

· 药剂与工艺 ·

关黄柏中生物碱类成分的“一测多评”

尹 萌, 孟月兰, 闻珺毓

江苏省扬州药品检验所, 江苏 扬州 225009

摘要: 目的 建立同时测定关黄柏中小檗碱、巴马汀和药根碱的 HPLC 方法, 在此基础上, 建立“一测多评”法的方法学考察方式, 验证该方法在关黄柏质量控制中应用的可行性和技术适用性。方法 以关黄柏中主要成分小檗碱为指标, 建立其与药根碱、巴马汀间的相对校正因子, 并用该校正因子计算药根碱和巴马汀的量, 对“一测多评”法的计算值与外标法实测值进行比较。结果 建立了关黄柏中 3 种生物碱类成分“一测多评”法方法学的考察模式; “一测多评”法对不同的色谱柱和仪器的计算值与外标法实测值之间没有显著性差异。结论 同时测定小檗碱、巴马汀和药根碱 3 种生物碱的“一测多评”法方法可靠, 结果准确, 可用于控制关黄柏药材及饮片的质量。

关键词: 一测多评; 关黄柏; 生物碱; HPLC; 相对校正因子; 小檗碱; 巴马汀; 药根碱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1093-04

Quantitative analysis of multi-components with single marker for determination of alkaloids in *Phellodendri Amurensis Cortex*

YIN Meng, MENG Yue-lan, WEN Li-yu

Jiangsu Yangzhou Institute for Drug Control, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneously measuring the content of berberine, palmatine, and jatrorrhizine in *Phellodendri Amurensis Cortex*, and on this basis, the multiple components were examined by way of using a single test to validate the method's feasibility and technical suitability of quality control applications for *Phellodendri Amurensis Cortex*. **Methods** Taking berberine, the main component in *Phellodendri Amurensis Cortex*, as an indicator, a relative correction factor between berberine and palmatine as well as jatrorrhizine was established. Then the correction factor was used to calculate the content of the other two in *Phellodendri Amurensis Cortex*. In this way, the calculated value was compared with the external standard method. **Results** A measuring method of evaluating the three alkaloids in *Phellodendri Amurensis Cortex* was established via using a single test; There was no significant difference compared with the external standard method. **Conclusion** The method for simultaneously measuring the content of berberine, palmatine, and jatrorrhizine in *Phellodendri Amurensis Cortex* is reliable and accurate, it could be used to control the quality of crude drugs and herbal pieces of *Phellodendri Amurensis Cortex*.

Key words: quantitative analysis multi-components by single marker; *Phellodendri Amurensis Cortex*; alkaloids; HPLC; relative correction factor; berberine; palmatine; jatrorrhizine

关黄柏为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮, 主要成分为生物碱类, 含量最高的为小檗碱, 还有巴马汀、药根碱, 除此之外, 还含有黄柏酮类等成分^[1-5]。目前关黄柏药材、饮片及含有关黄柏的成方制剂主要以单指标成分(巴马汀或小檗碱)来控制质量。本实验采用 HPLC 法同时测定了关黄柏中药根碱、巴马汀和小檗碱的量, 并利用以上 3 种生物碱内在的函数和比例关系,

采用“一测多评”的方法^[6-7], 通过验证试验, 以小檗碱为内标成分, 得出巴马汀、药根碱与小檗碱之间的相对校正因子 (f), 计算出这两种生物碱的含量, 为真实评价关黄柏以及含关黄柏的中成药的质量提供了全新的分析模式。

1 仪器与材料

Waters 2695—2996 高效液相色谱仪, 包括 Empower 工作站 (Waters 公司); Agilent 1200 高效

收稿日期: 2010-10-13

作者简介: 尹 萌 (1968—), 女, 江苏姜堰人, 副主任中药师, 从事药品检验工作。Tel: (0514)87950049 E-mail: ymeng8080@163.com

液相系统, 包括 Agilent chemstation 工作站 (Agilent 公司); Alltima C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); Agilent Extend C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); Waters C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); Dikma C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); AG135 电子分析天平 (Mettler Toledo); KH-400KDB 型高功率数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)。

关黄柏饮片均为市售品 (安徽济人药业有限公司, 批号 20090203; 安徽省涡阳县缘和堂中药饮片有限责任公司, 批号 20090605; 安徽惠隆中药饮片有限公司, 批号 20091001、20091101), 经江苏省扬州药品检验所张厚宝主任中药师鉴定为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥根皮; 盐酸小檗碱 (批号 110713-200911)、盐酸巴马汀 (批号 110732-200907)、盐酸药根碱 (批号 0733-200005) 对照品均购自中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法学考察

2.1 色谱条件

色谱柱为 Alltima C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈 (57:43) (每 1 000 mL 中加入 1 g 十二烷基硫酸钠, 调节 pH 值至 4.0), 柱温 28 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 345 nm。上述色谱条件下, 各组分分离度良好, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取药根碱对照品 5.26 mg、巴马汀对照品 20.38 mg、小檗碱对照品 40.60 mg 分别置 100 mL 量瓶中, 各加流动相适量使溶解并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制得各对照品储备液。再分别精密吸取上述各对照品储备液适量, 置同一 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液 (药根碱 6.312 μg/mL、巴马汀 40.76 μg/mL、小檗碱 81.20 μg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备

取关黄柏 (过 80 目筛) 粉末约 0.25 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入流动相 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min (功率 300 W, 频率 50 kHz), 取出, 放冷, 用流动相补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取药根碱对照品储备液 0.5、1.0、2.0、

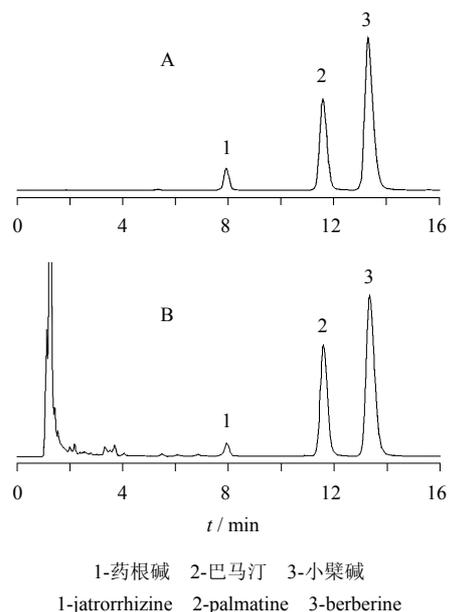


图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

3.0、4.0、5.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 再分别精密吸取巴马汀、小檗碱对照品储备液各 1.0、1.5、2.5、5.0、7.5、10.0 mL 按顺序分别置上述相应的 6 个 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 20 μL, 注入液相色谱仪。以进样量对峰面积积分值进行线性回归, 得回归方程: 药根碱 $Y=0.8935X+0.1287$ ($r=0.9971$), 巴马汀 $Y=0.7287X+1.0301$ ($r=0.9979$), 小檗碱 $Y=0.7316X+1.0648$ ($r=0.9992$), 表明药根碱在 0.021~0.210 μg、巴马汀在 0.163~1.630 μg、小檗碱在 0.325~3.248 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL 连续进样 6 次, 记录色谱峰, 计算得药根碱、巴马汀和小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.31%、0.19%、0.28%。

2.6 稳定性试验

称取关黄柏 (批号 20090203, 过 80 目筛) 粉末约 0.25 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 分别于制备后 0、1、2、4、8、12、20 h 进样, 记录色谱峰, 计算得药根碱、巴马汀和小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.32%、0.67%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.7 重现性试验

称取关黄柏 (批号 20090203, 过 80 目筛) 粉末约 0.25 g, 共 6 份, 精密称定, 分别制备供试

品溶液, 进样测定, 计算得药根碱、巴马汀和小檗碱质量分数的 RSD 分别为 2.2%、1.3%、1.3%。

2.8 加样回收率试验

精密称取适量关黄柏(批号 20090203, 过 80 目筛)粉末 6 份, 分别加入药根碱对照品储备液 3 mL、巴马汀对照品储备液 5 mL、小檗碱对照品储备液 2 mL, 制备供试品溶液, 测定, 计算得药根碱、巴马汀和小檗碱平均加样回收率分别为 98.96%、97.96%、99.34%, RSD 分别为 2.0%、1.6%、1.9%。

3 “一测多评”法耐用性和系统适应性评价^[8-9]

3.1 色谱柱考察

取“2.4”项下制备的 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液, 分别进样 20 μL , 以盐酸小檗碱为内

标, 计算小檗碱对药根碱和巴马汀的相对校正因子, 考察了 Alltima C₁₈ 柱、Agilent Extend C₁₈ 柱、Waters C₁₈ 柱、Dikma C₁₈ 柱 4 种色谱柱对相对校正因子的影响, 结果见表 1。表明不同色谱柱所得到的校正因子基本一致。

3.2 高效液相色谱考察

取“2.4”项下制备的 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液, 分别进样 20 μL , 以盐酸小檗碱为内标, 计算小檗碱对药根碱和巴马汀的相对校正因子, 考察了 Waters 2695—2996 和 Agilent 1200 两种高效液相色谱仪对相对校正因子的影响, 结果见表 2。表明在不同的液相色谱系统下所得到的相对校正因子基本一致。

表 1 不同色谱柱的相对校正因子

Table 1 Related correction factors of different columns

| 小檗碱质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | Alltima C ₁₈ 柱 | | Agilent Extend C ₁₈ 柱 | | Waters 柱 | | Dikma C ₁₈ 柱 | |
|--|---------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| | $f_{\text{小檗碱/药根碱}}$ | $f_{\text{小檗碱/巴马汀}}$ | $f_{\text{小檗碱/药根碱}}$ | $f_{\text{小檗碱/巴马汀}}$ | $f_{\text{小檗碱/药根碱}}$ | $f_{\text{小檗碱/巴马汀}}$ | $f_{\text{小檗碱/药根碱}}$ | $f_{\text{小檗碱/巴马汀}}$ |
| 16.24 | 1.235 1 | 0.981 8 | 1.216 9 | 1.002 9 | 1.247 1 | 1.000 7 | 1.237 4 | 1.002 0 |
| 24.36 | 1.206 1 | 1.014 8 | 1.209 0 | 1.006 9 | 1.204 9 | 1.005 9 | 1.214 6 | 1.013 8 |
| 40.60 | 1.218 0 | 1.003 3 | 1.195 8 | 0.998 5 | 1.178 2 | 1.001 4 | 1.200 2 | 1.004 9 |
| 81.20 | 1.202 7 | 1.012 1 | 1.228 2 | 1.004 0 | 1.205 5 | 1.008 4 | 1.206 2 | 1.007 1 |
| 121.80 | 1.259 4 | 1.013 7 | 1.249 7 | 1.001 3 | 1.214 1 | 1.003 3 | 1.208 3 | 1.005 3 |
| 162.40 | 1.212 1 | 1.001 2 | 1.237 5 | 1.002 4 | 1.225 4 | 1.004 6 | 1.224 8 | 1.003 9 |
| 平均值 | 1.222 2 | 1.004 5 | 1.222 8 | 1.002 7 | 1.212 5 | 1.004 0 | 1.215 2 | 1.006 2 |
| RSD/% | 1.7 | 1.2 | 1.5 | 0.3 | 1.8 | 0.3 | 1.1 | 0.4 |

表 2 不同高效液相色谱的相对校正因子

Table 2 Related correction factors of different HPLC

| 仪 器 | 色 谱 柱 | $f_{\text{小檗碱/药根碱}}$ | $f_{\text{小檗碱/巴马汀}}$ |
|------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Waters 2695—2996 | Alltima C ₁₈ | 1.194 0 | 1.004 5 |
| | Dikma C ₁₈ | 1.215 2 | 1.006 2 |
| | Waters C ₁₈ | 1.212 5 | 1.004 0 |
| | Agilent C ₁₈ | 1.222 8 | 1.002 7 |
| Agilent 1200 | Alltima C ₁₈ | 1.189 4 | 0.996 8 |
| 平均值 | | 1.206 8 | 1.002 8 |
| RSD/% | | 1.1 | 0.33 |

3.3 色谱峰专属性考察

利用相对保留时间进行定位, 即以各待测组分色谱峰与小檗碱色谱峰的相对保留时间来确定, 同时采用 DAD 检测器通过提取相对保留时间一致的色谱峰的光谱图, 与对照品的光谱图进行比较, 再进一步确认。药根碱、巴马汀与小檗碱峰相对保留时间的平均值分别为 0.618 2、0.869 5, RSD 分别为

3.0%、1.0%。结果见表 3。

4 样品测定

分别取各批药材制备供试品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定。分别采用外标法和“一测多评”法计算关黄柏中盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量, 结果见表 4。采用“一测多评”法及外标法所测得的关黄柏药材中药根碱和巴马汀的含量基本一致, 表明一测多评法可用于关黄柏药材中生物碱的含量测定。

5 讨论

在一定的线性范围内, 成分的量(质量或浓度)与检测器响应成正比, 即: $W=f(A)$ 。测定时, 以关黄柏中主要生物碱成分小檗碱为内标, 建立该成分与其他两种生物碱巴马汀和药根碱之间的相对校正因子, 然后通过校正因子计算这两种生物碱的含量。这种测定一个成分, 实现对多个成分定量的方法称为一测多评法。计算公式为:

表 3 3 种成分的保留时间及相对保留时间

Table 3 Retention time and relative retention time of three components

| 仪器 | 色谱柱 | t_{R} 药根碱 | t_{R} 药根碱/ t_{R} 小檗碱 | t_{R} 小檗碱 | t_{R} 巴马汀/ t_{R} 小檗碱 | t_{R} 巴马汀 |
|------------------|-------------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| Waters 2695—2996 | Alltima C ₁₈ | 7.948 | 0.596 5 | 13.325 | 0.870 7 | 11.602 |
| | Dikma C ₁₈ | 6.712 | 0.613 9 | 10.934 | 0.858 9 | 9.391 |
| | Waters C ₁₈ | 4.999 | 0.651 7 | 7.671 | 0.874 5 | 6.708 |
| | Agilent C ₁₈ | 4.134 | 0.619 5 | 6.673 | 0.861 4 | 5.748 |
| Agilent 1200 | Alltima C ₁₈ | 7.220 | 0.609 5 | 11.846 | 0.882 2 | 10.450 |
| 平均值 | | 6.245 | 0.618 2 | 10.181 | 0.869 5 | 8.861 |
| RSD/% | | | 3.0 | | 1.0 | |

表 4 关黄柏中药根碱、巴马汀和小檗碱的测定 (n=2)

Table 4 Determination of jatrorrhizine, palmatine, and berberine in *Phellodendri Amurensis* Cortex (n = 2)

| 批号 | 小檗碱/% | 药根碱/% | | 巴马汀/% | |
|----------|---------|----------|----------|---------|---------|
| | | 一测多评 | 外标 | 一测多评 | 外标 |
| 20090203 | 0.852 6 | 0.037 23 | 0.036 94 | 0.501 5 | 0.503 6 |
| 20090605 | 0.896 6 | 0.030 26 | 0.032 04 | 0.383 0 | 0.399 4 |
| 20091001 | 1.012 0 | 0.038 88 | 0.039 19 | 0.519 2 | 0.517 1 |
| 20091101 | 0.972 0 | 0.036 24 | 0.036 54 | 0.464 3 | 0.462 4 |

$$W_m = (W_k \times A_m) / (f_{km} \times A_k)$$

A_k 为内标物峰面积, W_k 为内标物浓度, A_m 为其他组分 m 峰面积, W_m 为其他组分 m 浓度

关黄柏为常用中药, 主要有效成分为生物碱类, 含量最高的为小檗碱, 还有巴马汀、药根碱等。目前关黄柏药材、饮片及含有关黄柏的成方制剂主要以单指标成分(巴马汀或小檗碱)来控制质量。而小檗碱和巴马汀在芸香科和毛茛科植物中普遍存在, 并且这两种生物碱的提取和合成工艺已相当成熟, 很易购得纯品, 若在工艺中非法添加即能很容易符合质量标准的要求, 所以仅仅控制其中小檗碱或巴马汀的含量, 无法真实地评价药物的内在质量, 而本实验采用“一测多评”的方法仅使用一种对照品同时测定 3 种主要成分的含量, 能全面而真实地评价关黄柏药材的内在质量。

采用不同比例的乙腈-磷酸盐溶液作为流动相系统进行分析, 峰型较差, 且色谱峰重叠无法得到有效分离。改用乙腈-磷酸二氢钾-十二烷基硫酸钠系统后, 分离效果明显改善, 且峰形较好, 可以使药根碱、巴马汀、小檗碱与其他杂质完全分离。

实验中选用盐酸-甲醇(1:100)、0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(57:43)(每 1 L 中加入 1 g 十二烷基硫酸钠, 调节 pH 值至 4.0)、甲醇 3 种不同提取溶剂, 超声、回流、索氏提取等不同提取方

法, 结果显示以流动相作为溶剂采用超声提取 30 min (300 kW, 50 kHz), 目标成分的提取效率高, 干扰的杂质峰较少, 并且色谱峰峰形对称。

采用内标峰的保留时间, 加上相对保留时间, 再根据峰形判断, 即能够正确判断出目标峰的准确位置, 结果表明, 利用上述方法进行峰的定位是可行的。

考察了不同品牌的色谱柱和液相色谱系统对小檗碱与药根碱和巴马汀之间相对校正因子的影响, 说明实验中得到的校正因子具有较高的可信度, 通过计算可知“一测多评”法与外标法测到的含量之间没有显著性差异, “一测多评”法可以在对照品缺省的情况下实现定量测定的要求。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 刘丽梅, 陈琳, 王瑞海, 等. 黄柏生物碱大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1990-1993.
- [3] 胡俊青, 胡晓. 黄柏化学成分和药理作用的现代研究 [J]. 当代医学, 2009, 15(7): 139-141.
- [4] 王静, 张艳军, 常亮堂. 小檗碱对 $A\beta_{25-35}$ 损伤大鼠皮层神经元的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 728-733.
- [5] 章涛, 李菴清, 杨俊卿, 等. 小檗碱抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及其与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的关系 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 244-247.
- [6] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [7] 喻华达. 无纯样色谱校正因子的测定 [J]. 化学世界, 1992(7): 816-818.
- [8] 匡艳辉, 朱晶晶, 王智民, 等. 一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(5): 390-394.
- [9] 邹桂欣, 尤献民, 张颖, 等. 一测多评法在冠脉康胶囊多种成分检测中的应用研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1828-1831.