

# UPLC法同时测定黄连与代综方中4种生物碱的含量<sup>△</sup>

陈健龙<sup>1,2\*</sup>, 张玉玲<sup>1,2</sup>, 肖胜利<sup>1</sup>, 崔翰明<sup>1#a</sup>, 贡济宇<sup>2#b</sup> (1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 长春中医药大学, 长春 130117)

中图分类号 R283.64; R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2152-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.14

**摘要** 目的: 建立同时测定黄连与代综方中药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱4种原小檗碱型生物碱含量的方法。方法: 采用超高效液相色谱法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水(含2 mmol 乙酸铵和0.05% 甲酸, 30:70, V/V, pH3.20), 流速为0.3 ml/min, 柱温为30 ℃, 检测波长为345 nm。结果: 盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的质量浓度分别在21.76~1 088.05、20.88~1 044.00、17.68~884.05、18.32~916.10 ng/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*均为0.999 9)。精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均<5%。平均加样回收率结果:(1)黄连: 盐酸药根碱为101.56%, RSD=2.16% (*n*=6); 盐酸黄连碱为100.21%, RSD=3.32% (*n*=6); 盐酸巴马汀为97.60%, RSD=1.96% (*n*=6); 盐酸小檗碱为98.81%, RSD=1.48% (*n*=6)。(2)代综方: 盐酸药根碱为98.87%, RSD=2.41% (*n*=6); 盐酸黄连碱为99.12%, RSD=2.68% (*n*=6); 盐酸巴马汀为98.98%, RSD=2.23% (*n*=6); 盐酸小檗碱为98.55%, RSD=2.82% (*n*=6)。最低检出限和最低定量限: 盐酸药根碱分别为4.50、14.99 ng/ml, 盐酸黄连碱分别为5.10、17.00 ng/ml, 盐酸巴马汀分别为4.81、16.04 ng/ml, 盐酸小檗碱分别为4.64、15.47 ng/ml。结论: 该方法简便、灵敏、准确、高效, 可用于黄连及其复方制剂的质量控制。

**关键词** 超高效液相色谱法; 黄连; 代综方; 药根碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱; 含量测定

## Simultaneous Determination of 4 Kinds of Alkaloids from *Coptidis Rhizoma* and *Daizongfang* by UPLC

CHEN Jian-long<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-ling<sup>1,2</sup>, XIAO Sheng-li<sup>1</sup>, CUI Han-ming<sup>1</sup>, GONG Ji-yu<sup>2</sup> (1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of jatrorrhizine, coptisine, palmatine and berberine, 4 kinds of alkaloid in *Coptidis Rhizoma* and *Daizongfang*. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (2 mmol ammonium acetate and 0.05% formic acid, 30:70, V/V, pH=3.20) at the flow rate of 0.3 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was 345 nm. RESULTS: The liner ranges of jatrorrhizine, coptisine, palmatine and berberine hydrochloride were 21.76-1 088.05 ng/ml, 20.88-1 044.00 ng/ml, 17.68-884.05 ng/ml and 18.32-916.10 ng/ml (all *r*=0.999 9), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility test were all lower than 5%. The average recoveries of jatrorrhizine, coptisine, palmatine and berberine hydrochloride in *Coptidis Rhizoma* were 101.56% (RSD=2.16%), 100.21% (RSD=3.32%), 97.60% (RSD=1.96%) and 98.81% (RSD=1.48%), respectively (*n*=6). The average recoveries of 4 alkaloids in *Daizongfang* were 98.87% (RSD=2.41%), 99.12% (RSD=2.68%), 98.98% (RSD=2.23%), 98.55% (RSD=2.82%), respectively (*n*=6). The lowest detectable and quantitative concentration of 4 alkaloids were 4.50 and 14.99 ng/ml, 5.10 and 17.00 ng/ml, 4.81 and 16.04 ng/ml, 4.64 and 15.47 ng/ml, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for the quality control of *Coptidis Rhizoma* and its component preparation.

**KEY WORDS** UPLC; *Coptidis Rhizome*; *Daizongfang*; Jatrorrhizine; Coptisine; Palmatine; Berberine; Content determination

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎, 具有清热燥湿、泻火解毒等功效<sup>[1]</sup>, 主要用于治疗痢疾、急性胃肠炎、慢性腹泻、呼吸道感染以及各种炎症; 近年研

究发现, 其在抗肿瘤、抗心律失常、降血糖等方面亦有明显作用<sup>[2]</sup>。黄连的主要功效成分为原小檗碱型生物碱, 如小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、药根碱和非洲防己碱等。代综

<sup>△</sup> 基金项目: 国家科技重大新药创制专项资助课题(No.2011ZX09102-011-08)

\* 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: 418295735@qq.com

#a 通信作者: 副研究员, 硕士。研究方向: 中药药效物质、质量分析和新制剂研发。电话: 010-88001470。E-mail: cui-yaoshi@163.com

#b 通信作者: 教授。研究方向: 中药分析。电话: 0431-86172207。E-mail: gjy0431@126.com

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址: 江苏省江阴市经济开发区秦望山路8号 电话: 400 066 9211  
传真: 0510-86409611 网址: <http://www.tianjiang.com>

方是一个由黄连、炒枳实、瓜蒌和半夏等药味组成的中药复方,主要用于治疗糖脂代谢紊乱的代谢综合征。文献中常用的高效液相色谱(HPLC)法虽然可用于测定黄连中4种主要生物碱的含量<sup>[3-5]</sup>,但较难完全分离药根碱和非洲防己碱,因而无法准确定量。超高效液相色谱(UPLC)法采用小粒径(1.7 μm)的填料和超高压输液泵,具有超高分离度、灵敏度和高速度等特点,因此笔者采用UPLC法建立了黄连与代综方制剂中药根碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量测定方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-Class型UPLC仪(美国Waters公司);ME215P型电子分析天平(德国Sartorius公司);KQ-500PE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);超纯水器(美国Millipore公司)。

### 1.2 药品与试剂

代综方片(中国中医科学院广安门医院中药研发室提供,批号:20120208、20120406、20120503);盐酸药根碱(批号:110733-201007)、盐酸小檗碱(批号:110713-200609)对照品购自中国食品药品检定研究院;盐酸黄连碱对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:1125876,纯度>98%];盐酸巴马汀对照品(美国Sigma公司,批号:361615,纯度>98%);乙腈、甲醇为色谱纯,乙酸铵、甲酸及其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 药材

黄连(广州中一药业有限公司,批号:20090203、20090206、20090208,产地:四川),经中国中医科学院广安门医院中药研发室崔翰明副研究员鉴定来源为黄连*C. chinensis* Franch.。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:乙腈-水(含2 mmol乙酸铵和0.05%甲酸,30:70, V/V, pH3.20);流速:0.3 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:345 nm。色谱见图1。

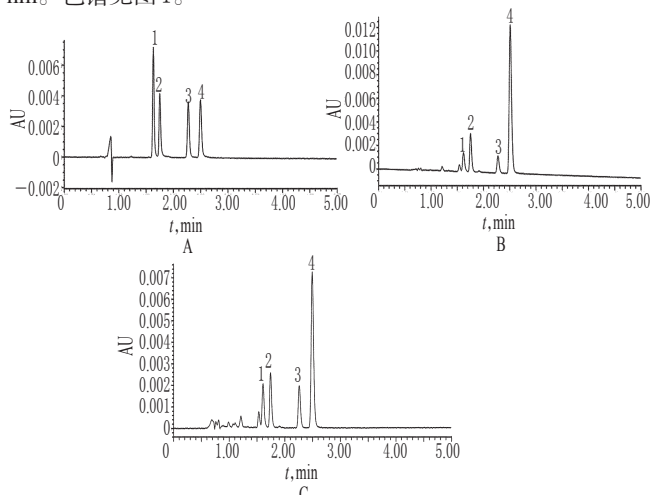


图1 超高效液相色谱图

A.混合对照品;B.代综方供试品;C.黄连药材供试品;1.盐酸药根碱;2.盐酸黄连碱;3.盐酸巴马汀;4.盐酸小檗碱

Fig 1 UPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample of Daizongfang; C. test sample of *Coptidis Rhizoma*; 1. jatrorrhizine; 2. coptisine; 3. palmatine; 4. berberine

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品贮备液的制备 精密称取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱对照品各适量,分别以浓盐酸-甲醇(1:100, V/V)溶解并定容至10 ml量瓶中,即得四者质量浓度分别为183.22、217.61、176.81、208.80 μg/ml的单一成分对照品贮备液。分别取上述对照品贮备液各1 ml,置于同一100 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。于4 ℃冰箱中贮藏,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取代综方片(批号:20120503)20片,研细,过四号筛,混匀,精密称定约30 mg,以浓盐酸-甲醇(1:100, V/V)溶解并定容至100 ml量瓶中,超声提取(功率:250 W,频率:100 kHz)40 min,混匀,滤过,取续滤液1 ml,用流动相稀释5倍,即得代综方的供试品溶液。

另取黄连药材粉末(过二号筛)约50 mg,置于具塞锥形瓶中,加浓盐酸-甲醇(1:100, V/V)50 ml,称质量,超声提取(功率:250 W,频率:100 kHz)40 min,取出,放至室温,再次称质量,用浓盐酸-甲醇(1:100, V/V)补足减失的质量,滤过,取续滤液1 ml,用流动相稀释400倍,即得黄连药材的供试品溶液。

## 2.3 线性关系考察

分别取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,振摇混匀,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得盐酸药根碱的回归方程为 $y=74.838x-551.04$ ( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ),线性范围为21.76~1 088.05 ng/ml;盐酸黄连碱的回归方程为 $y=54.903x-449.27$ ( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ),线性范围为20.88~1 044.00 ng/ml;盐酸巴马汀的回归方程为 $y=61.268x-469.22$ ( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ),线性范围为17.68~884.05 ng/ml;盐酸小檗碱的回归方程为 $y=67.323x-337.46$ ( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ),线性范围为18.32~916.10 ng/ml。

## 2.4 精密度试验

取线性范围内高、中、低3种不同质量浓度的混合对照品溶液各适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱的RSD分别为4.55%、1.09%、0.38%( $n$ 均为6);盐酸药根碱的RSD分别为4.20%、0.23%、0.07%( $n$ 均为6);盐酸巴马汀的RSD分别为4.43%、0.54%、0.21%( $n$ 均为6);盐酸黄连碱的RSD分别为4.99%、1.35%、0.19%( $n$ 均为6),表明仪器精密度良好。

## 2.5 稳定性试验

取同一代综方片的供试品溶液适量,分别于0、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的RSD分别为4.44%、4.06%、4.01%、4.80%( $n$ 均为6),表明代综方的供试品溶液在24 h内稳定性良好。

取同一黄连药材的供试品溶液适量,分别于0、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的RSD分别为3.67%、3.59%、3.84%、3.97%( $n$ 均为6),表明黄连供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.6 重复性试验

取同一批代综方片适量,研细,过四号筛,混匀,取粉末30 mg,精密称定,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中4种生

物碱的平均含量。结果,盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的平均质量分数分别为0.355 8%、0.738 2%、0.592 5%、3.106 3%,RSD分别为3.08%、3.12%、3.61%、3.52%(*n*均为6),表明本方法重复性良好。

取同一批黄连药材粉末(过二号筛)适量,混匀后取细粉50 mg,精密称定,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中4种生物碱的平均含量。结果,盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的平均质量分数分别为1.612 3%、2.591 0%、2.074 4%、6.992 7%,RSD分别为1.02%、1.08%、1.83%、1.66%(*n*均为6),表明本方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批代综方片粉末约30 mg,共6份,分别精密加入“2.2.1”项下盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品贮备液依次为0.5、1、1、5 ml,然后以浓盐酸-甲醇(1:100, *V/V*)定容至100 ml量瓶中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算4种生物碱的加样回收率,结果见表1。

精密称取已知含量的同一批黄连药材粉末约50 mg,共6份,分别精密加入“2.2.1”项下盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品贮备液依次为5、5、5、25 ml,然后再加入10 ml浓盐酸-甲醇(1:100, *V/V*),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,计算4种生物碱的加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(*n*=6)

Tab 1 Results of recovery tests(*n*=6)

被测物	生物碱	样品含量,ng/ml	加入量,ng/ml	测得量,ng/ml	$\bar{x}$ ,%	RSD, %
代综方片	盐酸药根碱	214.903 2	217.61	430.055 7	98.87	2.41
	盐酸黄连碱	445.872 8	417.60	849.193 5	99.12	2.68
	盐酸巴马汀	357.870 0	353.62	707.490 0	98.98	2.23
	盐酸小檗碱	187.620 5	183.22	368.190 0	98.55	2.82
黄连药材	盐酸药根碱	40.534 7	54.40	95.784 3	101.56	2.16
	盐酸黄连碱	65.141 8	52.20	117.451 5	100.21	3.32
	盐酸巴马汀	52.155 4	44.20	95.292 4	97.60	1.96
	盐酸小檗碱	175.812 3	229.00	402.085 9	98.81	1.48

## 2.8 最低检出限和定量限测定

本方法测出的最低检出限和最低定量限结果见表2。

表2 4种生物碱的最低检出限和最低定量限测定结果

Tab 2 The lowest detectable and quantitative concentrations of 4 kinds of alkaloids

生物碱	最低检出限,ng/ml	最低定量限,ng/ml
盐酸药根碱	4.50	14.99
盐酸黄连碱	5.10	17.00
盐酸巴马汀	4.81	16.04
盐酸小檗碱	4.64	15.47

## 2.9 样品含量测定

取各批黄连和代综方样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中4种生物碱的含量,结果见表3。

## 3 讨论

试验中曾对流动相组成和比例进行了考察,发现甲酸和乙酸铵的组合最佳,最后确定流动相为乙腈-水(含2 mmol/L乙酸铵和0.05%甲酸,30:70, *V/V*)。因流动相流速仅为0.3 ml/min,远小于常规HPLC的1 ml/min,样品的溶剂效应影响明

表3 样品含量测定结果(*n*=6)

Tab 3 Results of content determination of samples(*n*=6)

项目	代综方片			黄连药材		
	20120208	20120406	20120503	20090203	20090206	20090208
盐酸药根碱, %	0.359 9	0.364 3	0.355 8	1.655 5	1.601 1	1.612 3
RSD, %	3.23	3.11	3.08	1.44	1.87	1.02
盐酸黄连碱, %	0.754 2	0.733 1	0.738 2	2.615 7	2.609 9	2.591 0
RSD, %	3.26	3.39	3.12	1.55	1.39	1.08
盐酸巴马汀, %	0.588 6	0.591 0	0.592 5	2.080 5	2.057 5	2.074 4
RSD, %	3.78	3.80	3.61	1.83	2.03	1.83
盐酸小檗碱, %	3.116 2	3.120 9	3.106 3	7.026 1	7.009 4	6.992 7
RSD, %	3.49	3.55	3.52	1.99	1.26	1.66

显,所以在对照品和供试品溶液的制备过程中选择用流动相来定容,以消除溶剂效应。试验中发现柱温对4种生物碱的保留时间影响较大,较低的温度有利于其分离,但是温度低会明显增加柱压;各成分色谱峰在30℃下可达到基线分离,高于35℃时盐酸药根碱和盐酸黄连碱的分离度明显下降,较难实现基线分离,故最终确定柱温为30℃。

文献有关黄连生物碱类成分的HPLC测定方法较多<sup>[6-8]</sup>,多数色谱条件与2010年版《中国药典》近似,采用了离子对色谱法,但分离效果较差,峰形易拖尾、系统平衡时间长、对色谱柱损伤大,并且对于药根碱和非洲防己碱也不易达到基线分离。笔者采用UPLC法,4种生物碱色谱峰峰形对称性和分离度均较好,且测定只需5 min,进样量仅需5 μl,节约了测定时间和样品、流动相的用量。

本试验还对供试品溶液的制备方法进行了考察。分别选择75%甲醇、甲醇和浓盐酸-甲醇(1:100, *V/V*)3种溶剂进行提取,结果发现浓盐酸-甲醇(1:100, *V/V*)作为提取液所得峰面积较大。试验还对回流和超声提取方法进行了比较,发现两种方法所得峰面积大小基本相同,考虑到操作的方便性,选择超声法提取。最终的样品提取方法为:用浓盐酸-甲醇(1:100, *V/V*)溶剂一次超声提取40 min,即可提取完全。

综上,本方法简便、灵敏、准确、高效,可用于黄连及其复方制剂的质量控制。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:285.
- [2] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2006, 9(5): 469.
- [3] 邓六勤, 钟鸣. RP-HPLC法测定黄连上清片中盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(16): 1514.
- [4] 武小赞, 李铁钢, 阳勇, 等. HPLC法测定黄连中主要生物碱的方法学研究[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(6): 112.
- [5] 袁久荣, 魏英勤, 袁浩, 等. RP-HPLC法同时测定黄连中四种原小檗碱型生物碱的含量[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2006, 8(6): 36.
- [6] 李明月, 杨惊宇, 刘西京, 等. RP-HPLC法测定变通丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(27): 2555.
- [7] 崔国辉, 袁汉尧, 周克元. RP-HPLC测定3种黄连中的生物碱含量[J]. 海南医学, 2010, 21(16): 4.
- [8] 张宝喜, 彭福, 罗维早, 等. 不同产地黄连中6个生物碱含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(2): 128.

(收稿日期:2012-08-05 修回日期:2012-12-26)