

HPLC 法测定成药二妙丸、三妙丸、四妙丸及知柏地黄丸中小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的含量

南京中医药大学(210029) 潘 扬* 王天山 马国祥 郭立玮

摘 要 建立了反相高效液相法测定成药二妙丸、三妙丸、四妙丸及知柏地黄丸中小檗碱、掌叶防己碱和药根碱含量的方法。固定相为 Nova-Pak C₁₈, 4 μ m, 3.9 mm(i.d.) $\times$ 150 mm HPLC 柱;流动相为乙腈-水(1:1, 每 1000 mL 含磷酸二氢钾 3.4 g 及十二烷基硫酸钠 1.7 g);检测波长为 345 nm;小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的加样回收率分别为 98.67 $\pm$ 2.38%, 98.75 $\pm$ 1.67%, 98.38 $\pm$ 3.31%。

关键词 HPLC 法 二妙丸 三妙丸 四妙丸及知柏地黄丸 小檗碱 掌叶防己碱 药根碱

成药二妙丸、三妙丸及知柏地黄丸为药典方,四妙丸为部颁标准方,四者的主要组成药物之一均为黄柏,主要含小檗碱,其次为掌叶防己碱、药根碱等。关于三个生物碱和药根碱含量的测定方法,已报道的有薄层扫描法^[1]、高效液相法^[2]等。我们在有关文献^[3]的基础上,建立了一种灵敏、专属、可靠的高效液相色谱法,用以同时测定二妙丸、三妙丸、四妙丸及知柏地黄丸中这三种生物碱的含量。

1 实验部分

1.1 仪器和材料:成药样品,见表 4。

1.1.1 标准品与试剂:盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,标准号 713-8702),经 HPLC 定量纯度约为 98.22%;盐酸掌叶防己碱、盐酸药根碱对照品(光谱纯,由中国药科大学赵守训教授提供),经 HPLC 定量纯度分别约为 98.76%和 96.05%;关黄柏药材对照品(由本校中药鉴定教研室提供),经鉴定为芸香科植物黄柏 *Phellodendron amurense* Rupr. 除去栓皮的干燥树皮;二妙丸、三妙丸、四妙丸及知柏地黄丸阴性对照品(自制),成药为市售品;川黄柏药材对照

品(由成都中医学院中药鉴定教研室提供),经鉴定为芸香科植物黄皮树 *P. chinense* Schneid. 除去栓皮的干燥树皮。

1.1.2 仪器及测试条件:高效液相色谱仪——Waters 510 泵, Waters U6K 进样器, Waters 486 可调节紫外检测仪;CY-100 超远高级色谱工作站(北京超远电子技术研究所)。Shimadzu Libror AEL-40SM 精密(十万分之一)天平。H66025 超声清洗机(无锡市超声电子设备厂)。

1.1.3 色谱条件的选择:固定相: Nova-Pak C₁₈ 柱, 4 μ m, 3.9 mm $\times$ 15 mm (Waters 公司);流动相:乙腈-水(1:1, 1000 mL 含磷酸二氢钾 3.4 g 及十二烷基硫酸钠 1.7 g);检测波长:345 nm;柱温:室温;流量:0.9 mL/min;理论塔板数按小檗碱、掌叶防己碱和药根碱计算不得低于 9000、7500 和 6000,此条件下 3 种对照品与其它组分达到基线分离。

1.2 标准曲线的制备:精密称取小檗碱、掌叶防己碱和药根碱对照品各约 11.28 mg、10.45mg 和 11.07 mg,用甲醇定容至 100 mL,作为储备液。分别量取上述溶液 1 mL,定容至 25 mL,作为对照品溶液。精密吸取对

* Address: Pan Yang, Institute of Traditional Chinese Medicine & Pharmacology, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing

照品溶液 1、2、5、6、10、18、30、40 和 60 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积,分别以小檗碱、掌叶防己碱和药根碱进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横座标、峰面积值 Y 为纵座标进行回归计算,结果小檗碱回归方程 $Y=-167+166539X$, $r=0.9988$;掌叶防己碱回归方程 $Y=1350+1868557X$, $r=0.9992$;药根碱回归方程 $Y=1067+1943950X$, $r=0.9993$ 。

1.3 进样重现性和稳定性考察:精密吸取上述对照品 5 μL ,分别于 0、15、30、60、180 和 1440 min 重复进样 6 次,结果表明:小檗碱、掌叶防己碱和药根碱其 $\text{RSD}(\%)$ 分别为 1.28、1.11 和 1.19。

1.4 样品提取率的考察:小檗碱、掌叶防己碱、药根碱易溶于水、甲醇等溶剂,我们采用甲醇作为提取溶媒,超声波处理,结果表明:处理 3 次后 3 种生物碱均可完全提尽。

1.5 样品测定方法拟定:取黄柏药材对照品、二妙丸、三妙丸、四妙丸、知柏地黄丸适量,精密称重,置 10 mL 具塞离心管内,加 5 mL 甲醇超声提取 15 min,离心 (3000 r/min) 5 min,倾取上清液,过滤。重复操作 3 次,合并滤液,滤纸及残渣用甲醇清洗,过滤,并入上液,定容至 25 mL;用微孔滤膜过滤,弃去初滤液约 3 mL,取续滤液 5 mL,备用。

1.6 干扰因素考察:取二妙丸、三妙丸、四妙丸、知柏地黄丸阴性对照品,按照样品测定方法的条件进行试验,发现在小檗碱、掌叶防己碱和药根碱处,色谱中无干扰峰出现。

1.7 加样回收率试验:取已知含量的二妙丸 7 份,精密称定,其中 6 份加入小檗碱、掌叶防己碱和药根碱对照品储备液各 2、1、0.2 mL,1 份不加。用上述操作条件提取、测定,计算加样回收率:小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的加样回收率 (%) 分别为 98.67 ± 2.38 、 98.75 ± 1.67 和 98.38 ± 2.31 。

1.8 样品中小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的定性和定量分析:精密吸取供试品溶液,注入 HPLC 仪中,按上述色谱条件测定峰面积,用标准曲线法计算样品中小檗碱 $[(\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4)]$

$\text{Cl}\cdot2\text{H}_2\text{O}]$ 、掌叶防己碱 $[(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4)\text{Cl}\cdot3\text{H}_2\text{O}]$ 和药根碱 $[(\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4)\text{Cl}]$ 的含量。样品测定结果见表 1。

表 1 样品中 3 种成分的含量测定结果

	小檗碱	掌叶防己碱	药根碱
二妙丸	0.285	0.107	0.003
	0.088	0.065	0.005
	0.112	0.077	0.004
	0.105	0.056	0.013
	0.107	0.064	0.006
	0.167	0.100	0.005
	0.123	0.079	微量
	0.133	0.079	0.005
	0.669	0.046	0.006
	0.061	0.042	微量
	0.082	0.057	0.007
	0.060	0.039	微量
	0.018	0.010	微量
	0.015	0.009	微量
三妙丸	0.047	0.029	0.003
	0.084	0.057	0.003
	0.072	0.048	0.006
	0.066	0.053	0.003
	0.057	0.034	0.002
	0.072	0.052	0.004
	0.033	0.020	微量
	0.170	0.079	0.002
	0.058	0.046	0.002
	0.073	0.046	0.002
四妙丸	0.074	0.052	0.005
	0.062	0.036	0.004
	0.053	0.034	微量
	0.042	0.030	微量
	0.073	0.050	0.006
知柏地黄丸	0.041	0.030	0.010
	0.005	0.003	微量
<i>P. chinense</i>	0.170	0.001	微量
	4.056	0.036	微量
	<i>P. amurense</i>	0.668	0.261
			0.006

2 结论与讨论

2.1 川黄柏、关黄柏,二者成分相似,含多种生物碱,但川黄柏中小檗碱含量 (4.0%, 8.0%) 比关黄柏的 (0.6%, 2.5%) 高^[4],我们的实验结果也证明了这一点。小檗碱、掌叶防己碱、药根碱为季铵类生物碱,水溶性较好,制剂过程中容易被破坏;而它们的抗菌作用已被确认,因此,测定其含量对控制成药二妙丸、三妙丸、四妙丸及知柏地黄丸的质量具有重要意义。

2.2 上述结果表明,除知柏地黄丸可能含川黄柏外,其余的成药均含关黄柏;粉末的显微观察结果也支持这一结论。

2.3 药典和部颁标准规定,黄柏含量二妙丸为 50%,三妙丸为 33%,四妙丸为 33%,知柏地黄丸为 7%。前三者为水泛丸,后者为水蜜丸(河南产的知柏地黄丸为浓缩丸)。对 32 种成药的含量测定结果表明,大部分成药中含有小檗碱、掌叶防己碱和药根碱。

2.4 试验中还可使用 0.4 mol/L 硝酸铵-甲醇-四氢呋喃(70 : 20 : 10)、0.1 mol/L 酒石酸-甲醇-十二烷基磺酸钠(30 : 70 : 1)、水-乙腈-四氢呋喃(50 : 45 : 5)和甲醇-水-乙腈

(40 : 30 : 30,1000 mL 含磷酸二氢钾 3.4 g 及十二烷基硫酸钠 1.7 g)等进行洗脱,但出峰或分离情况均不如现在的流动相好。

参考文献

- 1 袁嵩芝. 浙江药学,1986,(11):10
- 2 邱晓星,等. 药学报,1986,21(6):658
- 3 日本药局方. 第十二改正,第二部:189
- 4 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册. 人民卫生出版社,1986. 769

(1996-11-06 收稿)

Determination of Berberine, Palmatine and Jatrorrhizine in Ermiao Wan, by HPLC Sanmiao Wan, Simiao Wan and Zhibaidihuang Wan by HPLC

Pan Yang, Ma Guoxiang, Guo Liwei

A reverse-phase HPLC method was described for the determination of berberine, palmatine, and jatrorrhizine in Ermiao Wan, Sanmiao Wan, Simiao Wan and Zhibaidihuang Wan (ready made Chinese medicinal pills with two, three and four subtle ingredients, and pills containing *Phellodendron amurense* and *Rehmannia glutinosa* etc.). The three constituents were separated on a Nova-Pak C₁₈ 3.9(i.d)×150 mm column, using acetonitrile-water (1 : 1, containing 3.4 g KH₂PO₄ and 1.7 g CH₃(CH₂)₁₁SO₃Na per 1000 mL) as the mobile phase, detected at 345 nm. The average recoveries of the three constituents were 98.67±2.39%, 98.75±1.67% and 98.38±2.31% respectively.

杜仲的炮制及降压成分提取工艺的研究

华中农业大学食科系(武汉 430070) 戚向阳* 喻晓辉 张声华 程秋琼

摘要 研究了杜仲中主要降压成分松脂醇二葡萄糖甙的提取条件及不同炮制工艺对其含量的影响。结果表明:杜仲粉采用 70%乙醇水溶液,于 90℃温度下以 1 : 6 的料液比浸提 3 次,每次 30 min,松脂醇二葡萄糖甙的浸出量最高。杜仲的炮制中,温度及时间对松脂醇二葡萄糖甙含量影响最为显著,随着温度升高,时间的延长,其含量下降。浸盐量对松脂醇二葡萄糖甙含量的影响不大。

关键词 杜仲 炮制 浸提 松脂醇二葡萄糖甙

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 具有很好的降压作用,且疗效平稳、无毒、无副作用^[1]。美国威斯康星大学研究认为,杜仲中主要的降压成分为松脂醇二葡萄糖甙^[2]。

杜仲临床多经炮制后入药,炮制方法有盐炒、砂烫、烘制等,多年来国内外对杜仲炮制工艺虽做了一些探讨^[3,4],但有关炮制工艺

对杜仲中有效成分的影响尚未见有关报道。据文献报道^[3,4,5],经不同方法炮制的杜仲,以烘制品的质量较好,故本文以烘制为炮制方法,研究烘制工艺对杜仲中主要降压成分松脂醇二葡萄糖甙的影响及其最佳的提取条件,为最佳炮制工艺的选择及松脂醇二葡萄糖甙的进一步纯化提供一定的理论依据。

* Address: Qi Xiangyang, Department of Food Sciences, Middle China Agriculture University, Wuhan