

HPLC法同时测定不同等级黄柏饮片中多指标成分的含量

吴珊珊^{1*}, 胡麟¹, 龚晓猛¹, 李梦琪¹, 陈志敏¹, 胡昌江^{1#}, 李文兵²(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 成都 611930)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)15-2135-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.15.40

摘要 目的:建立同时测定黄柏饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱含量的方法,并比较不同等级黄柏饮片中3种成分的含量。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈,流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(梯度洗脱),流速为1 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μl。结果:盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱的检测进样量线性范围分别为0.387 0~7.740、0.044 4~0.888 0、0.048 0~0.960 0 μg($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为95.61%~103.22%、96.18%~102.80%、97.93%~102.78%,RSD分别为2.80%、1.84%、1.84%($n=6$)。结论:该方法操作简单、结果准确,适用于测定黄柏饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱的含量;一级饮片中盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱的含量高于二级饮片,但两个等级饮片中木兰花碱的含量无显著性差异。

关键词 高效液相色谱法;黄柏;饮片;等级

Simultaneous Content Determination of Multiple Indicator Ingredients in Different Grades of *Phellodendron amurense* Decoction Piece by HPLC

WU Shanshan¹, HU Lin¹, GONG Xiaomeng¹, LI Mengqi¹, CHEN Zhimin¹, HU Changjiang¹, LI Wenbing²(1.School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.Sichuan New Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Chengdu 611930, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous content determination of berberine hydrochloride, phellodendrine hydrochloride and magnoflorine in *Phellodendron amurense* decoction piece, and to compare the contents of the 3 ingredients in different grades of *P. amurense* decoction piece. METHODS: HPLC was performed on the column of Phenomenex Luna C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.05 mol/L KH₂PO₄ (gradient elution) at a flow rate of 1 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 30 ℃, and injection volume was 5 μl. RESULTS: The linear ranges were 0.387 0-7.740 μg for berberine hydrochloride ($r=0.999\ 9$), 0.044 4-0.888 0 μg for phellodendrine hydrochloride ($r=0.999\ 8$) and 0.048 0-0.960 0 μg for magnoflorine ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%, recoveries were 95.61%-103.22% (RSD=2.80%, $n=6$), 96.18%-102.80% (RSD=1.84%, $n=6$) and 97.93%-102.78% (RSD=1.84%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the contents determination of berberine hydrochloride, phellodendrine hydrochloride and magnoflorine in *P. amurense*. The contents of berberine hydrochloride and phellodendrine hydrochloride in the first-grade decoction piece are higher than those in the second-grade decoction piece, and the content of magnoflorine in both decoction pieces shows no discernible differences.

KEYWORDS HPLC; *Phellodendron amurense*; Decoction piece; Grade

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮,习称川黄柏,有两千多年药用历史^[1],其主产于四川、贵州、湖北等地。黄柏具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功效。黄柏饮片作为中成药的原料药与处方用药,在市场上应用广泛。目前,市场上的黄柏饮片等级、规格划分不清楚且没有统一标准,大多只是采用产地以及传统的“肉厚色深”等经验进行区分。随着饮片质量要求的提高,研究者开始关注饮片等级规格的划分^[2-8]。笔者对黄柏饮片进行等级规格研究,便于饮片进行优质优价管理,从而利于临床应用。而对黄柏饮片等级规格标准的研究,除应用传统经验鉴别外,还应结合现有已知有效成分含量的高低对饮片等级规格质量进行评价,建立不同等级饮片的质量标准。本试验参考原国家医药

管理局和卫生部颁发的《七十六种药材商品规格标准》^[9]以及笔者的前期研究基础^[10-11],采用高效液相色谱(HPLC)法建立了测定黄柏饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱含量的方法,为规范黄柏饮片等级划分提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);KQ-300E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:40 kHz);BP-61型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(批号: MUST-111212110)、盐酸黄柏碱对照品(批号: MUST-12021407)、木兰花碱对照品(批号: MUST-12022901)均购自成都曼思特生物科技有限公司,纯度均>98%;甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 饮片

* 博士研究生。研究方向:中药炮制原理。E-mail: 569222020@qq.com

通信作者:教授。研究方向:中药炮制原理。E-mail: hhccjj@hotmail.com

黄柏饮片(批号:20120402、20120415、20120518、20130507、20130524、20130529、20130603、20120324、20120412、20120524、20120604、20130229、20130311、20130417)购自四川、贵州、湖南、湖北等地,经成都中医药大学药学院生药教研室卢先明教授鉴定为黄皮树 *P. chinense* Schneid. 的干燥树皮(按传统分级方法分为一级饮片和二级饮片),样品采集情况见表1。

表1 样品采集情况

Tab 1 Sampling collection

等级	批号	采集方式	等级	批号	采集方式
一级黄柏饮片	20120402	实地采集	二级黄柏饮片	20120324	购买
	20120415	实地采集		20120412	购买
	20120518	实地采集		20120524	购买
	20130507	实地采集		20120604	购买
	20130524	实地采集		20130229	购买
	20130529	实地采集		20130311	购买
	20130603	实地采集		20130417	购买

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相(A):乙腈(A)-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(B, 45:55, V/V)(每100 ml中加入0.4 g 十二烷基硫酸钠,调pH至4.8),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μl。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0~12	100	0
12~18	100→0	0→100
18~40	0	100
40~42	0→100	100→0
42~48	100	0

2.2 溶液的制备

2.2.1 盐酸-甲醇溶液 取100 ml 甲醇,置于150 ml 量瓶中,加盐酸1 ml,混匀,制成盐酸-甲醇溶液(1:100, V/V),备用。

2.2.2 混合对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱15.48 mg、盐酸黄柏碱8.88 mg 和木兰花碱9.60 mg,分别置于5 ml 量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,作为单一对照品贮备液。精密移取上述单一对照品贮备液各适量,制成每1 ml 中含盐酸小檗碱1.548 0 mg、盐酸黄柏碱0.177 6 mg 和木兰花碱0.192 0 mg 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取样品粉末(过4号筛)0.5 g,精密称定,置于100 ml 锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇溶液40 ml,称定质量,超声处理30 min,冷却后再次称定质量,用盐酸-甲醇溶液补足减失的质量,滤过,取续滤液经0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 取甲醇溶液10 ml 作为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,各待测成分均能达到基线分离,分离度>1.5,各成分的理论板数均>4 000。结果表明,其他成分对测定无干扰。色谱见图1。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液0.25、0.5、1.0、2.0、2.5 ml,分别置于10 ml 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。分别吸取上述系列混合对照品溶液适量,按

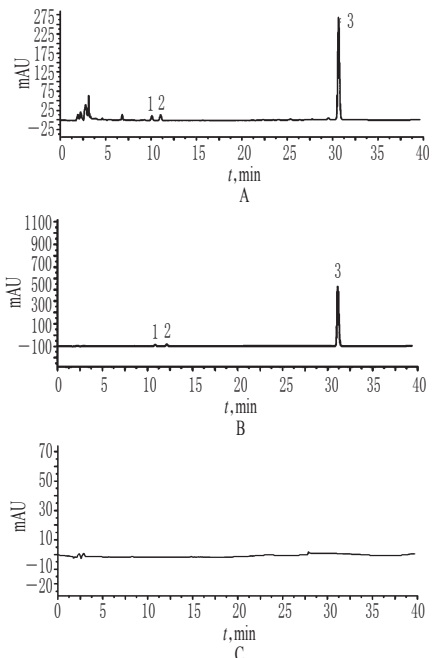


图1 高效液相色谱图

A. 供试品; B. 混合对照品; C. 阴性对照; 1. 木兰花碱; 2. 盐酸黄柏碱; 3. 盐酸小檗碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test sample; B. mixed reference substance; C. negative control; 1. berberine; 2. phellodendrine; 3. berberine hydrochloride

“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、进样量(x, μg)为横坐标进行线性回归,得盐酸小檗碱的回归方程为 $y=1\ 286\ 902.08x+61\ 961.92$ ($r=0.999\ 9$)、盐酸黄柏碱的回归方程为 $y=796\ 690x+953.81$ ($r=0.999\ 8$)、木兰花碱的回归方程为 $y=630\ 136x+728.73$ ($r=0.999\ 9$)。结果,盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱的检测进样量线性范围分别为0.387 0~7.740、0.044 4~0.888 0、0.048 0~0.960 0 μg。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱的检测限分别为0.75、1.43、1.21 mg/ml;当信噪比为10:1时,得盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱的定量限分别为2.40、5.01、3.63 mg/ml。

2.6 精密度的试验

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液5 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱峰面积的RSD分别为0.81%、2.22%、0.98%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号:20120402)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱峰面积的RSD分别为1.31%、1.69%、1.78%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20120402)粉末(过4号筛)0.5 g,共6份,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱峰面积的RSD分别为0.83%、0.95%、1.11%

($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品粉末(批号:20130417)约0.5 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,共6份,加盐酸-甲醇溶液40 ml,称定质量,超声处理30 min,冷却后用盐酸-甲醇溶液补足减失的质量,滤过,取续滤液再次称定质量,取2 ml置于10 ml量瓶中,分别加入盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱的单一对照品贮备液各0.5 ml,加“2.2.1”项下盐酸-甲醇溶液定容,再次超声处理30 min,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 3 Results of recovery test($n=6$)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
盐酸小檗碱	1.283 1	1.548 0	2.763 1	95.61	100.15	2.80
	1.283 3	1.548 0	2.881 2	103.22		
	1.284 4	1.548 0	2.872 1	102.57		
	1.282 6	1.548 0	2.841 4	100.70		
	1.283 1	1.548 0	2.806 7	98.43		
	1.283 8	1.548 0	2.838 0	100.40		
盐酸黄柏碱	0.116 4	0.088 8	0.207 6	102.80	100.37	1.84
	0.116 4	0.088 8	0.202 8	97.27		
	0.116 5	0.088 8	0.206 8	101.74		
	0.116 3	0.088 8	0.207 5	102.65		
	0.116 4	0.088 8	0.206 5	101.56		
	0.116 4	0.088 8	0.201 8	96.18		
木兰花碱	0.101 4	0.096 0	0.196 9	99.42	100.52	1.84
	0.101 4	0.096 0	0.197 0	99.51		
	0.101 5	0.096 0	0.1955	97.93		
	0.101 4	0.096 0	0.199 2	101.93		
	0.101 4	0.096 0	0.198 9	101.56		
	0.101 5	0.096 0	0.200 1	102.78		

2.10 样品含量测定

取各批样品适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算3种成分的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$,%)

Tab 4 Determination results of content determination of samples($n=3$,%)

等级	样品批号	盐酸小檗碱	盐酸黄柏碱	木兰花碱
一级黄柏饮片	20120402	6.480 3	0.624 5	0.151 6
	20120415	8.730 9	0.744 0	0.421 8
	20120518	8.059 3	0.709 4	0.407 4
	20130507	6.715 9	0.641 7	0.224 7
	20130524	6.462 1	0.613 8	0.112 8
	20130529	6.693 4	0.635 5	0.431 5
二级黄柏饮片	20130603	6.573 2	0.704 1	0.327 6
	20120324	5.234 9	0.527 1	0.252 1
	20120412	4.703 8	0.486 5	0.304 4
	20120524	3.705 7	0.383 6	0.591 4
	20120604	5.270 3	0.541 9	0.405 0
	20130229	4.412 4	0.406 4	0.258 8
	20130311	4.711 5	0.493 4	0.308 5
	20130417	5.123 3	0.464 3	0.404 7

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者曾选择230、245、280、345 nm作为本试验的检测波长。结果,345 nm波长下盐酸黄柏碱和木兰花碱无吸收;230、

245、280 nm波长处各色谱峰都有吸收,但3种成分在280 nm处吸收相对较高。因此,本试验最终选择280 nm作为本试验的检测波长。

3.2 对含量测定结果的分析

本试验中一级饮片盐酸小檗碱含量 $>5.5\%$,盐酸黄柏碱含量 $>0.55\%$,且均高于二级饮片含量($P<0.05$),但两种等级饮片中木兰花碱含量无显著性差异($P>0.05$)。含量测定结果表明,一级黄柏饮片和二级黄柏饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱的含量均符合2015年版《中国药典》(一部)(盐酸小檗碱不得少于3.0%,盐酸黄柏碱不得少于0.34%)的要求。

3.3 饮片分级

笔者通过对不同产地、不同药材市场以及不同生产企业的饮片等级规格情况进行调查,结果显示黄柏饮片分级主要参照厚度与颜色两个外观指标,分为一级和二级两个等级。本试验对两个等级饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱同时进行了含量测定,并将盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱含量值与传统分级方法相结合,这为黄柏饮片分级的内在控制指标的确定提供了一定的依据,使样品在划分等级时更加科学合理;这也为传统分级方法与现代科学技术综合运用于中药饮片质量评价,为药材购买者简便快速地选择优质优价的中药饮片提供了新思路。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,适用于测定黄柏饮片中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱和木兰花碱的含量;一级饮片中盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱的含量高于二级饮片,但两个等级饮片中木兰花碱的含量无显著性差异。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:305.
- [2] 肖永庆,张村,李丽.中药饮片的分级规格质量评价及优质优价管理[J].中华中医药杂志,2011,26(2):317.
- [3] 杨光,曾燕,郭兰萍,等.中药材商品规格等级标准研究现状及几个关键问题的商榷[J].中国中药杂志,2014,39(9):1733.
- [4] 邓寒霜,王新军.丹参药材分级标准验证实验[J].药学进展,2006,30(1):35.
- [5] 楚笑辉,王伽伯,孔维军,等.基于Delphi法的黄连药材商品规格感官评价的重现性研究[J].世界科学技术,2011,13(2):321.
- [6] 刘山,厚朴饮片级别与重金属及农药残留指标的关系研究[D].武汉:湖北中医药大学,2013.
- [7] 辛宁,罗翠娥,莫燕.不同等级当归的阿魏酸含量比较[J].中药材,2001,24(4):244.
- [8] 康传志,周涛,郭兰萍,等.太子参商品规格等级标准研究[J].中国中药杂志,2014,39(15):2872.
- [9] 国家医药管理局,卫生部.七十六种药材商品规格标准[S].1984.
- [10] 高源,胡昌江,吴珊珊,等.基于HPLC指纹图谱及多指标成分对黄柏饮片的等级研究[J].中成药,2012,34(12):2395.
- [11] 高源.黄柏及饮片分级规格质量评价研究[D].成都:成都中医药大学,2013.

(收稿日期:2015-05-29 修回日期:2016-03-10)

(编辑:刘柳)