

HPLC 法测定黄连不同部位中 6 个生物碱

彭 福^{1,2}, 瞿显友², 钟国跃², 张宝喜^{1,2}, 王 钰², 罗维早^{2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要: 目的 建立黄连不同部位中盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的测定方法。方法 色谱条件为 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-30 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (每 1 000 mL 碳酸氢铵溶液含 7 mL 氨水及 1 mL 三乙胺); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 30 ℃。结果 黄连须根、根茎、叶中 6 个生物碱量具有较明显差异。经比较, 黄连适宜在移栽后第 4 年采挖, 7~10 月的最佳采挖月份是 10 月。结论 该法简便、准确、分离效果好, 适用于黄连主要生物碱的定量分析。

关键词: 黄连; 药根碱; 小檗碱; 巴马汀; 表小檗碱; 非洲防己碱; 黄连碱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0509-04

Determination of six alkaloids in different parts of *Coptis chinensis* by HPLCPENG Fu^{1,2}, QU Xian-you², ZHONG Guo-yue², ZHANG Bao-xi^{1,2}, WANG Yu², LUO Wei-zao²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China.

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; jateorhizine; berberine; palmatine; epiberberine; columbamine; coptisine

黄连味苦性寒, 具有清热燥湿、泻火解毒之功效^[1]。其须根、剪口、叶柄和叶等可以作为黄连的代用品^[2-3]。黄连的主要成分是生物碱, 本实验采用 HPLC 法对不同采收月份、不同产地黄连叶、须根及根茎中盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的量进行测定, 6 种生物碱量占总生物碱量的 95% 以上, 基本能反映黄连品质的优劣, 对控制黄连的质量、合理采收、确保疗效具有重要意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器

DGU—20A 型岛津液相色谱仪 (LC solutions 色谱系统); KQ250DB 型数控超声波清洗器 (巩义市予华仪器有限责任公司); AUW220D 型电子天平 (日本岛津公司); Anke TGL—16G 型离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸

黄连碱、盐酸表小檗碱、盐酸非洲防己碱对照品均为自制, 质量分数 98% 以上; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯; 黄连药材样品均由重庆市中药研究院生药室分别于 7~10 月份采收自四川省洪雅市, 经瞿显友研究员鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、须根和叶, 见表 1。

2 方法

2.1 色谱条件

Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 A-30 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (每 1 000 mL 碳酸氢铵溶液含 7 mL 氨水及

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	样 品	编号	样 品
1	3 年生单株 (根茎)	6	5 年生单株 (须根)
2	4 年生单株 (根茎)	7	3 年生单株 (叶)
3	5 年生单株 (根茎)	8	4 年生单株 (叶)
4	3 年生单株 (须根)	9	5 年生单株 (叶)
5	4 年生单株 (须根)		

收稿日期: 2011-10-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAI40B03)

作者简介: 彭 福 (1986—), 男, 重庆市璧山县人, 成都中医药大学药学院在读硕士研究生, 主要从事中药化学研究。E-mail: pfooo@sina.com

*通讯作者 罗维早 Tel: (023)89029026 E-mail: loweizao@163.com

1 mL 三乙胺), B-乙腈; 梯度洗脱, 0~15 min, 10% B; 15~25 min, 10%~20% B; 25~45 min, 27%~30% B; 45~50 min, 30%~35% B; 50~55 min, 35%~100% B。体积流量 1 mL/min; 检测波长 270nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L。理论板数按盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰计算均不低于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 6 种对照品适量, 置于 50 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得到各对照品质量浓度分别为 22.2、19.0、65.8、93.4、58.2、281.2 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备^[1]

取药材粉末适量, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-盐酸 (100:1) 的混合液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 离心 (10 000 r/min), 即得。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液适量, 分别稀释 1~7 倍, 得 7 个不同质量浓度的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 对照品进样量为横坐标 (X) 制定标准曲线, 得回归方程及线性范围, 具体见表 2。

表 2 回归方程及线性范围

Table 2 Regression equations and linear range

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / μ g
盐酸药根碱	$Y=4.212 \times 10^4 X+1.214 \times 10^4$	0.999 9	0.003 2~0.022 2
盐酸非洲防己碱	$Y=6.408 \times 10^4 X-5.471 \times 10^3$	0.999 9	0.002 7~0.019 0
盐酸表小檗碱	$Y=3.338 \times 10^4 X-3.263 \times 10^4$	0.999 6	0.009 4~0.065 8
盐酸黄连碱	$Y=3.811 \times 10^4 X-6.566 \times 10^4$	0.999 9	0.013 3~0.093 4
盐酸巴马汀	$Y=4.188 \times 10^4 X-3.481 \times 10^4$	0.999 5	0.008 3~0.058 2
盐酸小檗碱	$Y=3.942 \times 10^4 X-6.651 \times 10^4$	0.999 8	0.040 2~0.281 2

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 连续进样 5 次, 记录 6 种对照品峰面积。计算得盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积 RSD 分别为 0.4%、0.8%、0.8%、0.4%、0.6%、0.3%。

2.6 稳定性试验

取根茎 1 号黄连供试品, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 各进样 1 次, 记录 6 种生物碱峰面积。计算得盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 2.4%、0.8%、1.3%、2.6%、1.4%、2.7%。

2.7 重现性试验

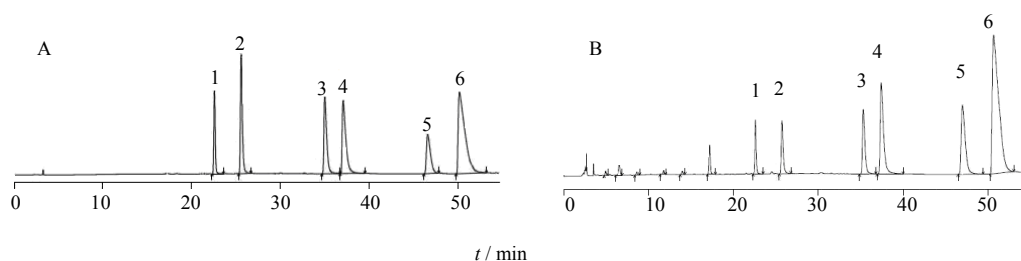
取 1 号黄连根茎供试品, 精密称定 6 份, 按照“2.3”项方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定。盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积 RSD 分别为 1.4%、1.3%、1.3%、1.0%、1.3%、1.8%。

2.8 加样回收率试验^[2]

精密称取盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品各 6.62、10.71、31.04、44.58、38.72、148.78 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 50%乙腈溶解, 定容, 摇匀待用。称取 1 号黄连样品粉末 9 份, 每份 0.1 g, 精密称定, 加入一定量的生物碱混合对照品储备溶液, 按照“2.3”项方法制备后, 按上述色谱条件定量测定。盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱平均回收率分别为 100.07%、99.69%、101.60%、100.56%、102.34、102.63%, RSD 分别为 1.19%、1.90%、0.64%、1.39%、1.48%、1.19%。

2.9 样品测定

分别取 7~10 月份采收的黄连各部位样品, 按照“2.3”项下制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 外标法计算样品中生物碱的量, 混合对照品和样品色谱图见图 1, 样品测定结果见表 3~6。



1-盐酸药根碱 2-盐酸非洲防己碱 3-盐酸表小檗碱 4-盐酸黄连碱 5-盐酸巴马汀 6-盐酸小檗碱
1-jatrorhizine hydrochloride 2-columbamine hydrochloride 3-epiberberine hydrochloride
4-coptisine hydrochloride 5-palmatine hydrochloride 6-berberine hydrochloride

图 1 混合对照品(A)和样品(B)HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and samples (B)

表 3 7 月份采收各年生植株中 6 种对照品的量 (n=3)

Table 3 Contents of six reference substances in plantlets harvested in July of every year (n=3)

编 号	质量分数 / %					
	盐酸药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	0.44	0.44	0.76	2.59	1.38	6.67
2	0.43	0.39	1.25	2.02	1.64	5.89
3	0.51	0.38	0.80	1.87	1.46	5.11
4	0.87	0.08	0.41	1.42	0.18	2.18
5	0.88	0.08	0.90	1.35	0.22	1.77
6	0.88	0.06	0.63	1.13	0.14	1.42
7	0.29	0.09	0.05	0.26	0.14	1.18
8	0.12	0.07	0.04	0.14	0.06	1.39
9	0.11	0.10	0.03	0.11	0.09	1.38

表 4 8 月份采收各年生植株中 6 种对照品的量 (n=3)

Table 4 Contents of six reference substances in plantlets harvested in August of every year (n=3)

编 号	质量分数 / %					
	盐酸药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	0.51	0.37	1.06	2.69	1.68	6.36
2	0.59	0.49	1.41	2.77	1.99	6.11
3	0.50	0.35	1.20	2.66	1.47	6.02
4	0.93	0.05	0.64	1.75	0.18	1.97
5	1.25	0.10	0.86	1.46	0.32	2.29
6	0.94	0.05	1.04	1.62	0.25	1.62
7	0.38	0.05	0.11	0.21	0.16	1.13
8	0.15	0.08	0.03	0.17	0.13	1.41
9	0.14	0.07	0.04	0.16	0.13	1.27

表 5 9 月份采收各年生植株中 6 种对照品的量 (n=3)

Table 5 Contents of six reference substances in plantlets harvested in September of every year (n=3)

编 号	质量分数 / %					
	盐酸药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	0.49	0.44	0.80	2.09	1.33	5.72
2	0.61	0.53	1.17	2.03	1.82	5.96
3	0.61	0.32	1.05	2.20	1.61	6.38
4	0.81	0.06	0.54	1.29	0.16	1.62
5	1.15	0.13	0.76	1.04	0.24	1.74
6	1.12	0.09	0.87	1.50	0.25	1.92
7	0.45	0.12	0.06	0.21	0.17	1.00
8	0.16	0.10	0.04	0.17	0.11	1.54
9	0.25	0.12	0.05	0.20	0.15	1.55

表 6 10 月份采收各年生植株中 6 种对照品的量 ($n=3$)Table 6 Contents of six reference substances in plantlets harvested in October of every year ($n=3$)

编 号	质量分数 / %					
	盐酸药根碱	非洲防己碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱
1	0.52	0.36	0.67	2.19	1.42	5.59
2	0.55	0.48	1.31	2.48	2.05	7.04
3	0.45	0.28	1.17	1.95	1.37	4.98
4	0.90	0.07	0.57	1.47	0.18	1.84
5	0.77	0.07	0.84	1.47	0.23	1.64
6	0.76	0.04	0.80	1.11	0.20	1.40
7	0.54	0.09	0.12	0.40	0.18	1.07
8	0.13	0.07	0.04	0.14	0.11	1.30
9	0.20	0.08	0.07	0.20	0.16	1.61

3 讨论

黄连一般在移栽后 5 年收获, 须根、叶片经干燥去泥沙杂质后, 亦可入药, 残留叶柄及细渣筛净后可作兽药^[4]。因黄连根茎生物碱量最能反映黄连品质, 所以对不同采挖时间的黄连根茎生物碱量进行研究, 结果表明 4 年生单株生物碱量略高于 5 年生单株, 3 年生单株最次, 因此认为黄连宜在其移栽后第 4 年采挖。

已有研究报道^[4]黄连宜在 11 月上旬至降雪前采挖, 《中国药典》2010 年版规定黄连按干燥品计算, 以盐酸小檗碱计, 含小檗碱不得少于 5.5%, 表小檗碱不得少于 0.80%, 黄连碱不得少于 1.6%, 巴马汀不得少于 1.5%^[1], 根据本实验测定, 在 7~10 月份采收的 4 年生黄连均具有较佳品质, 所以认为黄连在 7 月至降雪前均宜采挖, 但 7~10 月份的最佳采挖月份是 10 月。

本研究建立了 HPLC 同时测定黄连不同部位 6 种主要生物碱的方法, 该方法简便、快速、可用于黄连的质量控制。不同部位黄连各生物碱量不同, 从 7~10 月份样品测定结果可知, 除盐酸药根碱外, 其余 5 个生物碱 (盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱) 量在根茎

中均最高; 除盐酸非洲防己碱外, 其余 4 个生物碱在须根中的量均高于叶。从黄连不同部位生物碱量来看, 传统用药部位 (根茎) 是黄连药用化学成分富集的主要部位, 但非传统用药部位 (须根、叶) 也含有一定量的药用化学成分, 须根中盐酸药根碱的含量甚至超过了根茎, 而其盐酸小檗碱的量甚至达到或超过一些小檗属植物根的量^[5]。因此建议利用黄连根茎的同时, 也要积极开发利用其非传统药用部位, 通过提取其生物碱减少资源的浪费, 实现黄连药材资源的可持续发展。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 方忻平, 王天志, 张 浩, 等. 黄连属植物根、根及叶生物碱的研究 [J]. 中药材, 1989, 12(3): 33-35.
- [3] 纪丽莎, 张先福, 喻卫武, 等. 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 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 285-287.
- [4] 宫 涛, 魏盼盼, 张正海. 黄连规范化栽培方法 [J]. 药用植物, 2009, 12(11): 37-39.
- [5] 张金渝, 王 波, 金 航, 等. 云南黄连不同部位有效成分及生物量的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 311-313.