

RP-HPLC 法同时测定黄连中 四种原小檗碱型生物碱的含量*

□袁久荣** 魏英勤 袁浩 徐娟 容蓉
(山东中医药大学 济南 250014)

摘要:目的:建立用 RP-HPLC 技术同时测定黄连中小檗碱、巴马亭、黄连碱及药根碱等 4 种原小檗碱型生物碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。测定黄连药材中上述 4 种原小檗型生物碱的含量。结果:4 种原小檗碱型生物碱的平均含量分别为:5.74% (RSD = 1.7%) (n = 9), 1.33% (RSD = 1.3%) (n = 9), 3.67% (RSD = 2.8%) (n = 9), 0.95% (RSD = 5.2%) (n = 9)。结论:该方法可用于同时测定黄连中 4 种原小檗碱型生物碱的含量,且简便、准确、可靠、快速,并具有重现性。

关键词:黄连 RP-HPLC 生物碱

黄连为毛茛科植物黄连 (*Coptis chinensis* Franch.) (味连) 的干燥根茎,具有清热燥湿,泻火解毒之功效,主治心中烦而心下痞者,兼治腹痛、呕吐、下利、脉促、血症。可用于治疗湿热痞满、呕吐吞酸、泻痢、黄疸、高热神昏、心火亢盛、心烦不寐、血热吐衄、目赤、牙痛、消渴、痈肿疔疮等。因其主要含有小檗碱、巴马亭、黄连碱及药根碱等 4 种原小檗碱型生物碱,因此这些生物碱含量的测定对于黄连药材及其制剂的质量控制具有重要意义。黄连及其制剂中生物碱的分析的研究已有报道^[1-8],本文选用十二烷基硫酸钠作为离子对试剂以增加生物碱在 C18 柱上的保留,以乙腈-水(48:52, 每 1L

含磷酸二氢钾 3.4g, 十二烷基硫酸钠 1.7g) 为流动相分离分析了黄连药材中的原小檗碱型生物碱。

一、仪器与试剂

Beckman HPLC 仪 (110B 型泵, 420 型控制器, 可变波长紫外检测器) (美国 Beckman 公司); HP 3396 II 积分仪 (美国惠普公司); SHIMADZU 高效液相色谱仪 (LC-10AT 泵, LC-10 紫外检测器) (日本); N 2000 色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所)。黄连 (味连, *Coptis chinensis* Franch.) 购自山东建联中药店, 经姚庭芝主任药师鉴定; 盐酸小檗碱 (Berberine hydrochloride)、盐酸巴马亭 (Palmatine hydrochloride)、盐酸药根碱 (Jatrorrhizine hydrochloride) 均购自中国药品生

收稿日期:2006-03-13

修回日期:2006-07-24

* 山东省自然科学基金项目 (Y2002C07): 中药全息指纹图谱智能质量控制方法学研究, 负责人: 袁久荣。

** 联系人: 袁久荣, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药复方物质基础与质量控制方法学研究, Tel: 0531-82965200, E-mail: ytianr@126.com。

物制品鉴定所;硫酸黄连碱(Coptisine sulphate)由周洪雷博士提供(纯度>99%)。试剂:乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

二、方法与结果

1. 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5μm);流动相为乙腈-水(48:52,每1L含磷酸二氢钾3.4g,十二烷基硫酸钠1.7g);流速为1.0mL·min⁻¹;检测波长为345nm;进样量为20μL。

2. 对照品溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱对照品6.00mg、盐酸巴马亭对照品1.65mg、硫酸黄连碱对照品4.25mg及盐酸药根碱对照品10.68mg,分别以浓盐酸-甲醇(1:99,V/V)定容于10mL容量瓶中,作为对照品溶液。

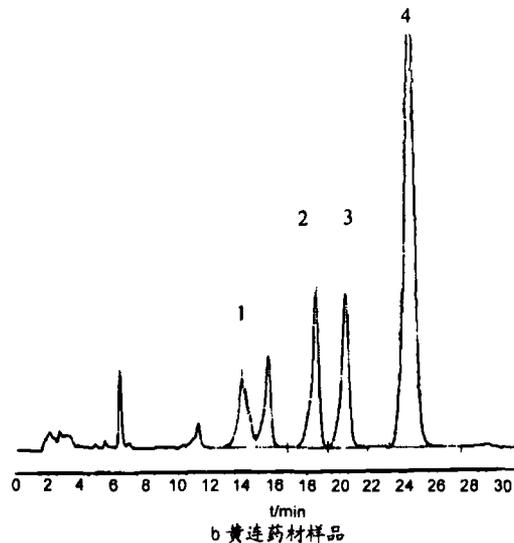
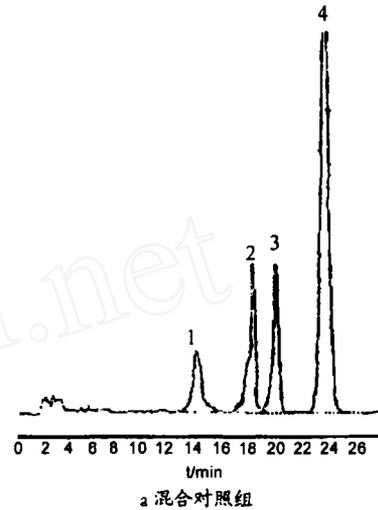
3. 供试品溶液的制备

取黄连药材分别粉碎至过20目筛,称取约0.1g,精密称定,置于100mL容量瓶中,加浓盐酸-甲醇(1:99,v/v)约95mL,60℃水浴15min,超声振荡30min,静置过夜,浓盐酸-甲醇(1:99,v/v)定容至刻度,混匀,0.45μm滤膜过滤,即得。按上述色谱条件测定。其色谱图见图1。以盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、硫酸黄连碱及盐酸药根碱4种生物碱的对照品确定色谱峰的归属,外标一点法定量。

4. 标准曲线及线性范围

依次分别准确量取盐酸小檗碱对照品溶液40,100,120,140,160μL;盐酸巴马亭对照品溶液70,100,120,140,180μL;硫酸黄连碱对照品溶液7,12,16,28,36μL及盐酸药根碱对照品溶液3,4,6,7,9μL;以盐酸-甲醇(1:100)定容于1mL容量瓶中。摇匀,精密吸取上述各溶液20μL,按上述色谱条件分别测定,以进样浓度为横坐标(X),3次测得的峰面积均值为纵坐标(Y),峰面积对相应进样浓度进行线性回归计算,得盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、硫酸黄连碱及盐酸药根碱的回归方程分别为

$$Y = 6202759.4X + 25626.6, r = 0.9994$$



1:药根碱(Jatrorrhizine);2:黄连碱(Coptisine);3:巴马亭(Palmatine);4:小檗碱(Berberine)

图1 RP-HPLC 色谱图

$$Y = 5362351.1X - 1371.35, r = 0.9994$$

$$Y = 3664684.6X + 10731.1, r = 0.9992$$

$$Y = 7543678.95X + 3808.04, r = 0.9992$$

其结果分别表明在0.024~0.096mg·mL⁻¹、0.01155~0.03005mg·mL⁻¹、0.00298~0.02679mg·mL⁻¹及0.0032~0.0096mg·mL⁻¹范围内进样浓度与峰面积呈良好的线性关系。

5. 精密度试验

取 $0.06\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸小檗碱对照品溶液, 依法进样测定 5 次考察仪器精密度, 结果表明, 盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 0.96% ($n=5$)。

6. 稳定性及重现性试验

小檗碱、巴马亭、黄连碱及药根碱等原小檗碱型生物碱的分子结构相似, 化学性质亦相似, 故选择小檗碱考察方法学稳定性和重现性。取供试品溶液分别于 0、1、2、4、7、11h 进样, 按上述色谱条件测定盐酸小檗碱含量, 结果表明, 峰面积在 11h 内基本稳定, RSD 为 2.11%。同一供试品溶液小檗碱峰面积 RSD 为 1.55% ($n=5$)。

7. 回收率试验

分别取 5 份已测知这 4 种生物碱含量的黄连药材各约 50mg, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液 (含盐酸小檗碱 2.8mg, 盐酸巴马亭 0.65mg, 硫酸黄连碱 1.8mg, 盐酸药根碱 0.46mg), 按供试液制备和含量测定方法操作, 结果该法测定黄连药材中的小檗碱、巴马亭、黄连碱、药根碱, 回收率分别为 102.3% (RSD 为 3.0%) ($n=5$)、101.5% (RSD 为 1.8%) ($n=5$)、103.7% (RSD 为 3.6%) ($n=5$)、113.3% (RSD 为 7.0%) ($n=5$)。见表 1。

8. 样品的含量测定

按上述供试品溶液的制备方法和测定条件, 测定了 3 批。黄连药材样品中盐酸小檗碱的含量为 5.74% (RSD = 1.7%) ($n=9$), 盐酸巴马亭的含量为 1.33% (RSD = 1.3%) ($n=9$), 硫酸黄连碱的含量为 3.67% (RSD = 2.8%) ($n=9$), 盐酸药根碱的含量为 0.95% (RSD = 5.2%) ($n=9$)。见表 2。

三、讨论

1. 检测波长的选择

紫外光谱表明, 盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、硫酸黄连碱和盐酸药根碱的吸收曲线形状相似, 这 4 种生物碱在 345nm 附近都有最大吸收, 因此选择 345nm 为检测波长。

表 1 黄连药材测定的回收率试验结果 ($n=5$)

组分	样品中含量 (mg)	加入对照品的量 (mg)	测出对照品的量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
盐酸小檗碱	2.936	2.8	5.837	103.6	102.3	3.0
	2.837	2.8	5.745	102.4		
	2.829	2.8	5.755	104.5		
	2.814	2.8	5.723	103.9		
	2.942	2.8	5.660	97.07		
盐酸巴马亭	0.7048	0.65	1.368	102.1	101.5	1.8
	0.6907	0.65	1.349	101.3		
	0.6790	0.65	1.354	103.8		
	0.6754	0.65	1.336	101.6		
	0.7060	0.65	1.347	98.65		
硫酸黄连碱	1.890	1.8	3.783	105.2	103.7	3.6
	1.852	1.8	3.722	103.9		
	1.820	1.8	3.766	108.1		
	1.811	1.8	3.676	103.6		
	1.893	1.8	3.653	97.8		
盐酸药根碱	0.5413	0.46	1.088	118.8	113.3	7.0
	0.5305	0.46	1.049	112.8		
	0.5215	0.46	1.075	120.4		
	0.5188	0.46	1.043	113.9		
	0.5423	0.46	1.004	100.4		

表 2 黄连药材的含量测定结果 ($n=3$)

样品	盐酸小檗碱		盐酸巴马亭		硫酸黄连碱		盐酸药根碱	
	含时 (%)	RSD%						
药材 1#	5.75	2.3	1.38	1.8	3.70	3.2	1.06	5.6
药材 2#	5.43	1.2	1.26	1.0	3.58	2.5	0.86	4.8
药材 3#	6.03	1.7	1.36	1.2	3.72	2.7	0.94	5.1
平均值	5.74	1.7	1.33	1.3	3.67	2.8	0.95	5.2

2. 流动相的选择

黄连中原小檗碱型生物碱属于季铵盐,不易在 C18 柱上保留。采用硅胶柱分离分析黄连及其制剂中原小檗碱型生物碱^[2-3],易造成不可逆吸附。曾向流动相中加入三乙胺抑制原小檗碱型生物碱色谱峰拖尾,分离效果也不理想。故选用乙腈-水溶液(48:52,每 1L 含磷酸二氢钾 3.4g,十二烷基硫酸钠 1.7g)作为流动相。

3. 柱温的影响

20℃ 以上测定效果较好,柱温太低,流动相易析出絮状物。

参考文献

1 邱晓星,伍朝真,陈柏林. 胶束色谱分析黄连及含黄连中成药中小檗

碱型生物碱的研究. 药学学报,1986,21(6):458-459.

2 赵陆华,蔡星瀛,董善士,等. HPLC 法测定黄连、黄柏及其中成药中小檗碱型生物碱的含量. 中国药科大学学报,1989,20(2):82-83.

3 林似兰,赵陆华,王义明,等. 安宫牛黄丸中小檗碱的 HPLC 法测定. 药学学报,1989,24(1):48-49.

4 孟令杰,阎汝南,陈定一,等. 反相高效液相色谱法测定含黄连中成药中小檗碱、黄连碱和巴马亭的含量. 中成药,1989,11(12):11-12.

5 吕光华,陈建民,肖培根. 改变检测波长 HPLC 测定小檗属植物根中的生物碱. 药学学报,1995,30(4):280-285.

6 张永友,欧阳植,张国华,等. 黄连、黄柏及其成药中小檗碱型生物碱的 HPLC 测定. 药的分析杂志,1995,15(增刊):171-172.

7 饶伟文,钟雪芳,冀贻菁. 盐酸小檗碱片的光光度法与 HPLC 测定. 北京中医药大学学报,1999,22(4):27-28.

8 钟国跃,黄小平,陈仕江,等. 黄连(味连)“有限成分组合质量标准”的研究. 世界科学技术-中医药现代化,2004,6(6):72-75.

Simultaneous Determination of Four Berberine - type Alkaloids in *Coptis chinensis* Franch Using RP - HPLC

Yuan Jiurong, Wei Yingqin, Yuan Hao, Xu Juan, Rong Rong

(School of Materia Medica, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

This study is to establish a quantitative method for analyzing the concentration of four berberine - type alkaloids in *Coptis chinensis* Franch in a simultaneous manner, using RP - HPLC. The RP - HPLC process, made up of Hypersil - 18 Column (250mm × 4.6mm, 5μm), a mixed mobile phase of acetonitrile - Water (48:52, KH₂PO₄ 3.4g, SDS 1.7g every 1L), a flow velocity of 1.0 mL · min⁻¹, and a detection wavelength of 345nm, is employed to simultaneously determine the concentration of four Berberine - type Alkaloids in *Coptis chinensis* Franch. The study has produced the following results: linear calibration curves for Berberine, Palmaune, Coptisine, and Jatrorrhizine in a respective range of 0.024 ~ 0.096mg · mL⁻¹ and r = 0.9994; 0.01155 ~ 0.03005mg · mL⁻¹ and r = 0.9994; 0.00298 ~ 0.02679mg · mL⁻¹ and r = 0.9992; and 0.0032 ~ 0.0096mg · mL⁻¹ and r = 0.9992. The average recovery rates are registered respectively at 102.3% and RSD = 3.0% (n = 3); 101.5% and RSD = 1.8% (n = 3); 103.7% and RSD = 3.6% (n = 3); and 113.3% and RSD = 7.0% (n = 3). The average concentration of four berberine - type alkaloids in *Coptis chinensis* Franch is measured at 5.74% (RSD = 1.7%) (n = 9); 1.33% (RSD = 1.3%) (n = 9); 3.67% (RSD = 2.8%) (n = 9); and 0.95% (RSD = 5.2%) (n = 9) respectively. It is concluded that the method is simple, accurate, reliable, quick and reproducible. It can be used for quantitative analysis of four berberine - type alkaloids in *Coptis chinensis* Franch in a simultaneous manner.

Keywords: *Coptis chinensis* Franch; RP - HPLC; alkaloids

(责任编辑:张述庆,责任编审:陈建民,责任译审:邹春中)

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 39