

HPLC法同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的含量

李红玲^{1*}, 莫炫永²(1. 东莞东华医院, 广东 东莞 523000; 2. 东莞市国药质量检测中心, 广东 东莞 523010)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2562-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.22

摘要 目的: 建立同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters XTERRA® MS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(每 100 ml 中加 0.1 g 十二烷基磺酸钠, 梯度洗脱), 检测波长为 284 nm(盐酸黄柏碱)和 265 nm(盐酸小檗碱), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃。结果: 盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的质量浓度分别在 9.45~236.15、74.77~1 869.25 mg/L 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为 0.999 1、0.999 8); 二者精密程度、稳定性、重复性试验的 RSD≤1.55%; 平均加样回收率分别为 97.47%~98.24%、95.03%~95.63%, RSD 分别为 0.39%~0.93%、0.42%~0.93% (n 均为 3)。结论: 该方法简便、快速、专属性强, 可有效评价川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的质量。
关键词 川黄柏; 盐酸黄柏碱; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Berberine Hydrochloride and Hydrochloride Phellodendrine in *Phellodendron chinense* by HPLC

LI Hong-ling¹, MO Xuan-yong²(1. Dongguan Tungwah Hospital, Guangdong Dongguan 523000, China; 2. Dongguan Guoyao Quality Inspection Center, Guangdong Dongguan 523010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of phellodendrine hydrochloride and berberine hydrochloride in *Phellodendron chinense*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters XTERRA®MS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (adding 0.1 g sodium dodecyl sulfate per 100 ml, gradient elution) as mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 284 nm for phellodendrine hydrochloride and 265 nm for berberine hydrochloride. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of phellodendrine hydrochloride were 9.45-236.15 mg/L ($r=0.999 1$) and that of berberine hydrochloride were 74.77-1 869.25 mg/L ($r=0.999 8$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.55%. The average recoveries were 97.47%-98.24% (RSD were 0.39%-0.93%, $n=3$) and 95.03%-95.63% (RSD were 0.42%-0.93%, $n=3$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and specific, and can effectively control the quality of berberine hydrochloride and phellodendrine hydrochloride in *P. chinense*.

KEYWORDS *Phellodendron chinense*; Hydrochloride phellodendrine; Berberine hydrochloride; HPLC; Content determination

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 或黄檗 *P. amurense* Rupr. 的干燥树皮, 前者习称“川黄柏”, 后者习称“关黄柏”。黄柏为临床常用中药材之一, 主要含小檗碱、巴马汀、药根碱、木兰花碱、黄柏碱等季铵型生物碱, 具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之功效。2005 年版《中国药典》开始将黄柏(即川黄柏)和关黄柏区分开来^[1], 其主要含量检测指标均为盐酸小檗碱, 但因为许多中药材中都含有盐酸小檗碱, 故该方法不具有专属性。2010 年版《中国药典》在黄柏(即川黄柏)项下增加了盐酸黄柏碱的检测^[2], 提高了该药材的专属性。黄柏碱和小檗碱均为黄柏中抗菌的有效成分, 其中黄柏碱有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的作用。小檗碱对痢疾杆菌、大肠杆菌、肺炎双球菌、金葡菌、链球菌、伤寒杆菌及阿米巴原虫有抑制作用, 临床主要用于治疗肠道感染及菌痢等; 近来还发现小檗碱有抗心律失常的作用, 它有较强的体内外抗肿瘤活性并能诱导 B16 细胞分化; 同盐酸阿糖胞苷在体外具有协同作用^[3]。2010 年版《中国药典》中盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱两个成分是分开发来用不同的流动相及提取方法检测

的, 操作费时。笔者参考多篇文献^[4-10], 采用高效液相色谱(HPLC)双波长梯度洗脱法同时对川黄柏中盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱的含量进行测定, 并对东莞市面上 9 批川黄柏药材进行了检测, 旨在为生产及流通领域中评价川黄柏药材质量提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

1200RRLC 型高分离度快速液相色谱仪, 包括 G1314B VWD SL 紫外检测器、G1312B Bin Pump SL 二元泵、G1316B TCC SL 柱温箱、G1329B ALS SL 标准自动进样器(美国 Agilent 公司); KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D、CP224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110713-201212, 含量: 86.7%); 盐酸黄柏碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111895-201202, 含量: 93.9%); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 药材

9 批川黄柏药材分别来自东莞市莞城区、东城区、南城区的医院和药店, 以及细村和罗沙的农贸市场, 均经东莞东华医

* 主管药师。研究方向: 药品调剂、临床药学。电话: 0769-22471668-8218。E-mail: 2607051240@qq.com

院药学部陈平副主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取盐酸黄柏碱对照品 5.03 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 ml 量瓶中, 作为盐酸黄柏碱对照品贮备液。精密称取盐酸小檗碱对照品 21.56 mg, 加甲醇溶解并定容至 5 ml 量瓶中, 作为盐酸小檗碱对照品贮备液。精密量取上述两种对照品贮备液各 1 ml, 同置 5 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 即得质量浓度分别为 94.46 mg/L 和 747.70 mg/L 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液 取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入流动相 25 ml, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用流动相补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Waters XTERRA[®]MS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(每 100 ml 中加 0.1 g 十二烷基磺酸钠), 梯度洗脱(0~10 min, 29% 乙腈; >10~20 min, 45% 乙腈; >20~25 min, 45% 乙腈); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 284 nm(0~12 min), 265 nm(>12~25 min); 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。理论板数以盐酸黄柏碱峰计算可达 3 000 以上。样品中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的色谱峰与其他峰能够达到基线分离, 保留时间分别为 9.19、24.93 min。色谱见图 1。

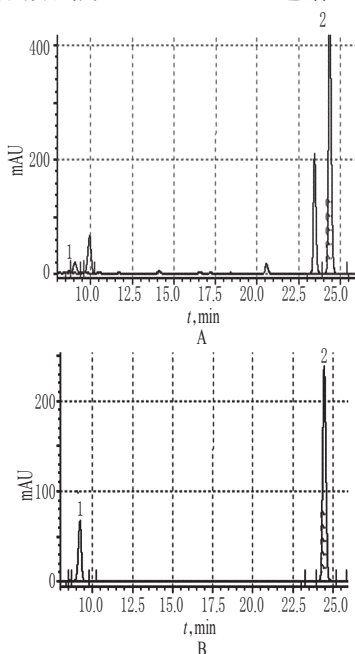


图 1 高效液相色谱图

A. 供试品; B. 混合对照品; 1. 盐酸黄柏碱; 2. 盐酸小檗碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test sample; B. mixed control; 1. phellodendrine chloride; 2. berberine hydrochloride

2.3 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、25 μl, 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以进样量(x)

为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得盐酸黄柏碱的回归方程为 $y=22\ 326x+4\ 531$ ($r=0.999\ 1, n=5$), 线性范围为 9.45~236.15 mg/L; 盐酸小檗碱的回归方程为 $y=6\ 312\ 526x+20\ 561$ ($r=0.999\ 8, n=5$), 线性范围为 74.77~1 869.25 mg/L。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.1.1”项下两种对照品贮备液各 10 μl, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积。结果, 盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 0.71%、0.35% (n 均为 6), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液于室温下放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按上述色谱条件进样 10 μl, 记录峰面积。结果, 盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.55%、1.02% (n 均为 6), 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一川黄柏药材样品 6 份各 0.5 g, 分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样 10 μl, 记录峰面积。结果, 样品中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的平均质量分数分别为 3.8% 和 0.35%, RSD 分别为 1.37%、0.58% (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样品约 0.5 g 共 9 份, 分别加入相当于样品含量 80%、100%、120% 不同质量浓度的两种对照品贮备液适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=3$)

成分	序号	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
盐酸小檗碱	1	0.501 0	0.761 5	0.598 1	1.349 4	98.30		
	2	0.513 0	0.779 8	0.598 1	1.363 7	97.62	97.47	0.93
	3	0.500 6	0.760 9	0.598 1	1.338 0	96.49		
	4	0.503 2	0.764 8	0.747 7	1.503 4	98.79		
	5	0.502 1	0.763 1	0.747 7	1.495 2	97.92	98.24	0.48
	6	0.505 3	0.768 0	0.747 7	1.500 9	98.02		
	7	0.502 1	0.763 2	0.897 2	1.643 1	98.07		
	8	0.501 1	0.761 6	0.897 2	1.644 5	98.41	98.03	0.39
	9	0.502 9	0.764 4	0.897 2	1.640 3	97.63		
盐酸黄柏碱	1	0.503 5	0.070 5	0.075 6	0.142 3	95.03		
	2	0.502 5	0.070 4	0.075 6	0.143 0	96.10	95.63	0.57
	3	0.504 2	0.070 6	0.075 6	0.143 0	95.78		
	4	0.501 8	0.070 3	0.094 5	0.160 9	95.92		
	5	0.506 2	0.070 9	0.094 5	0.160 6	95.03	95.03	0.93
	6	0.502 6	0.070 4	0.094 5	0.159 3	94.15		
	7	0.500 1	0.070 0	0.113 4	0.177 5	94.81		
	8	0.502 0	0.070 3	0.113 4	0.178 5	95.46	95.27	0.42
	9	0.503 3	0.070 5	0.113 4	0.178 8	95.56		

2.8 样品含量测定

取来自东莞不同地方的川黄柏药材粉末各适量, 分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样分析, 记录峰面积, 以外标法计算样品中盐酸小檗碱和盐酸黄柏

碱的含量,结果见表2(表中含量均为按干燥品计算)。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

序号及来源	盐酸小檗碱, %	盐酸黄柏碱, %	序号及来源	盐酸小檗碱, %	盐酸黄柏碱, %
1-莞城某医院	1.5	0.23	6-莞城某药店	2.1	0.16
2-东城某医院	4.7	0.39	7-南城某药店	3.8	0.35
3-南城某医院	3.2	0.35	8-细村农贸市场	1.3	0.13
4-东城某药店1	2.4	0.30	9-罗沙农贸市场	1.9	0.15
5-东城某药店2	3.0	0.33			

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者曾选择乙腈-1.5%磷酸溶液、乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸溶液(每100 ml中加0.1 g 十二烷基磺酸钠)等流动相系统进行预试验,发现采用乙腈-0.1%磷酸溶液(每100 ml中加0.1 g 十二烷基磺酸钠)作为流动相梯度洗脱,样品中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱与其他峰分离较好,且重现性高,故选其作为流动相。

3.2 提取条件的选择

在供试品溶液制备时,笔者对提取溶剂(不同体积分数的甲醇、无水乙醇及流动相)、提取方法(超声、回流及索氏提取器提取)及提取时间(10、30、60 min)进行了考察,发现采用流动相超声提取30 min提取较完全,且时间短,故选择该提取条件。

3.3 检测波长的选择

笔者分别选取在265、274、280、284 nm波长处进行预试验,最终选择284 nm作为盐酸黄柏碱、265 nm作为盐酸小檗碱的检测波长,样品干扰峰较少,且基线平稳。

3.4 问题与建议

按照2010年版《中国药典》规定,按干燥品计算,川黄柏含小檗碱以盐酸小檗碱($C_{20}H_{17}NO_4 \cdot HCl$)计不得少于3.0%,含黄柏碱以盐酸黄柏碱($C_{20}H_{23}NO_4 \cdot HCl$)计不得少于0.34%,可得知本试验中样品质量参差不齐。不知是否受产地、环境、采收季节、炮制等因素影响,从而导致含量较低^[8-12],这有待于进一步研究。

另外还需引起相关人士注意的是,无论是在医院、药店,还是在农贸市场,川黄柏没有与关黄柏完全区分开来销售,购

买时给的货品有些是关黄柏,经提醒才重新换作川黄柏,特别是农贸市场的药材质量与标准规定相差太多,故需要监管部门在生产 and 流通过程中加强监督检验。

综上所述,本方法简便、快速、专属性强,可有效评价川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2005年版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 99-100, 214-215.
- [2] 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: 286-287, 137.
- [3] 杨菁. 盐酸小檗碱的抗肿瘤作用及对B16细胞的诱导分化[D]. 福州: 福建医科大学, 2007.
- [4] 傅春升, 王琰, 李玥, 等. 黄柏-苍术药对不同比例配伍中生物碱含量的变化[J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2549.
- [5] 夏苓, 李灿明. HPLC测定黄柏生品与不同炮制品中3种生物碱的含量[J]. 中成药, 2008, 30(7): 1018.
- [6] 韩淑萍, 张卫英, 余道军, 等. 黄柏不同提取液中盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀的含量比较[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(7): 905.
- [7] 陈天朝, 翟来超. HPLC梯度洗脱测定黄柏中盐酸小檗碱与盐酸黄柏碱的含量[J]. 中医研究, 2011, 24(4): 23.
- [8] 范积平, 张贞良, 廖晓玲. 不同产地黄柏药材中4种主要生物碱类成分的含量测定[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(1): 69.
- [9] 彭爱华, 杨宏, 杨林, 等. RP-HPLC测定不同采收期川黄柏中小檗碱、黄柏碱的含量[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(4): 377.
- [10] 李红英, 向极钎, 龙澜, 等. HPLC法测定恩施黄柏药材中黄柏碱与小檗碱的含量[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2013, 31(1): 101.
- [11] 张凡, 高慧, 徐钢, 等. 黄柏炮制过程中生物碱成分含量变化的研究[J]. 中国医药科学, 2013, 3(1): 43.
- [12] 董凯旋, 董立莎. 黄柏饮片炮制规范化及质量控制的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(2): 78.

(收稿日期: 2014-02-17 修回日期: 2014-05-16)

国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟会见默沙东公司董事会主席

本刊讯 2014年6月10日, 国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟在京会见了默沙东公司董事会主席、总裁兼首席执行官福维泽(Kenneth C. Franzier)及其一行。

马晓伟介绍了我国在妇幼健康领域取得的成就和面临的挑战。他表示, 做好妇幼健康工作对提高全民健康水平有着

非常重要的意义, 需要多部门协作、共同参与, 需要通过科技进步和医疗创新来保障妇女儿童的健康权益。福维泽简要介绍了默沙东与中方在妇幼保健领域开展的合作, 并表示愿加强与中方在相关领域的合作。