

HPLC-ESI-MS 同时分析萹黄连饮片及其制剂中的活性成分

徐江^{1,2}, 蒋俊^{1,2}, 贾晓斌^{2,3*}, 李平¹, 周成林¹, 蔡宝昌³, 吴皓³

1. 镇江出入境检验检疫局 国家食品添加剂及调味品检测重点实验室, 江苏 镇江 212008

2. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点研究室, 江苏南京 210028

3. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 以萹黄连为分析对象, 建立萹黄连饮片及其制剂中的多成分分析方法, 阐述其“反制”炮制前后的物质基础差异, 探讨萹黄连“反制”炮制的科学内涵。方法 首次采用高效液相-电喷雾-三重四极杆质谱(HPLC-ESI-MS)同时测定3批萹黄连饮片, 以及其制剂3批香连丸、3批香连片中绿原酸、药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱8个主要活性成分的量。结果 在萹黄连饮片及其制剂中均能同时检测到黄连饮片和吴茱萸饮片中的多种成分, 实验结果证明萹黄连饮片中加入了吴茱萸饮片中的多种成分。结论 方法学考察结果表明此方法符合测定要求, 结果准确, 对阐述萹黄连的物质基础和炮制机制以及萹黄连饮片及其制剂的质量控制研究具有一定的理论意义和实用价值。

关键词: 高效液相-电喷雾-三重四极杆质谱(HPLC-ESI-MS); 萹黄连饮片及制剂; “反制”炮制; 吴茱萸内酯; 吴茱萸次碱
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0279-04

Simultaneous analysis of bioactive compounds in Yuhuanglian processing pieces and their preparations by HPLC-ESI-MS

XU Jiang^{1,2}, JIANG Jun^{1,2}, JIA Xiao-bin^{2,3}, LI Ping¹, ZHOU Cheng-lin¹, CAI Bao-chang³, WU Hao³

1. State Key Laboratory of Food Additive and Condiment Testing, Zhenjiang Entry-exit Inspection Quarantine Bureau, Zhenjiang 212008, China

2. Key Laboratory of Oral Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Key Laboratory of Processing of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To establish the analytical method for multicomponents determination in Yuhuanglian processing pieces and preparations to explain the material basis differences before and after processing, and to approach the scientific connotation for “clash process”. **Methods** HPLC-ESI-MS method was used for the first time to simultaneously determine chlorogenic acid, jatrorrhizine, coptisine, palmatine, berberine, evodin, evodiamine, and rutaecarpine in three batches of Yuhuanglian processing pieces, three batches of Xianglian Pill, and three batches of Xianglian Tablet. **Results** Several components in *Coptidis Rhizoma* and *Evodiae Fructus* processing pieces could also be found in Yuhuanglian processing pieces. So it demonstrated that several components in *Coptidis Rhizoma* processing pieces were added to Yuhuanglian processing pieces. **Conclusion** The methodology research shows that this method can fit the demand of determination and have accurate results. This is important to explain the material basis and process mechanism of Yuhuanglian and formulate the quality standard of Yuhuanglian processing pieces and preparations.

Key words: HPLC-ESI-MS; Yuhuanglian processing pieces and preparations; clash process; evodin; rutaecarpine

萹黄连主要用于积滞内阻、胸膈痞闷、胁肋胀满、下痢脓血等消化系统疾病, 其炮制方法属于中药炮制中的“反制”, 即用药性辛热的吴茱萸, 取其水煎液与净黄连拌匀, 待液吸尽后, 炒干而得^[1-2]。

收稿日期: 2011-06-21

基金项目: 江苏省中药炮制重点实验室开放课题(ZYPZ002); 江苏省中医药领军人才专项(2006)

作者简介: 徐江(1960—), 男, 高级农艺师, 从事农产品及药用植物研究。

*通讯作者 贾晓斌 Tel: (025)85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

香连丸、香连片均是由萸黄连和木香两味药组成，清热化湿、行气止痛，用于大肠湿热所致的痢疾，广泛应用于中医临床^[3]。目前对萸黄连饮片的分析报道较少，有采用 HPLC 等方法测定其中来自黄连的原小檗碱型生物碱类成分^[4-5]，也有萸黄连炮制工艺方面的研究^[6-8]，但是，现有研究未能充分体现吴茱萸汁制黄连的炮制特色。经吴茱萸汁炙后，萸黄连饮片中可能同时含有黄连和吴茱萸中的多种成分。因此，本研究首次采用高效液相色谱-电喷雾-三重四级杆质谱联用技术，同时测定了萸黄连饮片和萸黄连制剂中的 8 个活性成分。本研究对阐述萸黄连“反制”物质基础、炮制机制及其饮片和制剂的质量控制研究具有一定的理论意义和实用价值。

1 仪器与材料

安捷伦 1200 HPLC system (美国 Agilent Corporation)，三重四级杆电喷雾质谱(美国 Agilent Technologies)，工作站：MassHunter。黄连药材购自南京药业股份有限公司中药饮片厂，吴茱萸药材购自湖北阳新县吴茱萸种植基地，分别经南京中医药大学吴德康教授鉴定为毛茛科植物黄连(味连) *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎和芸香科植物石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis*

(Dode) Huang 的干燥近成熟果实；萸黄连饮片按照《中国药典》2010 年版自制；香连丸购自南京国盛连锁药店，香连片购自南京邗泰药店；甲醇、乙腈、冰醋酸均为色谱纯；水为超纯水，其他试剂均为分析纯。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯对照品均购自中国药品生物制品检定所，黄连碱对照品(质量分数为 98.5%)由四川大学华西药学院张浩教授提供。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax XDC-C₁₈ 柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm)；流动相为乙腈-0.3%冰醋酸，梯度洗脱程序：0~7 min, 5%~8%乙腈；7~13 min, 8%~11%乙腈；13~25 min, 11%~25%乙腈；25~45 min, 25%~32%乙腈；45~50 min, 30%乙腈；50~75 min, 30%~60%乙腈；体积流量 0.4 mL/min；柱温 20 °C；检测波长 345 nm；进样量 5 μL。

2.1.2 质谱条件 正离子模式，雾化气温度 350 °C，雾化气体积流量 10 L/min，雾化气压力 172.375 kPa，毛细管电压 4 000 V，扫描范围 100~600，离子室电流 1.16 μA。分析图谱见图 1。

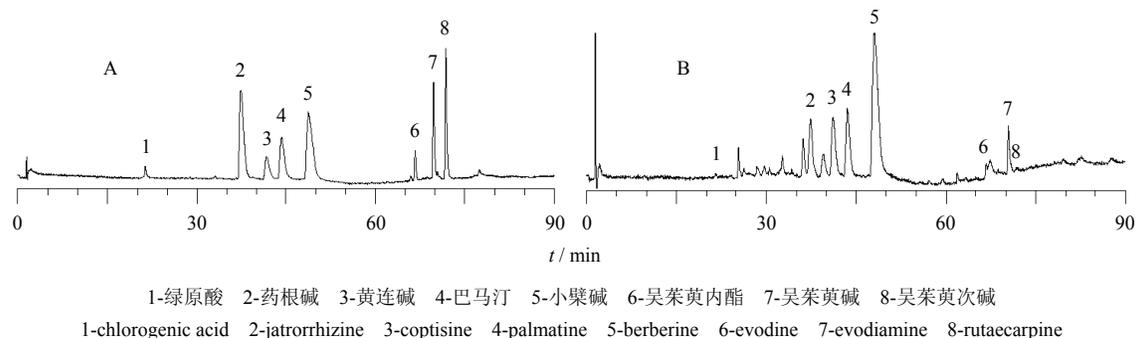


图 1 混合对照品 (A) 和萸黄连饮片 (B) 的液质联用代表性图谱

Fig. 1 Representative chromatograms of mixed reference substances (A) and Yuhuanglian processing pieces (B)

2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱对照品，甲醇溶解并配制成混合对照品溶液(含绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱分别为 34.5、35.3、41.8、32.0、42.6、12.9、18.5、35.0 μg/mL)，4 °C 贮存备用。

2.3 供试品溶液的制备

分别称取萸黄连粉末(60 目筛)，香连丸粉末(60 目筛)，香连片粉末(刮去糖衣，过 60 目筛)

各 0.2 g，精密称定，置具塞烧瓶中，加入 50% 甲醇 50 mL，超声处理 40 min，用 50% 甲醇补足减失的质量，滤过，分别取滤液 1 mL，50% 甲醇定容至 10 mL，得萸黄连饮片、香连丸、香连片供试品溶液。

2.4 线性关系考察

取“2.2”项的对照品储备液，精密吸取混合对照品溶液 5、10、20、30、40、60、70 μL 进样；以进样量为横坐标，以峰面积为纵坐标进行线性回归，得 8 种成分的回归方程、相关系数(*r*)及线性范围，各回归方程呈良好的线性关系，见表 1。

2.5 精密度试验

取萸黄连饮片样品 (No.1), 按照“2.3”项制

备供试品溶液。在 24 h 内重复进样 6 次, 测定精密度, 计算 RSD 值, 结果见表 2。

表 1 8 种化合物的回归方程、相关系数、线性范围及检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficient, linear range, and LOD of eight compounds

分析物	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ng	检出限 / pg
绿原酸	$Y=5\ 053.5 X-282.52$	0.999 9	6.9~96.6	41.98
药根碱	$Y=1\ 048\ 721 X+101\ 447$	0.999 9	7.0~98.0	0.73
黄连碱	$Y=258\ 201 X-40.01$	0.999 9	3.7~51.8	1.60
巴马汀	$Y=508\ 402 X-28\ 108$	0.999 9	2.5~36.1	0.57
小檗碱	$Y=1\ 271\ 407 X-111\ 917$	0.999 7	8.5~119.2	0.76
吴茱萸内酯	$Y=32\ 151 X-3\ 568.5$	0.999 9	7.0~98.8	24.57
吴茱萸碱	$Y=211\ 093 X-688.76$	0.999 8	6.4~89.6	3.39
吴茱萸次碱	$Y=838\ 756 X-77\ 674$	0.999 8	8.3~117.0	1.12

表 2 8 种化合物的精密度、重现性、稳定性和回收率试验结果 (*n*=6)

Table 2 Results of precision, repeatability, stability, and average recovery of eight compounds (*n* = 6)

分析物	RSD / %			回收率 / %	
	精密度	稳定性	重现性	平均值	RSD
绿原酸	1.47	1.37	2.31	100.23	2.23
药根碱	1.23	1.69	2.24	99.88	1.16
黄连碱	1.61	2.71	1.89	102.11	1.47
巴马汀	2.00	2.09	2.77	99.92	1.85
小檗碱	2.45	2.21	2.17	99.99	2.60
吴茱萸内酯	2.29	2.60	2.00	100.09	2.00
吴茱萸碱	2.03	2.67	2.92	100.33	1.75
吴茱萸次碱	1.94	2.44	2.57	101.00	2.36

2.6 稳定性试验

取萸黄连饮片样品 (No.1), 按照“2.3”项制备供试品溶液, 并分别按相应的色谱条件, 于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样, 计算 8 种成分峰面积的 RSD 值, 结果见表 2。

2.7 重现性试验

精密称定 No.1 号样品 5 份, 按供试品溶液的制备方法分别制备 5 份供试品溶液, 进行重现性试验, 测定各成分的量, 计算各成分质量分数的 RSD 值, 结果各成分质量分数的 RSD 均 < 3%, 表明重现性良好, 结果见表 2。

2.8 加样回收率试验

取萸黄连饮片样品 (No.1) 0.2 g, 同时平行 3 份, 并定量加入 8 种对照品, 按照“2.3”项供试品溶液制备项操作制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果见表 2。

2.9 样品检测

取萸黄连饮片、香连丸制剂和香连片制剂样品, 按照供试品溶液的制备方法操作后, 得各供试品溶液, HPLC-ESI-MS 法同时测定, 结果见表 3。

3 讨论

本研究首次采用液质联用的方法同时测定萸黄连饮片及其制剂中的绿原酸、药根碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱 8 种活性成分的分析方法, 并同时测定了 3 批萸黄连饮片、3 批香连丸和 3 批香连片中 8 种活性成分的量。实验中发现, 柱温条件对原小檗碱型生物碱的分离效果影响很大, 当柱温超过 35 °C 时, 所有峰堆叠在一起, 当柱温低于 25 °C 时效果较好, 经过考察, 本实验中柱温选择 20 °C。该方法简便, 重现性、稳定性好, 可用于萸黄连饮片炮制机制的研究, 以及萸黄连饮片及其制剂的质量分析研究。

表 3 样品中 8 种成分测定结果 ($n=3$)
Table 3 Determination of eight compounds in samples ($n=3$)

样 品		质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)							
		绿原酸	药根碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	吴茱萸内酯	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
萸黄连	No.1	1.199	4.425	34.993	13.097	57.917	2.995	0.227	0.160
	No.2	1.405	4.215	31.957	12.050	55.276	2.847	0.214	0.148
	No.3	1.596	4.177	30.914	12.059	53.085	2.737	0.207	0.139
香连丸	080401	0.213	1.419	3.849	4.200	28.128	0.070	0.012	0.015
	080903	0.196	1.407	3.580	4.049	27.524	0.035	0.004	0.006
	090201	—	1.337	3.402	3.797	26.349	0.036	0.004	0.006
香连片	081002	—	0.967	6.653	3.329	53.058	0.098	0.006	0.001
	081205	—	1.001	12.227	9.157	43.845	0.089	0.006	0.001
	081103	—	0.989	12.288	9.103	43.757	0.092	0.007	0.001

“—” 未检出

“—” not detected

本实验结果表明, 萸黄连饮片中增加了吴茱萸饮片中绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱等多种成分, 吴茱萸饮片中这些成分可能是吴茱萸辛热药性的物质基础, 因此, 萸黄连的寒性降低, 可能是这些成分所产生的辛热作用, 抵抗了黄连生物碱类成分的部分寒性所致; 另外, 黄连及其提取成分也具有抗溃疡的作用, 吴茱萸水煎液具有抗动物实验性胃溃疡的作用^[9], 因此, 黄连经吴茱萸汁炙后, 还可能增强黄连功效的作用。本实验也为后续研究提供了重要依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 蒋俊, 高成林, 贾晓斌, 等. 萸黄连寒热药性研究概况及其研究思路与方法 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1492-1495.

[3] 蒋俊, 贾晓斌, 陈彦, 等. HPLC-DAD 法测定炮制辅料吴茱萸汁中绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 396-398.

[4] 樊冬丽, 廖庆文, 鄢丹, 等. 黄连不同炮制品中生物碱类成分的比较研究 [J]. 解放军药学学报, 2006, 22(4): 276-279.

[5] 廖庆文, 樊冬丽, 肖小河, 等. 不同黄连炮制品 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 410-412.

[6] 徐运安, 徐爱良, 蒋孟良, 等. 萸黄连不同炮制方法对其小檗碱含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(4): 55-57.

[7] 黄艳萍, 袁萍, 刘浩. 多指标正交试验优选萸黄连最佳提取工艺 [J]. 中药材, 2009, 32(2): 306-308.

[8] 修彦凤, 徐德生, 冯怡, 等. 不同用量的吴茱萸炮制黄连后成分的比较 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 320-322.

[9] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004.