

HPLC法同时测定不同配伍比例黄连-吴茱萸药对中4种有效成分的含量

周素芹^{1*},李洪兵^{2#}(1.涟水县人民医院,江苏 淮安 223400;2.淮安市中医院,江苏 淮安 223001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3430-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.34

摘要 目的:建立同时测定黄连-吴茱萸药对中4种有效成分含量的方法,探讨该药对的合理比例。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welch XB C₁₈,流动相为乙腈-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(磷酸调pH至5.0)(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为265 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱检测质量浓度线性范围分别为2.24~44.80 μg/mL($r=0.999\ 9$)、1.26~31.50 μg/mL($r=0.999\ 8$)、2.70~81.00 μg/mL($r=0.999\ 8$)、1.65~49.50 μg/mL($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为98.11%~100.73%(RSD=1.04%, $n=6$)、96.54%~103.47%(RSD=1.86%, $n=6$)、95.49%~102.36%(RSD=2.05%, $n=6$)、97.19%~103.24%(RSD=2.19%, $n=6$)。当黄连-吴茱萸比例(m/m)为2:1时,各成分综合含量最高。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于不同配伍比例黄连-吴茱萸药对中4种有效成分含量的同时测定;该药对中黄连-吴茱萸比例(m/m)为2:1较合理。

关键词 黄连;吴茱萸;药对;高效液相色谱法;盐酸小檗碱;盐酸巴马汀;吴茱萸碱;吴茱萸次碱;含量测定

Simultaneous Determination of 4 Effective Components in Different Compatibility Proportions of the Couple of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus by HPLC
ZHOU Suqin¹, LI Hongbing²(1.Lianshui County People's Hospital, Jiangsu Huai'an 223400, China; 2.Huai'an Hospital of TCM, Jiangsu Huai'an 223001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 4 effective components in the couple of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus, and to investigate rational proportion of the couple. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Welch XB C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-1.5 mmol/L sodium dodecyl sulfate solution (pH adjusted to 5.0 with phosphoric acid) (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 265 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of berberine hydrochloride, martin hydrochloride, evodiamine and rutacarpine were 2.24-44.80 μg/mL($r=0.999\ 9$), 1.26-31.50 μg/mL($r=0.999\ 8$), 2.70-81.00 μg/mL($r=0.999\ 8$), 1.65-49.50 μg/mL($r=0.999\ 9$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.0%. The recoveries were 98.11%-100.73%(RSD=1.04%, $n=6$), 96.54%-103.47%(RSD=1.86%, $n=6$), 95.49%-102.36%(RSD=2.05%, $n=6$), 97.19%-103.24%(RSD=2.19%, $n=6$), respectively. When the proportion of Coptidis Rhizoma-Evodiae Fructus(m/m) was 2:1, the comprehensive content of each component was the highest. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of 4 effective components in different compatibility proportions of the couple of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus. The rational proportion of the couple of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus is 2:1.

KEYWORDS Coptidis Rhizoma; Evodiae Fructus; Couple; HPLC; Berberine hydrochloride; Martin hydrochloride; Evodia alkaloid; Rutacarpine; Content determination

药对,是中医临床常用的相对固定药味的配伍组合,是中药配伍应用中的基本形式。黄连-吴茱萸药对是寒热配伍的经典药对,在消化系统疾病的治疗中广泛应用^[1]。黄连具有清热燥湿、泻火解毒之功效,其主要有效成分为盐酸小檗碱、盐酸巴马汀。有文献表明,盐酸巴马汀具有抗菌作用^[2],盐酸小檗碱具有抗菌、抗病毒

作用^[3-4]。吴茱萸具有抗炎、加快肝脏代谢等作用,其有效成分为吴茱萸碱、吴茱萸次碱^[5-8]。因此,检测盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量对黄连-吴茱萸药对的质量评价具有重要意义。本试验拟采用高效液相色谱法(HPLC)同时检测上述4种成分的含量,以达到对黄连-吴茱萸药对进行质量控制的目的。

1 材料

1.1 仪器

600E型HPLC仪,包括Waters 600E多溶剂输送系统、Waters在线脱气机、Rheodyne 7725i手动进样阀、

* 副主任药师。研究方向:临床药学、临床中药学。电话:0517-82318687。E-mail:327887017@qq.com
通信作者:副主任中药师。研究方向:中药炮制、检定、制剂。电话:0517-80876010。E-mail:1132962315@qq.com

Waters 2487 型双通道紫外检测器、Millennium32 色谱工作站(美国 Waters 公司);SK3200LHC 型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司);Mettler AG285 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201211)、盐酸巴马汀对照品(批号:110732-20150423)、吴茱萸碱对照品(批号:110802-20141109)、吴茱萸次碱对照品(批号:110802-201306)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;甲醇、乙醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

黄连、吴茱萸药材由江苏涟水县人民医院中药房提供,经江苏淮安市中医院李洪兵副主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

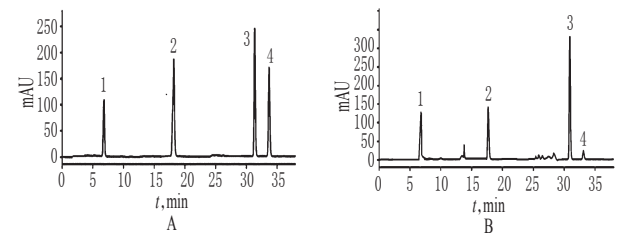
2.1 色谱条件与系统适用性考察

色谱柱:Welch XB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙睛(A)-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(磷酸调 pH 至 5.0,B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:1.0 mL/min;检测波长:265 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰计均≥3 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间,min	A, %	B, %
0~5	25	75
5~10	25→45	75→55
10~16	45→65	55→35
16~24	65	35



A.混合对照品;B.供试品[黄连-吴茱萸(2:1,m/m)];1.盐酸巴马汀;2.盐酸小檗碱;3.吴茱萸碱;4.吴茱萸次碱
A. mixed control; B. test sample [Coptidis Rhizoma-Evodiae Fructus (2:1, m/m)]; 1.martin hydrochloride; 2. berberine hydrochloride; 3. evodi-amine; 4. rutacarpine

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

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各适量,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量浓度分别为 0.224、0.126、0.270、0.165 mg/mL 的单一对照

品溶液。取上述单一对照品溶液各适量,加甲醇适量,制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 分别按黄连-吴茱萸比例(m/m)为 1:1、2:1、1:2 取黄连、吴茱萸共 200 g,用水饱和度正丁醇溶解提取 2 次,合并提取液,置于 100 mL 量瓶中,加正丁醇定容,摇匀;精密量取 50 mL,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,滤过,滤液经 0.22 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”项下单一对照品溶液适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0、2.24、11.20、56.00、112.00 μg/mL 的系列盐酸小檗碱对照品溶液,质量浓度分别为 0、1.26、6.30、31.50、94.50 μg/mL 的系列盐酸巴马汀对照品溶液,质量浓度分别为 0、2.70、13.50、67.50、202.50 μg/mL 的系列吴茱萸碱对照品溶液,质量浓度分别为 0、1.65、8.25、24.75、49.50 μg/ml 的系列吴茱萸次碱对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 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, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表 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, μg/mL
盐酸小檗碱	y=1 847x+ 175	0.999 9	2.24~44.80
盐酸巴马汀	y=965x-42.8	0.999 8	1.26~31.50
吴茱萸碱	y=1 097x-202.9	0.999 8	2.70~81.00
吴茱萸次碱	y=1 053x-327	0.999 9	1.65~49.50

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,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 0.68%、1.06%、2.06%、1.57%(n=6),表明仪器精密密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液[黄连-吴茱萸比例(m/m)为 2:1]适量,分别于室温下放置 0、2、4、12、24、36、48 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、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 2.04%、1.83%、1.97%、1.51%(n=7),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[黄连-吴茱萸比例(m/m)为 2:1]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,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 0.98%、1.29%、1.86%、2.34%(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[黄连-吴茱萸比例(m/m)为 2:1]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	样品含量, μg	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	602.1	398	999.34	99.81	99.53	1.04
	602.1	398	992.57	98.11		
	602.1	398	998.93	99.71		
	602.1	398	1003.41	100.73		
	602.1	398	995.07	98.74		
	602.1	398	1000.62	100.13		
盐酸巴马汀	200.1	207	404.31	98.65	101.21	1.86
	200.1	207	405.17	99.07		
	200.1	207	409.96	101.38		
	200.1	207	411.51	102.13		
	200.1	207	995.07	96.54		
	200.1	207	414.29	103.47		
吴茱萸碱	20.1	22.5	43.13	102.36	101.21	2.05
	20.1	22.5	42.57	99.87		
	20.1	22.5	42.04	97.52		
	20.1	22.5	41.58	95.49		
	20.1	22.5	42.24	98.41		
	20.1	22.5	42.83	101.03		
吴茱萸次碱	16.3	18.2	34.21	98.41	99.72	2.19
	16.3	18.2	33.99	97.19		
	16.3	18.2	35.08	103.24		
	16.3	18.2	34.35	99.16		
	16.3	18.2	34.24	98.60		
	16.3	18.2	34.81	101.74		

2.8 样品含量测定

取药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法,分别以黄连-吴茱萸比例(*m/m*)为1:1、2:1、1:2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4 样品含量测定结果(*n*=6,mg/g)

Tab 4 Results of contents determination of samples
(*n*=6,mg/g)

黄连:吴茱萸	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
1:1	103.75	38.63	4.39	3.84
2:1	120.26	40.37	4.86	3.15
1:2	86.48	36.36	5.26	5.02

由表4可知,当黄连-吴茱萸比例(*m/m*)为2:1时,各成分综合含量最高。

3 讨论

笔者考察了不同色谱柱[Welch XB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent XDB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)]的分离效果,结果采用Welch XB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱时4种成分峰形与分离效果较好,因此选择上述色谱柱为本试验的色谱柱。

笔者参考已有文献^[9-10],考察了乙腈-1.5 mmol/L 十

二烷基硫酸钠溶液(磷酸调pH至5.0)、乙腈-1.0 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(磷酸调pH至5.0),并进行不同溶液的流动相比组合试验。结果,以乙腈-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(磷酸调pH至5.0)为流动相,梯度洗脱4种成分的峰形分离效果最佳,且4种成分均在35 min内出峰完全。

笔者还考察了不同流速(0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min),不同柱温(25、30、35 ℃)条件对测定结果的影响。结果,流速为1.0 mL/min、柱温为30 ℃时,4种成分色谱峰可更好分离,同时可大大节约溶剂用量。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于不同配伍比例黄连-吴茱萸药对中4种有效成分含量的同时测定。

参考文献

[1] 杨宏博,肖小河,赵艳玲,等.黄连-吴茱萸药对的研究进展[J].中国药房,2010,21(15):1432-1434.

[2] 王玲,吕雪莲,孙另,等.黄连等六味中药提取物对皮肤癣菌的抗真菌活性研究[J].中国皮肤性病学杂志,2008,22(8) 498-500.

[3] 杨勇,张保顺,曹春芽,等.小檗碱的心血管药理活性[J].中成药,2011,33(5):867-869.

[4] 陈广,陆付耳,王增四,等.小檗碱改善2型糖尿病大鼠胰岛胰岛素抵抗与P1.3K、GLUT4蛋白相关性的研究[J].中国药理学通报,2008,24(8):1007-1009.

[5] Bao MH, Dai W, Li YJ, *et al.* Rutaecarpine prevents hypoxia-reoxygenation-induced myocardial cell apoptosis via inhibition of NADPH oxidases[J].*Can J Physiol Pharmacol*,2011,89(3):177-186.

[6] Zhou Z, Hu CP, Wang CJ, *et al.* Calcitonin gene-related peptide inhibits angiotensin II-induced endothelial progenitor cells senescence through up-regulation of klotho expression[J].*Atherosclerosis*,2010, 213(1):92-101.

[7] Ko HC, Wang YH, Liou KT, *et al.* Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells[J].*Eur J Pharmacol*, 2007, 555 (2-3) : 211-217.

[8] Noh K, Seo YM, Lee SK, *et al.* Effects of rutaecarpine on the metabolism and urinary excretion of caffeine in rats [J].*Arch Pharm Res*,2011, 34(1): 119-125.

[9] 纪丽莎,张先福,喻卫武,等.HPLC法测定黄连复方汤中盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀和甘草酸[J].中草药,2011,42(2)285-287.

[10] 潘超,张莉,王玉.HPLC法同时测定二妙丸中黄柏碱、木兰花碱、药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J].中国生化药物杂志,2012,33(4):361-363.

(收稿日期:2016-12-20 修回日期:2017-05-04)

(编辑:张 静)