

HPLC法同时测定云连药材中6种生物碱的含量[△]

潘正^{1*},高运玲²,江生³,范刚⁴,张艺⁴,曹伟国¹(1.重庆医科大学中医药学院,重庆 400016;2.重庆邮电大学生物学院,重庆 400065;3.重庆市食品药品检验所,重庆 401121;4.成都中医药大学民族药学院,成都 611130)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3408-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.28

摘要 目的:建立同时测定云连药材中6种生物碱含量的方法。方法:色谱柱为XtimateTM C₁₈,流动相为30 mmol/L碳酸氢铵溶液(含0.1%三乙胺和0.7%氨水)-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的检测质量浓度线性范围分别为0.85~16.96 mg/L($r=0.999\ 9$)、1.25~24.96 mg/L($r=0.999\ 8$)、2.05~40.96 mg/L($r=0.999\ 9$)、3.65~72.96 mg/L($r=0.999\ 9$)、2.88~57.60 mg/L($r=0.999\ 9$)、13.25~264.96 mg/L($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为97.14%~102.14%(RSD=1.93%, $n=6$)、97.00%~102.00%(RSD=2.06%, $n=6$)、98.18%~101.82%(RSD=1.79%, $n=6$)、96.15%~101.28%(RSD=2.06%, $n=6$)、96.88%~101.88%(RSD=1.87%, $n=6$)、99.31%~103.76%(RSD=1.89%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于云连药材中6种生物碱含量的同时测定。

关键词 云连;生物碱;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of 6 Alkaloids in *Coptis teeta* by HPLC

PAN Zheng¹, GAO Yunling², JIANG Sheng³, FAN Gang⁴, ZHANG Yi⁴, CAO Weiguo¹(1.College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2.College of Biology, Chongqing University of Posts and Telecommunication, Chongqing 400065, China; 3.Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 4.College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611130, China)

参考文献

- [1] 肖飞,赵厚睿,向希雄,等.小儿化毒散临床应用探讨[J].世界中医药,2015,10(11):1806-2807.
- [2] 丁冬胜,邹敏书,聂国明.小儿化毒散治疗小儿急性化脓性扁桃体炎临床疗效观察[J].华南国防医学杂志,2015,29(1):66-67.
- [3] 赵浩堂,张漩,陈庆梅,等.小儿化毒散治疗小儿口腔溃疡78例的疗效观察[J].世界中医药,2016,11(4):653-654.
- [4] 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,2015:1495-1498.
- [5] Yang N, Cui H, Zhang L. *et al.* Paeoniflorin inhibits human pancreatic cancer cell apoptosis via suppression of MMP-9 and ERK signaling[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(2): 1471-1476.
- [6] 李冬梅,徐丽,张红果,等.芍药苷对脑缺血再灌注模型沙土鼠脑组织炎症反应因子的影响[J].中国药房,2015,26(1):916-917.
- [7] Choi YH. Berberine hydrochloride protects C2C12 myoblast cells against oxidative stress-induced damage via induction of nrf-2-mediated ho-1 expression[J]. *Drug Dev Res*, 2016, 77(6):56-58.
- [8] Li HL, Wu H, Wu XJ. *et al.* MAPK pathways are involved in the inhibitory effect of berberine hydrochloride on gastric cancer MGC 803 cell proliferation and IL-8 secretion in vitro and in vivo[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1430-1438.
- [9] 赵慧,吕佳,周艺璇,等.甘草酸铵对乙酰氨基酚致人肝细胞损伤的保护作用研究[J].中南药学,2017,15(3):301-304.
- [10] 孟雅坤,王伽伯,肖小河,等.甘草酸铵联合苦参素抗大鼠肝纤维化作用及初步机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(21):110-115.
- [11] 黄继英,韩冰,张顺财,等.甘草酸铵通过抑制HMGB1的表达减轻ConA诱导的免疫性肝损伤[J].胃肠病学和肝病杂志,2012,21(3):264-267.
- [12] 孙新建,李志浩,吴进,等.RP-HPLC测定小儿化毒散中大黄素和大黄酚的含量[J].中医药导报,2010,16(10):93-95.
- [13] 黄泽中,何利华,尹雄章,等.小儿化毒散中芍药苷含量测定[J].医药导报,2012,33(7):916-917.

(收稿日期:2017-02-28 修回日期:2017-04-28)

(编辑:刘柳)

[△] 基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(No.cstc2014jcyj A10004);重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ1400433);重庆市卫生计生委中医药科技项目(No.ZY201602066)

* 副教授,博士。研究方向:中药化学成分分析。电话:023-65712062。E-mail:letter2013@sina.com

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of 6 alkaloids in *Coptis teeta*. METHODS: The determination was performed on Xtimate™ C₁₈ with mobile phase consisted of 30 mmol/L ammonium bicarbonate [containing 0.1% triethylamine and 0.7% ammonia-acetonitrile (gradient elution)] at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 270 nm, the column temperature was 30 °C, and the sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of jateorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride were 0.85-16.96 mg/L ($r=0.999\ 9$), 1.25-24.96 mg/L ($r=0.999\ 8$), 2.05-40.96 mg/L ($r=0.999\ 9$), 3.65-72.96 mg/L ($r=0.999\ 9$), 2.88-57.60 mg/L ($r=0.999\ 9$) and 13.25-264.96 mg/L ($r=0.999\ 9$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.0%. Recoveries were 97.14%-102.14% (RSD=1.93%, $n=6$), 97.00%-102.00% (RSD=2.06%, $n=6$), 98.18%-101.82% (RSD=1.79%, $n=6$), 96.15%-101.28% (RSD=2.06%, $n=6$), 96.88%-101.88% (RSD=1.87%, $n=6$), 99.31%-103.76% (RSD=1.89%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, stability and reproducible, and can be used for simultaneous determination of 6 alkaloids in *Coptis teeta*.

KEYWORDS *Coptis teeta*; Alkaloids; Content determination; HPLC

黄连是中医临床常用药物,始载于《神农本草经》,药用历史悠久。黄连味苦,性寒,归心、肝、胃、胆、大肠经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,临床上常用于治疗湿热痞满、呕吐、心火亢盛、黄疸、消渴、牙痛、痈肿疔疮等症^[1]。现代药理研究表明,黄连具有抗病原微生物、抗炎、抗癌、抗溃疡、降血糖、解热和保肝等作用^[2]。2015年版《中国药典》(一部)记载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,药材依次习称为“味连”“雅连”和“云连”。

有文献检测了不同产地和品种黄连药材中的总生物碱,发现云连中的总生物碱高于味连和雅连^[3];有研究检测了不同产地和品种黄连中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和药根碱的含量,却发现云连中上述3种生物碱含量低于味连,由于该研究收集云连样品均未超过3批,样品量较少^[4];同时,云连中除了上述3种生物碱外,黄连碱、表小檗碱和非洲防己碱也是其主要成分。鉴于上述原因,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了8批云连药材中上述6种生物碱的含量,以期为云连药材的质量控制与评价及其临床合理利用提供一定借鉴。

1 材料

1.1 仪器

1200型 HPLC 仪,包括 DAD 检测器(美国 Agilent 公司);CPX8800H-C 型超声波清洗器(上海必能信有限公司);BP121S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品(批号分别为 110713-200609、110732-200506)均购自中国食品药品检定研究院;黄连碱、非洲防己碱、表小檗碱、药根碱对照

品(批号分别为 20100501、20100502、20100701、20110406)均由重庆市中药研究院提供,以上对照品纯度均>98%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

笔者共收集云连药材 8 批(见表 1),经重庆医科大学中医药学院王刚副教授鉴定为真品。

表 1 云连药材来源

Tab 1 Source of *C. teeta*

No.	来源	No.	来源
1	云南福贡县	5	云南昆明菊花园药材市场
2	云南大理三月街药材市场	6	云南福贡县鹿马登乡
3	云南中甸县	7	云南福贡县匹河乡
4	云南昆明旺达药材经营部	8	云南福贡县上帕镇

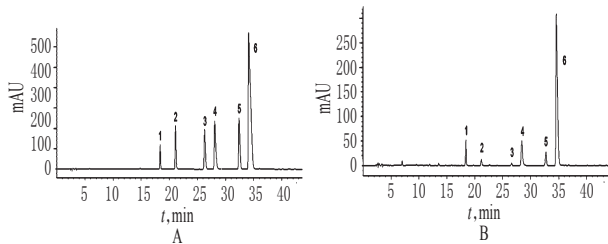
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Xtimate™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 30 mmol/L 碳酸氢铵溶液(A, 含 0.1% 三乙胺和 0.7% 氨水)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~15 min, 10%→25% B; 15~25 min, 25%→30% B; 25~40 min, 30%→45% B); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰计>3 000; 各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取待测成分对照品适量,加盐酸-甲醇(1:100, V/V)制成药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱质量浓度分别为 16.96、24.96、40.96、72.96、57.60、264.96 mg/L 的混合对照品溶液。



A.混合对照品;B.供试品;1.药根碱;2.非洲防己碱;3.表小檗碱;4.黄连碱;5.盐酸巴马汀;6.盐酸小檗碱

A. mixed control; B. test sample; 1. jateorrhizine; 2. columbamine; 3. epiberberine; 4. coptisine; 5. palmatine hydrochloride; 6. berberine hydrochloride

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末约0.1 g,精密称定,置于100 mL具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100, V/V)50 mL,密塞,称定质量,超声(功率:240 W,频率:45 kHz,下同)处理30 min,取出,放冷,再次称定质量,用盐酸-甲醇(1:100, V/V)补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1、2、5、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加盐酸-甲醇(1:100, V/V)定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, mg/L)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, mg/L
药根碱	$y=28.543 1x-0.504 3$	0.999 9	0.85~16.96
非洲防己碱	$y=43.513 0x-16.725 0$	0.999 8	1.25~24.96
表小檗碱	$y=33.897 0x-6.646 2$	0.999 9	2.05~40.96
黄连碱	$y=32.994 9x-10.562 1$	0.999 9	3.65~72.96
盐酸巴马汀	$y=36.466 5x-1.725 1$	0.999 9	2.88~57.60
盐酸小檗碱	$y=35.508 8x-7.979 1$	0.999 9	13.25~264.96

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为1.52%、1.31%、1.47%、1.75%、1.63%、1.97%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(No.5)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,药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为1.64%、1.22%、2.04%、1.46%、0.88%、1.74%(n=6),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(No.5)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为1.36%、1.72%、0.93%、2.16%、2.33%、1.61%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量样品(No.5)适量,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.2”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 tests(n=6)

待测成分	取样量, g	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, %
药根碱	0.051 0	0.421	0.420	0.834	98.33	99.80	1.93
	0.050 8	0.434	0.420	0.851	99.29		
	0.050 6	0.427	0.420	0.856	102.14		
	0.051 1	0.413	0.420	0.821	97.14		
	0.051 2	0.415	0.420	0.836	100.24		
	0.050 6	0.425	0.420	0.852	101.67		
非洲防己碱	0.051 0	0.098	0.100	0.197	99.00	99.17	2.06
	0.050 8	0.104	0.100	0.205	101.00		
	0.050 6	0.108	0.100	0.205	97.00		
	0.051 1	0.094	0.100	0.196	102.00		
	0.051 2	0.098	0.100	0.195	97.00		
	0.050 6	0.103	0.100	0.202	99.00		
表小檗碱	0.051 0	0.058	0.055	0.112	98.18	99.70	1.79
	0.050 8	0.061	0.055	0.115	98.18		
	0.050 6	0.055	0.055	0.111	101.82		
	0.051 1	0.053	0.055	0.108	100.00		
	0.051 2	0.058	0.055	0.114	101.82		
	0.050 6	0.060	0.055	0.114	98.18		
黄连碱	0.051 0	0.806	0.780	1.556	96.15	98.93	2.06
	0.050 8	0.766	0.780	1.548	100.26		
	0.050 6	0.782	0.780	1.572	101.28		
	0.051 1	0.823	0.780	1.583	97.44		
	0.051 2	0.812	0.780	1.576	97.95		
	0.050 6	0.778	0.780	1.562	100.51		
盐酸巴马汀	0.051 0	0.341	0.320	0.667	101.88	98.70	1.87
	0.050 8	0.309	0.320	0.622	97.81		
	0.050 6	0.338	0.320	0.648	96.88		
	0.051 1	0.342	0.320	0.659	99.06		
	0.051 2	0.326	0.320	0.637	97.19		
	0.050 6	0.341	0.320	0.659	99.38		

续表3
Continued tab 3

待测成分	取样量, g	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	0.051 0	4.742	4.500	9.267	100.56	101.19	1.89
	0.050 8	4.466	4.500	8.982	100.36		
	0.050 6	4.558	4.500	9.212	103.42		
	0.051 1	4.740	4.500	9.209	99.31		
	0.051 2	4.649	4.500	9.137	99.73		
	0.050 6	4.552	4.500	9.221	103.76		

2.8 药材样品含量测定

取8批样品各适量,分别按“2.2.2”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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4(表中“-”为含量<0.01%而未检出)。

表4 药材样品含量测定结果($n=3$, %)

Tab 4 Result of contents determination of samples ($n=3$, %)

No.	药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱
1	6.49	1.98	-	13.81	10.12	74.13
2	7.75	1.77	0.90	13.57	5.44	84.80
3	7.72	1.53	0.66	18.10	5.33	85.58
4	6.44	1.18	-	12.90	4.08	74.67
5	8.43	1.97	1.11	15.60	6.32	91.16
6	7.89	1.46	0.87	14.26	5.14	86.34
7	7.51	1.74	0.36	15.09	4.60	79.12
8	7.23	1.57	-	12.18	4.93	79.14
平均值	7.43	1.65	0.78	14.44	5.75	81.87

3 讨论

笔者参考有关文献^[4-6],考察了50 mmol/L磷酸二氢钾-甲醇、50 mmol/L磷酸二氢钾(加入不同浓度的十二烷基磺酸钠)-乙腈溶液、0.1%三氟乙酸-乙腈、30 mmol/L碳酸氢铵溶液-乙腈等流动相体系,结果表明,30 mmol/L碳酸氢铵溶液-乙腈能较好地分离6种生物碱,并在水相中加入一定浓度的三乙胺和氨水调pH后,能明显改善色谱峰的对称性。因此,最终确定最佳的流动相为30 mmol/L碳酸氢铵溶液(含0.1%三乙胺和

0.7%氨水)-乙腈,进行梯度洗脱。此外,在供试品溶液的制备中,本研究对提取方法(超声、回流)、提取溶剂(甲醇、乙醇、盐酸-甲醇、盐酸-乙醇)、提取时间(30、40、50 min)及提取溶剂用量(40、50、60 mL)等因素进行了考察,最终发现以盐酸-甲醇(1:100, V/V)50 mL超声提取30 min的提取效果最佳。

笔者同时测定云连药材中6种生物碱,结果云连药材中6种生物碱的平均含量高低依次为:盐酸小檗碱>黄连碱>药根碱>盐酸巴马汀>非洲防己碱>表小檗碱。本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于云连药材中6种生物碱含量的同时测定。

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,2015:303-305.
- [2] Tang J, Feng YB, Tsao S, et al. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(1):5-17.
- [3] 张德伟,封海霞,熊学庆,等.不同商品来源云南黄连中重金属含量的测定与评价[J]. *中国药业*, 2016, 25(4):79-81.
- [4] 晁若冰,张浩,庄燕黎,等.高效液相色谱法测定黄连药材中小檗碱型生物碱的含量[J]. *药物分析杂志*, 2003, 23(5):354-357.
- [5] 赖先荣,周邦华,杜明胜,等.6种黄连饮片中6种生物碱的RP-HPLC含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析[J]. *中国中药杂志*, 2016, 40(24):4579-4586.
- [6] 阳勇,李铁,朱晶晶,等.HPLC法测定黄连药材及其炮制品中主要生物碱的含量[J]. *中成药*, 2010, 32(9):1540-1544.

(收稿日期:2016-12-05 修回日期:2017-01-14)

(编辑:张静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅