

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

纪丽莎, 张先福*, 喻卫武, 陈安良

浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300

摘要: **目的** 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 5 种成分。**方法** 采用高效液相色谱法。**结果** 盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀和甘草酸的线性范围分别为: 375~1 500 ng、9.091~44.440 ng、40.130~67.000 ng、130~2 064 ng、2.400~60.000 ng ($r>0.999$), 平均加样回收率大于 98.0%。**结论** 该方法准确, 重现性好, 能更好地控制黄连复方汤的质量。

关键词: 黄连复方汤; 盐酸小檗碱; 表小檗碱; 药根碱; 盐酸巴马汀; 甘草酸

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标志码:** B **文章编号:** 0253-2670(2011)02-0285-03

Determination of berberine hydrochloride, epiberberine, jatrorrhizine, palmatine, and glyeyrrhizinate in *Coptidis Rhizoma* Compound Decoction by HPLC

Ji Li-sha, ZHANG Xian-fu, YU Wei-wu, CHEN An-liang

Breeding Base, State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China

Key words: *Coptidis Rhizoma* Compound Decoction; berberine hydrochloride; epiberberine; jatrorrhizine; palmatine; glyeyrrhizinate

鸭疫里氏杆菌病是由鸭疫里氏杆菌引起的对养鸭业危害最严重的传染病。采用抗生素治疗该病时极易产生耐药性。黄连复方汤由黄连、黄柏和甘草 3 味中药组成, 具有清热燥湿、泻火解毒、缓急止痛功效, 经由饮水途径给药对人工发病鸭保护率达 90%, 对自然发病时临床症状较严重的病鸭治愈率为 52%; 在鸭群自然散发里氏杆菌病期间, 提前给健康鸭用药, 可有效控制该病的蔓延^[1]。本课题组拆方研究发现, 黄连复方汤煎剂在体外对里氏杆菌有明显的抑菌作用, 但其组成的各单味药在体内单独给药却并无抗病效果。即使直接注射黄连中主要有效成分小檗碱也无治疗作用。黄柏和甘草各自的水煎剂在体外均无抑制里氏杆菌效果, 在体内单独或者两者组合给药也无抗病效果, 甚至单独给黄柏煎剂还引起鸭死亡率升高, 提示在抑制和抵抗里氏杆菌的增殖和攻击方面, 这 3 味药物具有协同和增强作用, 缺一不可。为了确立合理的黄连复方汤质量标准, 探索适宜的复方有效成分分析方法, 并

为进一步研究抗病分子机制, 开发具有自主知识产权的新兽药奠定基础, 根据药典^[2], 本实验选择盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀以及甘草酸作为黄连复方汤的测定指标, 建立了定量测定方法。

1 仪器与试剂

Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Water 公司), 微量分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SK3200LHC 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); Millipore Simplicity 型超纯水器(美国 Millipore 公司)。

盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀和甘草酸对照品(批号分别为 06/081015、06/081015、07/081015、10/071015、02/081015)购于上海诗丹德生物技术有限公司, 质量分数均大于 98%; 乙腈, 甲醇(色谱纯, 德国默克公司); 水为重蒸水, 氧化铝(分析纯, 100~200 目, 由上海陆都化学试剂厂生产), 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2010-06-17

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y3090613); 浙江省教育厅重点项目(Z200906965); 浙江林学院科研发展基金资助项目(2351000746)

作者简介: 纪丽莎(1984—), 女, 河北人, 硕士, 从事中兽医药理毒理学研究。E-mail: jls59@yahoo.cn

*通讯作者 张先福 E-mail: zhangxianfu@yahoo.cn

药材经浙江农林大学中药学科胡润淮教授鉴定,分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎(批号 20090327)、关黄柏 *Phellodendron amurense* Rupr. 干燥树皮(批号 091010)和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (批号 091010)均购于杭州中医院。药材用去离子水漂洗(洗去浮尘与污物),于恒温干燥箱中 60 °C 干燥,粉碎,过 40 目筛,干燥条件至恒重,备用。黄连复方汤按照处方规定自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 盐酸小檗碱^[3] Welch XB C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(40:60,含十二烷基磺酸钠 0.1 g/100 mL),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 365 nm,柱温 25 °C。

2.1.2 表小檗碱^[4]和药根碱^[5] Sunfire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 3.0)(25:75),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 265 nm,柱温 25 °C。

2.1.3 盐酸巴马汀^[6] Welch XB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.5%三乙胺溶液(28:72,磷酸调节至 pH 2.9),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 348 nm,柱温 25 °C。

2.1.4 甘草酸^[7] Welch XB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水-冰醋酸

(70:30:1),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 250 nm,柱温 25 °C。

2.2 供试品溶液的制备

将适量黄连复方汤超声提取 60 min,补足质量,离心,吸取上清液 4 mL 加到氧化铝柱(8 g, 100~200 目,105 °C 活化 1 h)上,用甲醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 2 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱和盐酸巴马汀的对照品适量,用乙腈溶解稀释,分别配成 1.50、1.51、1.80、1.29 mg/mL 的储备液,即得。精密称取甘草酸的对照品适量,用甲醇溶解稀释,配成 1.20 mg/mL 储备液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按照处方组成,取除甘草外其余药材粉末按照供试品溶液的制备项下方法操作,即得。因为黄连和黄柏药材含有盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸巴马汀和药根碱,所以未设计生物碱的阴性试验。

2.5 线性关系考察

依次精密吸取盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀和甘草酸对照品溶液 2、4、6、8、10 μL,按上述色谱条件进样测定。以进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得 5 种成分的回归方程、相关系数及线性范围,见表 1。

表 1 标准曲线的回归方程

Table 1 Regression equation of standard curve

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ng
盐酸小檗碱	$Y=38\,955\,791.048\,X+8\,047\,995.500$	0.999 3	375~1 500
表小檗碱	$Y=120\,116\,636.295\,X+1\,370\,320.606$	0.999 0	9.091~44.440
药根碱	$Y=4\,500\,027\,836.865\,X-1\,311\,503.051$	0.999 0	40.130~67.000
盐酸巴马汀	$Y=32\,496\,134.867\,X+319\,637.333$	0.999 0	130~2 064
甘草酸	$Y=6\,755\,880.952\,X+15\,570.000$	0.999 1	2.400~60.000

2.6 精密度试验

精密吸取盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀以及甘草酸对照品溶液,按上述色谱条件重复进样 5 次,每次 5 μL,测定组分的峰面积,计算得各成分峰面积的 RSD 分别为 1.15%、0.78%、1.2%、1.69%、2.13%。

2.7 重现性试验

取批号 20081229 样品 3 份,制备供试品溶液,

每次进样 5 μL,测定 3 次,取平均值。结果盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀以及甘草酸质量浓度的 RSD 分别为 0.37%、0.78%、0.46%、0.99%、1.2%。

2.8 稳定性试验

取批号 20081229 样品,制备供试品溶液,分别在 1、2、4、6、8、24 h 取样测定,结果甘草酸在 6 h 内质量浓度稳定,盐酸小檗碱,表小檗碱,

药根碱, 盐酸巴马汀在 24 h 内质量浓度无明显变化, 其 RSD 分别为 0.93%、0.81%、0.64%、0.77%、0.71%。

2.9 加样回收率试验

取批号 20081229 样品适量, 分别加入盐酸小檗碱对照品 1.5 mg, 表小檗碱对照品 1.6 mg, 药根碱对照品 1.0 mg, 盐酸巴马汀对照品 0.35 mg 和甘草酸对照品 1.38 mg, 制备供试品溶液, 进样测定,

重复 5 次。结果盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀、甘草酸的平均回收率分别为 100.9%、98.74%、98.96%、99.38%、98.5%, RSD 分别为 1.05%、1.19%、0.95%、1.22%、1.15%。

2.10 测定结果

制备了 3 批黄连复方汤, 在以上色谱条件下测定 5 种有效成分的峰面积, 将峰面积值代入回归方程, 计算质量浓度, 结果见表 2。

表 2 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的测定 ($n=3$)

Table 2 Determination of berberine hydrochloride, epiberberine, jatrorrhizine, palmatine, and glycyrrhizinate in *Coptidis Rhizome* Compound Decoction ($n=3$)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)				
	盐酸小檗碱	表小檗碱	药根碱	盐酸巴马汀	甘草酸
20081229	5.7100	0.299 7	0.108 7	0.2540	0.009 9
20090101	5.7000	0.299 4	0.109 1	0.2510	0.010 2
20090102	5.7200	0.299 9	0.108 3	0.2550	0.009 8

3 讨论

参照文献报道^[7]中甘草酸的分离, 选择流动相为甲醇-醋酸铵、甲醇-磷酸体系, 但在此流动相条件下甘草酸的色谱图峰形较差, 且难于达到基线分离。在此基础上改用甲醇-水系统, 结果所得色谱图以甲醇-水-冰醋酸 (70:30:1) 洗脱为最佳, 甘草酸能达到较好分离, 理论塔板数高于 5 000。

甘草加水分解后可产生二分子葡萄糖醛酸和一分子 18 β -甘草次酸, 甘草次酸是甘草甜素结构中的活性部分, 本实验共进行了 6 种有效成分测定, 其中包括甘草次酸, 但在本实验的高效液相色谱测定中甘草次酸却没有被检测出来, 据推测可能与水的温度有关。该甘草次酸是否是由复合物分解所致以及如果是由分解产生, 其分解的机制如何, 有待进一步探讨^[8]。

甘草酸是甘草甜味的主要来源, 推测其量应在 0.03~0.07 mg/g, 但在黄连复方汤中, 实际量却远远少于这个数值。根据理化性质分析: 甘草含三萜类、黄酮类、生物碱类和多糖类物质。三萜皂苷类化合物: 甘草酸水解后得二分子葡萄糖醛酸和 18 β -甘草次酸, 其结构式中含有羧基。黄连和黄柏都含有生物碱并且主要生物碱的结构母核多为苄基异喹啉原小檗碱型, 氮原子为季铵型。小檗碱具有 α -羟胺结构, 在碱性下能有醇式、季铵式、醛式 3 种互变的结构式, 其中以季铵式最稳定, 可以离子化呈强碱性。这样羧基中电离的氢离子会和季铵式中的

氢氧根离子发生酸碱中和反应, 使得甘草在煎剂中的煎出量可因配伍其他中药而有很大差异。

致谢: 浙江农林大学袁珂教授、张汝民教授、林海萍副教授、胡润淮教授和张新风副教授对本稿提出的意见和建议。特别感谢河北农业大学马玉忠教授给予的支持。

参考文献

- [1] 张先福. 中药防治鸭疫里氏杆菌病的组方筛选及其抗菌机制的初步研究 [D]. 杭州: 浙江大学、浙江省农业科学院, 2006.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 刘存军. RP-HPLC 测定连蒲双清片中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中成药, 2007, 29(12): 1864-1865.
- [4] 应 懿, 何志红, 周世文, 等. 测定黄连中 5 种生物碱含量的高效液相色谱法研究 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 843-845.
- [5] 崔丽莉, 张玉红, 秦彦杰, 等. HPLC 法同时测定黄檗皮中小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的含量 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(6): 117-118.
- [6] 刘 芳, 张 浩, 方清茂, 等. 黄连上清丸 (片) 中小檗型生物碱的含量测定 [J]. 中成药, 2005, 27(12): 1393-1396.
- [7] 于叶玲, 崔久峰, 唐 星. HPLC 法测定温肾咳喘片中欧前胡素、蛇床子素、和厚朴酚、厚朴酚和甘草酸 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 387-389.
- [8] 戴开金, 罗佳波, 吴昭晖, 等. 配伍对葛根芩连汤中甘草酸含量的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1084-1087.