两种方法对黄柏各部位小檗碱含量测定

湖南中医药研究院中药所(长沙 410013) 彭艳梅*
湘雅药物研究所 黄松林

摘要 用高效液相色谱(HPLC)及高效毛细管电泳(HPCE)对黄柏的根皮、茎皮、枝皮中小檗碱的含量进行了比较研究。结果表明,根皮高于茎皮,枝皮含量最低。此外,对两种分析方法进行了比较,毛细管电泳法具有样品用量少、分析时间短、灵敏度高、无有机废液的污染等优点,是一种值得推广的分离技术。

关键词 黄柏 小檗碱 高效液相色谱 毛细管电泳

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。树皮中含有多种生物碱,其中以小檗碱为主要药效成分^[1]。我省湘西种植了大量的黄柏,有待开发利用,但由于茎皮的采收量一次不宜过多,而大量的枝皮却未被利用,为了充分利用黄柏树资源,扩大药用范围,我们对黄柏树根皮、茎皮、枝皮进行了主要有效成分的含量测定。对于黄柏中小檗碱含量测定的研究,目前仅见重量法、薄层层析法、紫外吸收光度法^[2]和高效液相色谱法^[3]测定的报道,为了扩展分析手段,采用了目前较先进的分析方法——毛细管电泳法,并将高效液相法与毛细管电泳法进行了比较,结果表明:HPCE 具有 HPLC 不可替代的优点。

1 高效液相

1.1 仪器:高效液相色谱(HPLC)仪为美国惠普 1050 系列(包括四元梯度,脱气机和手动进样器),配有 HP 可变波长紫外检测器及化学工作站(Chemstation)。

1.2 样品及试剂:标准品,盐酸小檗碱(购自中国药品生物制品检定所);样品,黄柏干燥的茎皮、根皮、枝皮(由湘西凤凰县提供);试剂,色谱纯的甲醇、乙腈、分析纯的磷酸。

1.3 色谱条件:色谱柱:Nucleosil-C₁₈(25

cm×4.6 mm)-70 国产分析柱(购自中国科学院化物所);柱温:27℃;流动相甲醇-乙腈-0.02 mol/L 磷酸水溶液(10:30:60);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;检测器:可变波长紫外检测器;压力:11.4×10⁶Pa;进样量:20 μL;灵敏度:0.1 AUFS。

1.4 标准曲线制备:精密称取盐酸小檗碱标准品 2.70 mg,以甲醇溶解,定容至 25 mL,将上述配制的浓标准溶液分别稀释成 50、10、5、2.5、1.0、0.5、0.1 μg/mL 标准系列,依次取 20 μL 进样,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标作标准曲线。结果得到一条线性良好的直线,回归方程 $Y = 63.45864X + 39.27092$, $r = 0.99956$ 。

1.5 样品测定:取干燥至恒重的黄柏茎皮、根皮、枝皮细粉(过 40 目筛)2 g,精密称定,分别置 25 mL 容量瓶中,加 15 mL 甲醇浸泡 3 h 后,采用超声波提取 30 min,待冷至室温用滤纸过滤,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。分别取供试品溶液 20 μL 进样。含量结果见表 1。

表 1 黄柏不同部位中小檗碱的含量

	茎皮	根皮	枝皮
样品重(g)	2.1395	2.2007	2.0537
小檗碱的含量(%)	3.66	4.04	0.81

1.6 精密度测定:取标准溶液 20 μL 连续进

* Address: Peng Yanmei, Hunan Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Changsha

彭艳梅 女,毕业于湖南中医学院中药系。研究实习员,主要从事制剂分析方面的工作,一直协助本单位的教授进行中药新药的研究。

样 5 次,求得变异系数 $RSD = 1.35\%$ ($n = 5$)。

1.7 加样回收率试验:精密称取 3 份已知含量的根皮的粉末约 0.2 g,分别加入 5 mg 盐酸小檗碱标准品置 100 mL 容量瓶中,加约 50 mL 甲醇浸泡 3 h 后,采用超声波提取 30 min,待冷却至室温后,定容至 100 mL 做为供试品溶液,再分别取供试品溶液 2 mL,用甲醇定容至 10 mL,每份均进样 20 μ L。结果回收率为 101.16%,变异系数为 1.42%。

2 毛细管电泳

2.1 仪器:HP3D 高效毛细管电泳仪 (HPCE) 仪为美国惠普 HP3D 系列 (包括自动进样器),配有二极管阵列检测器及化学工作站。

2.2 样品及试剂:标准品,盐酸小檗碱 (购自中国药品生物制品检定所);样品,黄柏干燥的茎皮、根皮、枝皮 (由湘西凤凰县提供)。试剂,磷酸 (分析纯),双重蒸馏水。

2.3 电泳条件:毛细管:内径 50 μ m,总长 64.5 cm,有效长度 56 cm;温度:25 $^{\circ}$ C;电压:25 kV;检测器:二极管阵列检测器;检测波长:230 nm;缓冲液:50 mmol/L 磷酸缓冲液, $pH = 7$;进样:0.0185 $\times 10^6$ Pa。

2.4 标准曲线制备:精密称取盐酸小檗碱标准品 2.5 mg,用双重蒸馏水溶解,定容至 25 mL,分别取 1.5、3.0、4.5、6.0、7.5 mL 置 10 mL 容量瓶中,并稀释至刻度,得到 5 个标准系列,它们的浓度依次为 15、30、45、60、75 μ g/mL,分别用 0.45 μ m 的超滤膜过滤,滤液置自动进样器的瓶内,在 0.0185 $\times 10^6$ Pa 的条件下进样,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,得到一条线性良好的标准曲线,回归方程: $Y = 0.360209X + 0.81220$, $r = 0.99918$ 。

2.5 样品测定:分别取 HPLC 实验中的供试品溶液 5 mL,至蒸发皿中,水浴 (80 $^{\circ}$ C) 蒸干甲醇,残渣用双重蒸馏水溶解置 50 mL 容量瓶中,并稀释至刻度,做为根、茎、枝供试品的稀释液。分别取根和茎的稀释液 4 mL 分别定容至 25 mL,取枝皮的稀释液 5 mL 定

容至 10 mL,做为根、茎、枝的供试品溶液。分别取供试液用 0.45 μ m 的超滤膜过滤,在 0.0185 $\times 10^6$ Pa 的条件下依次进样。结果见表 2。

表 2 黄柏不同部位小檗碱的含量 (g%)

	茎皮	根皮	枝皮
样品重 (g)	2.1395	2.2007	2.0537
小檗碱的含量 (%)	3.25	3.53	0.87

2.6 精密度测定:取标准溶液连续进样 5 次,求得变异系数 $RSD = 1.12\%$, ($n = 5$)。

2.7 加样回收率:分别取高效液相加样回收率试验中的供试品溶液 1 mL,置水浴 (80 $^{\circ}$ C) 蒸干,用双重蒸馏水完全溶解并稀释至 10 mL,取少量样品溶液用 0.45 μ m 的超滤膜过滤,在 0.0185 $\times 10^6$ Pa 的条件下进样。结果平均回收率为 103.02%, $RSD = 2.54\%$ ($n = 3$)。

3 讨论

3.1 采用了两种方法——高效液相色谱法 (HPLC) 和毛细管电泳法 (HPCE) 测定黄柏不同部位的小檗碱的含量,结果表明,毛细管电泳法具有分析速度快 (在 HPEC 中小檗碱的迁移时间为 4.0 min 左右,在 HPLC 中保留时间为 7 min 左右)、进样量少 (在 HPLC 中进样量为 20 μ L,在 HPCE 中进样量为 25 μ L),分离度高 (HPCE 中主要以其效率而不是选择性促进分离,这同主要靠选择性促进分离的 HPLC 形成了对比,溶质微小的淌度差异往往足以实现完全分离),且无有机废液的污染 (HPLC 仅在磷酸缓冲液中即可实现分离,而 HPLC 必须以甲醇、乙腈为流动相),另外,HPCE 的方法开发简便,仪器自动化程度高,在小檗碱的定量分析方面,毛细管电泳法较其它方法更具优越性。HPCE 还不完全成熟,理论的发展和分离的应用尚不完善。

3.2 从本实验的分析结果可以看出,黄柏的部位不同,小檗碱的含量不同,其中根皮含量最高,枝皮最低。我们认为,黄柏根皮可以和茎皮一起入药,供临床应用,用量可酌情减

少。另外,枝皮含量虽然较低,但枝的数量大,采收不影响树的生长,不会损害药源,可做为提取小檗碱的资源加以作用。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典.一部.1990.257
- 2 赫书文.中药通报,1988,13(10):27
- 3 王静竹.中草药,1994,6(25):293

(1996-07-19 收稿)

雷公藤叶制剂工艺及质量标准研究

南京军区南京总医院(210002) 李汉保* 王玉玺

摘要 报道雷公藤叶制剂的制备工艺及质量标准的研究,为合理地开发雷公藤资源提供了依据。

关键词 雷公藤叶 制备工艺 质量控制

雷公藤叶是雷公藤的营养器官,由于其毒性大,没有药用。随着雷公藤根广泛开发利用,许多地方资源已经枯竭,人们将研究的重点由地下转入地上。我们的研究证明,雷公藤叶的毒性大小和它所含的既是毒性成分又是有效成分的多少成正比,这些成分在叶的含量比根高3倍以上^[1],提示了它作为新资源的价值。因此,采取合理的工艺,建立切实可行的质控方法,使其化毒为益,变废为宝就成了我们研究的重点。

1 仪器与试剂

751 分光光度计(上海分析仪器厂),UV/VIS 分光光度计(USA/HP8542A);雷公藤叶经基源鉴定为卫矛科雷公藤 *Tripterygium wilfordi* Hook. f. 的干燥叶(浙江永康);雷公藤叶提取物及制剂由本院中药制剂室制备;雷公藤内酯醇(triptolide),自行制备经光谱鉴定,纯度大于98%; β -环糊精(β -CD,广东郁南味精厂);其余试剂均为分析纯。

2 雷公藤叶制剂的制备工艺

2.1 制备工艺:将雷公藤叶采用水提,氯仿循环萃取的方法制备提取物,再将其用 β -CD

包合而制成包合物。

2.2 叶提取物制备工艺的确定:大量研究报道雷公藤根中有效成分即可用水提,也可用醇及氯仿等有机溶剂提取。雷公藤叶和根不同,它含有大量的蜡质、叶绿素,采用单纯的某一种溶剂系统都会给后续步骤带来麻烦,经反复对比实验,选用了水提、氯仿循环萃取的工艺,有效部位的收率较水提醇沉法、醇提法有较大提高。

2.3 β -CD 包合工艺的确定:采用 $L_9(3^4)$ 的正交试验法进行研究,将雷公藤叶提取物制成乙醇溶液(A)与 β -CD的水溶液(B)在一定温度(C)条件下混合,搅拌一定时间(D),以ABCD4个因素各分3个水平进行包合试验,制得包合物,经洗涤后减压干燥即得,测定总内酯的含量,计算出包合率。结果证明搅拌时间、温度对包合率影响较小,而A和B的量之比影响较大,从而确定了包合物的最佳包合工艺。这种包合物可作片剂、胶囊剂等剂型的原料。

3 质量标准的研究

3.1 性状:淡黄色粉末,微带刺激性气味,极微溶于冷水(1: <10 000),微溶于热水(1:

* Address: Li Hanbao, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing

李汉保 男,1962年毕业于南京药学院药剂学校,现任南京军区总医院药剂科副主任药师。曾从事药理学教学、中药制剂多年,对雷公藤叶资源开发利用及制剂质量控制等方面做了大量的研究工作。