50:50, 每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.17 g), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 345 nm。测定黄柏及其二妙丸类方 (二妙方、三妙方、四妙方、加味四妙方) 中小檗碱、巴马汀及药根碱成分含量。结果: 3 种生物碱在四妙方中含量基本没变化, 在二妙方、三妙方中含量减少, 在加味四妙方中减少较多, 药根碱较小檗碱、巴马汀在二妙丸类方中减少量大。结论: 黄柏配伍二妙丸类方后, 黄柏生物碱成分在基本方二妙及不同类方中呈现一定的变化规律。

[关键词] 二妙丸类方; 黄柏; 小檗碱; 巴马汀; 药根碱; 含量分析; 配伍变化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0031-04

Determination and Comparison of Alkaloids Content between Cortex Phellodendri and Ermiao Wan Categorized Formulas by HPLC

SHEN Juan¹, YIN Lian^{1*}, DUAN Jin-ao²

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] Objective: To evaluate correlativity between the content of alkaloids in Cortex Phellodendri and Ermiao Wan categorized formulas. **Method:** The HPLC method was adopted to determine the content of berberine, palmatine and jatrorrhizine in Cortex Phellodendri and the categorized formulas of Ermiao Wan, Sanniao Wan, Simiao Wan and Jiawei Simiao Wan. Chromatography parameters were A Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (50:50) (adding SDS 0.17 g per 100 mL solution), flow rate 0.8 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃, detection wavelength at 345 nm. **Result:** The content of three kinds of alkaloids was almost not changed in Simiao Wan, but decreased in Ermiao Wan and Sanniao Wan, especially in Jiawei Simiao Wan. The content of jatrorrhizine was decreased much more than berberine and palmatine after compatibility. **Conclusion:** The alkaloids content presents a rule in Ermiao Wan categorized formulas after compatibility.

[Key words] Ermiao Wan categorized formulas; Cortex Phellodendri; berberine; palmatine; jatrorrhizine; content determination; variety of compatibility

[收稿日期] 20100126(003)

[基金项目] 南京中医药大学基础研究与重点培育(08XPY04)项目, 江苏省方剂研究重点实验室(022021014010)

[第一作者] 沈娟, 在读硕士生, 中药化学方向, Tel: 13814071416

[通讯作者] * 尹莲, Tel: 025-85811512, E-mail: yinlian162@163.com

中医方剂物质基础复杂, 中药配伍后化学成分不是单味药化学成分的简单加和, 药对及复方药效物质基础在配伍前后不仅发生质变, 含量也呈现较大的变化^[1-3]。而类方方剂配伍规律的研究多在整体药物层次上进行^[4-6], 其基本方及其类方物质基础在配伍前后的变化未见报道。

二妙丸(2M)、三妙丸(3M)、四妙丸(4M)和加味四妙丸(G4M)是一组二妙丸类方, 其中 2M, 3M, 4M 是主治湿热下注的经典方, G4M 临床常用于治疗湿热型痛风^[7], 它们在主治病症、组方结构及生物效应方面均具有相关性^[8-9]。黄柏是基本方 2M 的组方药, 其生物碱类成分是抗炎、镇痛有效部位, 在二妙丸类方中起重要作用^[10]。本文选用黄柏生物碱中相对含量较高的小檗碱、巴马汀及药根碱成分^[11-12], 建立 HPLC 含量分析方法, 对比分析配伍二妙丸类方前后含量的变化, 以探讨类方方剂物质基础配伍变化的特征。

1 材料

1.1 仪器 LC210A T 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), SPD 210A 型紫外检测器(日本 Shimadzu 公司), 2010 色谱工作站(浙江大学)。

1.2 试剂 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司), 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司), 二次重蒸水(自制), 十二烷基磺酸钠(化学纯, 上海凌峰化学试剂有限公司), 磷酸(宜兴市辉煌化学试剂厂)。

1.3 药材 黄柏 *Phellodendron chinense* Schneid.、苍术 *Atractylodes chinensis* Koidz.、薏苡仁 *Coix Lacrym-jobi L. var. mayuen*, 牛膝 *Achyranthes bidinata* BL 等均自购, 由南京中医药大学药学院中药鉴定教研室王春根教授鉴定。

1.4 对照品 盐酸小檗碱(批号 110713-200208)、盐酸巴马汀(批号 110732-200506)、盐酸药根碱(批号 110733-200005)对照品购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀各 5.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 50% 甲醇水溶液定容至刻度, 得到 0.1 g·L⁻¹ 的 3 种对照品储备液。再按不同比例稀释, 定容, 分别得到盐酸小檗碱为 0.05 g·L⁻¹, 盐酸巴马汀为 0.02 g·L⁻¹, 盐酸药根碱为 0.004 g·L⁻¹ 的对照品储备液, 备用。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 黄柏(HB)对照药材的制备 取黄柏粉末(过 3 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇水溶液 80 mL, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷, 用 50% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得 HB 供试品溶液。

2.2.2 二妙方(2M)溶液的制备 分别取苍术、黄柏粉末(过 3 号筛)各约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 处理方法同 2.2.1 项下, 即得 2M 供试品溶液。

2.2.3 三妙方(3M)溶液的制备 分别取苍术、黄柏、牛膝粉末(过 3 号筛)各约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 处理方法同 2.2.1 项下, 即得 3M 供试品溶液。

2.2.4 四妙方(4M)溶液的制备 分别取苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁粉末(过 3 号筛)各约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 处理方法同 2.2.1 项下, 即得 4M 供试品溶液。

2.2.5 加味四妙方(G4M)的制备 分别取苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁、土茯苓、忍冬藤粉末(过三号筛)各约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 处理方法同 2.2.1 项下, 即得 G4M 供试品溶液。

2.3 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(50:50, 每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.17 g); 流速 0.8 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 345 nm; 进样量 10 μL。

在此色谱条件下, 测定盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品, 黄柏及二妙丸类方供试液, 色谱图见图 1。

由图 1 可见, 供试品中盐酸小檗碱保留时间约为 11 min, 盐酸巴马汀保留时间约为 14.5 min, 盐酸药根碱保留时间约为 16.2 min, 与相邻峰的分离度均大于 1.5, 理论塔板数不低于 7 000。

3 方法学考察

3.1 线性关系 取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀及盐酸药根碱 3 种对照品储备液, 精密吸取盐酸小檗碱 3, 4, 5, 6, 7 mL, 盐酸巴马汀 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mL, 盐酸药根碱 0.32, 0.40, 0.48, 0.64, 0.72 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇液稀释至刻度, 得到含盐酸小檗碱 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 g·L⁻¹,

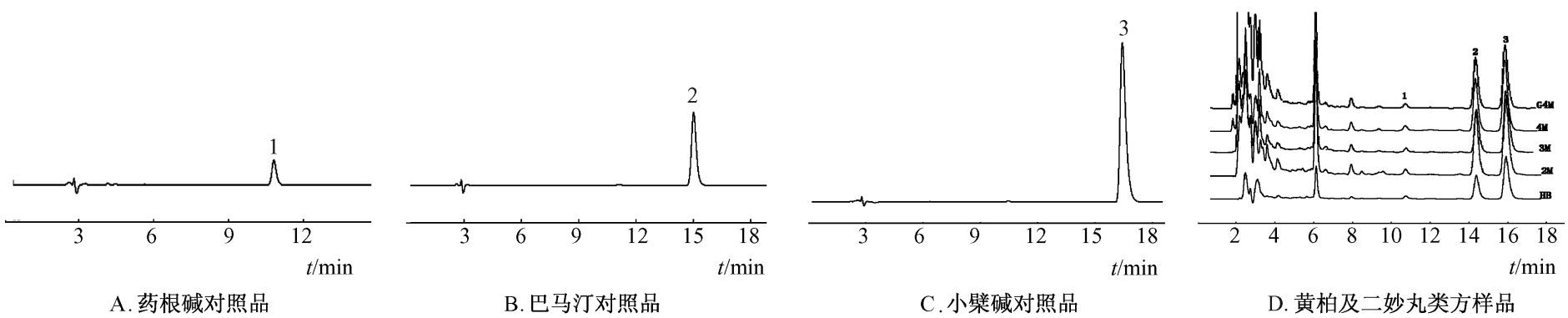


图 1 3 种对照品溶液、黄柏及二妙丸类方溶液液相色谱
1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸小檗碱

含盐酸巴马汀 0.008, 0.012, 0.016, 0.020, 0.024 g·L⁻¹, 含盐酸药根碱 0.003 2, 0.004 0, 0.004 8, 0.006 4, 0.007 2 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液。按 2.3 项下色谱条件进行测定, 每次进样 10 μL, 以峰面积 *Y* 为纵坐标, 浓度 *X* 为横坐标作图, 结果见表 1。

表 1 线性关系试验 (*n* = 5)

	线性范围 / μg	回归方程	<i>r</i>
盐酸小檗碱	0.3 - 0.7	$Y = 3.37 \times 10^6 X - 3.78 \times 10^4$	0.999 6
盐酸巴马汀	0.08 - 0.24	$Y = 5.38 \times 10^6 X - 4.01 \times 10^4$	0.999 7
盐酸药根碱	0.032 - 0.072	$Y = 1.94 \times 10^6 X - 7.03 \times 10^3$	0.999 9

3.2 精密度试验 取同一对照药材溶液, 重复进样 5 次, 按 2.3 项下色谱条件测定峰面积, 结果为盐酸小檗碱峰面积 *RSD* 0.66%, 盐酸巴马汀峰面积 *RSD* 0.30%, 盐酸药根碱峰面积 *RSD* 0.29%。表明仪器精密度良好。

表 2 小檗碱、盐酸巴马汀、药根碱加样回收率试验 (*n* = 6)

样品含量 / μg			加入量 / μg			测得量 / μg			加样回收率 / %		
小檗碱	巴马汀	药根碱	小檗碱	巴马汀	药根碱	小檗碱	巴马汀	药根碱	小檗碱	巴马汀	药根碱
21.85	7.39	2.14	15.00	3.50	1.10	36.69	10.76	3.17	99.93	96.28	93.64
21.85	7.39	2.14	15.00	3.50	1.10	36.71	10.75	3.25	99.06	96.00	100.91
21.85	7.39	2.14	28.00	7.00	2.80	50.34	14.53	4.97	101.75	102.00	101.07
21.85	7.39	2.14	28.00	7.00	2.80	50.21	14.39	4.85	101.28	100.00	96.79
21.85	7.39	2.14	41.00	10.00	4.60	62.63	17.52	6.84	99.46	101.30	102.17
21.85	7.39	2.14	41.00	10.00	4.60	62.65	17.38	6.66	99.51	99.90	98.26
平均值									99.94	99.31	98.81
RSD									1.08	2.55	3.26

3.6 含量测定 分别取黄柏及二妙丸类方供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件进样 10 μL, 同时进样对照品溶液, 测定小檗碱、巴马汀及药根碱色谱峰峰面积, 重复 3 次, 用外标法计算其含量, HB 及二妙丸类方中小檗碱、巴马汀及药根碱的含量及相对于 HB 的变化百分比见表 3。

3.3 稳定性试验 取同一对照药材溶液, 分别在 0, 3, 6, 12, 24 h 进样 1 次, 按 2.3 项下色谱条件各测 5 次, 测得盐酸小檗碱峰面积的 *RSD* 1.54%, 盐酸巴马汀峰面积的 *RSD* 1.36%, 盐酸药根碱峰面积的 *RSD* 2.24%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.4 重复性实验 取同一批对照药材黄柏, 按 2.2 项下供试品溶液的制备方法分别制备 5 份对照药材溶液, 按 2.3 项下色谱条件测得盐酸小檗碱含量的 *RSD* 0.95%, 盐酸巴马汀含量的 *RSD* 0.90%, 盐酸药根碱含量的 *RSD* 1.52%。表明方法精密度良好。

3.5 加样回收率试验 精密量取 0.4 mL 已知含量的黄柏储备液 18 份于量瓶中, 分别精密加入低、中、高不同体积的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品储备液适量, 用 50% 甲醇水溶液定容至刻度, 即得。按 2.3 项下色谱条件各进样 10 μL 测定, 加样回收率结果见表 2。

结果表明, 3 种生物碱在 4M 中含量基本没变化, 在 2M, 3M, G4M 中含量减少, 在 G4M 中减少较多; 药根碱较 小檗碱、巴马汀在二妙丸类方中减少量大。

4 讨论

含小檗碱型生物碱的药材如黄柏、黄连等与其

表 3 二妙类方含量测定结果 (n=3)

	小檗碱含量 /mg·g ⁻¹	相对含量 /%	巴马汀含量 /mg·g ⁻¹	相对含量 /%	药根碱含量 /mg·g ⁻¹	相对含量 /%
HB	10.927	100.0	3.697	100.0	1.074	100.0
2M	10.486	96.0	3.546	96.0	0.832	77.5
3M	10.615	97.1	3.533	95.6	0.941	87.6
4M	10.959	100.3	3.695	99.9	1.031	96.0
G4M	9.845	90.1	3.382	91.5	0.894	83.2

他药物配伍后,常与一些酸性成分(酸性皂苷、有机酸、黄酮)等形成复合物,含量降低^[13-14]。本实验结果表明,黄柏配伍二妙丸类方后,小檗碱、巴马汀及药根碱的含量在基本方 2M 及不同类方中呈现一定的变化规律,在 4M 中的含量变化较少。4M 是在 3M 基础上加牛膝配伍而成,牛膝中含有的酸性皂苷^[15]并没有显著减少黄柏生物碱含量。结果提示,黄柏配伍其他药物后,小檗碱型生物碱与酸性成分形成复合物仅是引起其溶出率变化的原因之一,在类方方剂中,有效成分在基本方及其相关类方中的含量变化不同,可能与方剂的作用功效相关。

本试验采用离子对高效液相色谱法,参照 2005 年版《中国药典》中黄柏药材的盐酸小檗碱测定的色谱条件,但巴马汀、药根碱色谱峰的分度及对称性不理想。因此调整了十二烷基磺酸钠的用量,小檗碱、巴马汀、药根碱色谱峰的分度、对称因子、理论塔板数、对称性等参数都显著改善,该方法灵敏、准确,可用于黄柏等含小檗碱型生物碱中药材及制剂的质量控制。

二妙丸类方抗痛风效应物质基础有水溶性的生物碱类、皂苷类、有机酸类成分及亲脂性的黄酮类成分^[10],并且稀醇提取抗痛风药效比水煎煮的更显著,故采用 50% 甲醇溶液超声提取观察黄柏生物碱成分配伍二妙丸类方后含量变化。该实验结果在一定程度上反映了黄柏生物碱成分配伍二妙丸类方的变化规律,但与实际临床应用水煎煮法提取成分配伍前后含量的变化还是有一定差异的。

[参考文献]

[1] 汪显阳. 大黄牡丹汤不同配伍对有效成分煎出的影响[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(3): 161.
[2] 何伟, 秦林, 司淑媛. 附子与白芍配伍前后乌头碱煎

出量的测定[J]. 中草药, 2002, 33(7): 600.

[3] 李秀玲, 肖红斌, 徐青, 等. 中药川芎和赤芍配伍规律的方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(9): 1632.
[4] 宋小莉. 基于 OD-IM-RD 模式的半夏泻心汤及其类方配伍规律研究[D]. 北京中医药大学博士论文, 2005: 1.
[5] 刘屏, 汪进良, 王燕, 等. 开心散类方配伍及抗抑郁作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(5): 279.
[6] 李果, 肖小河, 金城, 等. 六味地黄丸及其类方配伍规律的研究与进展[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43): 174.
[7] 尹莲, 史欣德. 治疗急性痛风加味四妙丸的临床应用概述[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(1): 63.
[8] 尹莲. 二妙丸系列类方作用规律的相关性探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 94.
[9] 朱晓勤, 尹莲, 徐立, 等. 二妙丸系列类方有效部位群药效学比较研究[J]. 中医药导报, 2008, 14(2): 22.
[10] 尹莲, 徐立, 时乐. 加味四妙丸有效部位群的筛选研究[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2005, 7(4): 28.
[11] 张焯, 崔征, 周海燕, 等. 高效液相色谱法测定关黄柏不同采收期及黄檗不同部位的小檗碱、巴马汀含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(3): 194.
[12] 夏荃, 李灿明. HPLC 测定黄柏生品与不同炮制品中 3 种生物碱的含量[J]. 中成药, 2008, 30(7): 1018.
[13] 丁林生, 徐瑞华, 吴振杰, 等. 白头翁汤中小檗碱含量降低原因初探[J]. 中成药, 1993, 15(1): 18.
[14] 林似兰, 赵陆华, 吴智南, 等. 大黄、黄连、黄柏、黄芩在复方汤剂中的反应研究-配伍变化对有效成分溶出率的影响[J]. 中草药, 1989, 20(6): 10.
[15] 徐先祥, 孔树佳. 牛膝皂苷类成分药理作用研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(1): 63.

[责任编辑 顾雪竹]