中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

RP-HPLC测定不同产地黄连中 6种生物碱的含量

耿志鹏[1], 郑海杰[1], 张艺[1*], 罗维早[2], 瞿显友[2]
(1. 成都中医药大学 民族医药学院, 四川 成都 611137;
2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC同时测定黄连中药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀及小檗碱等 6种生物碱含量的方法。方法: XtimateTM C_{18}色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-30 mmol·L^{-1}碳酸氢铵水溶液 (含有 0.7% 氨水、0.1% 三乙胺), 线性梯度洗脱; 检测波长 270 nm; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL·min^{-1}。结果: 6种生物碱分别在 0.85~16.96 (r = 0.999 7), 1.25~24.96 (r = 0.999 5), 2.05~40.96 (r = 0.999 9), 3.65~72.96 (r = 0.999 9), 2.88~57.60 (r = 0.999 8), 13.25~264.96 mg·L^{-1} (r = 0.999 6)具有良好的线性; 平均加样回收率 (n = 6)依次为 101.6% (RSD 1.3%), 102.5% (RSD 1.5%), 100.8% (RSD 1.9%), 102.6% (RSD 1.2%), 97.80% (RSD 1.3%), 99.01% (RSD 1.5%)。不同产地黄连中 6种被测生物碱及总生物碱存在显著的差异。结论: 该方法准确、可靠, 重复性好, 可用于同时测定黄连中药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀及小檗碱的含量。

[关键词] 黄连; 药根碱; 非洲防己碱; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱; RP-HPLC

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch., 三角叶黄连 *C. deltoidea* C.Y.Cheng et Hsiao, 云南黄连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎。药材依次习称"味连"、"雅连"、"云连"[1]。黄连的主要有效成分为生物碱类化合物[2], 其中小檗碱 (berberine)含量最高, 此外还有表小檗碱 (epiberberine)、黄连碱 (coptisine)、巴马汀 (palmatine)、非洲防己碱 (columbamine)、药根碱 (gatrorhizine)、木兰花碱 (magnoflorine)等生物碱, 因此建立能全面准确的测定黄连中生物碱成分的方法, 对于其质量控制具有重要的意义。

黄连中生物碱的含量测定方法有薄层扫描法[3]、紫外分光光度法[4]、高效液相色谱法及超高效液相色谱法[5]等。薄层扫描法准确性较差, 紫外分光光度法仅能测定总生物碱含量, 所以高效液相色谱法是常用的方法, 但是 HPLC测定黄连生物碱, 仅测定了其中的 4~5种生物碱[6-8], 而对其中的 6种生物碱同时进行测定则少见报道。本研究建立了黄连中 6种生物碱同时测定的 HPLC方法, 并对不同产地的黄连进行了含量测定。

1 仪器与试药

岛津 LC-10 ATvp高效液相色谱仪, SPD-10 Avp紫外检测器; N2000色谱数据工作站。CQ-250型超声波清洗器 (上海必能信公司), BP211D电子天平 (德国 Sartorius)。

盐酸药根碱 (批号 0733-20005)、盐酸巴马汀 (批号 110732-200506)、盐酸小檗碱对照品 (批号 110713-200609)购自中国药品生物制品检定所, 盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱对照品由重庆中药研究院提供, 纯度 > 98%; 乙腈 (色谱纯, Fisher公司), 水为乐百氏纯净水, 其他试剂均为分析纯。

收集了不同产地味连样品 22批、四川峨眉雅连 1批、云南福贡的云连 1批。经成都中医药大学民族医药学院张艺研究员鉴定, 分别为毛茛科植物黄连 *C. chinensis*, 三角叶黄连 *C. deltoidea*, 云南黄连 *C. teeta*的干燥根茎。

2 方法与结果

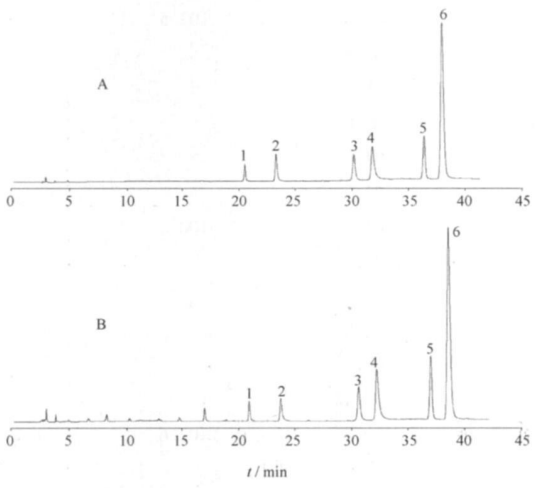
2.1 色谱条件 XtimateTM C_{18}色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A相 30 mmol·L^{-1}碳酸氢铵水溶液 (含有 0.7% 氨水、0.1% 三乙胺); B相乙腈, 线性梯度洗脱程序为 0~15 min, 10% ~ 25% B; 15~25 min, 25% ~ 30% B; 25~40 min, 30% ~ 45% B; 流速 1 mL·min^{-1}; 检测波长 270 nm; 柱温 30 ℃;

[稿件编号] 20091104006
[基金项目] 国家"十一五"科技支撑计划项目 (2007BA I40B05; 2007BA I40B03)
[通信作者] * 张艺, 研究员, 博士生导师, Tel: (028) 61800274, E-mail: 9006zmy@sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进样量 10 μL。

在上述色谱条件下,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、盐酸小檗碱理论塔板数均不低于 1万。分离度及拖尾因子均符合含量测定要求。对照品及样品(峨眉地区味连)HPLC图见图 1。



1.药根碱; 2.非洲防己碱; 3.表小檗碱; 4.黄连碱; 5.巴马汀; 6.小檗碱。

图 1 对照品(A)和黄连样品(峨眉地区味连)(B)的 HPLC图

2.2 对照品溶液的制备 分别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、盐酸小檗碱适量,分别置于 10, 10, 50, 25, 25, 25 mL量瓶中,以盐酸甲醇(1∶100)溶解并稀释至刻度,得质量浓度依次为 1 060, 1 040, 256, 456, 480, 552 mg·L^{-1}的各对照品储备液。

分别吸取上述对照品储备液盐酸药根碱 0.4 mL、盐酸非洲防己碱 0.6 mL、盐酸表小檗碱 4 mL、盐酸黄连碱 4 mL、盐酸巴马汀 3 mL、盐酸小檗碱 12 mL于 25 mL量瓶中,以盐酸甲醇(1∶100)定容至刻度,作为混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取黄连粉末样品(过 100目筛)约 0.1 g精密称定,置 150 mL锥形瓶中,精密加入盐酸甲醇(1∶100) 50 mL,称定质量,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,盐酸甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密量取混合贮备液 0.5, 1.0, 2.5, 5 mL置 10 mL量瓶中,加盐酸甲醇(1∶100)稀释至刻度,即得不同浓度的系列混合对照品,分别精密吸取混合对照品储备液及上述混合对照品溶液各 10 μL,按上述色谱条件进行测定,以峰面积积分值(Y)对各生物碱浓度(mg·L^{-1})(X)进行线性回归绘制标准曲线。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、盐酸小檗碱的回归方程分别为 $Y = 31\ 600X + 2\ 991.4$($r = 0.999\ 7$); $Y = 51\ 488X - 512.68$($r = 0.999\ 5$); $Y = 36\ 771X - 5\ 737.6$($r = 0.999\ 9$); $Y = 30\ 087X - 1\ 542.1$($r = 0.999\ 9$); $Y = 36\ 205X + 10\ 319$($r = 0.999\ 8$); $Y = 37\ 765X + 80\ 246$($r = 0.999\ 6$)。结果表明盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱分别在 0.85~16.96, 1.25~24.96, 2.05~40.96, 3.65~72.96, 2.88~57.60, 13.25~264.96 mg·L^{-1}线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,在上述色谱条件下重复进样 5次,记录各自峰面积。结果盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的 RSD分别为 1.1%, 0.96%, 0.53%, 1.8%, 0.61%, 0.61%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放置,分别在 0, 2, 4, 8, 12 h进样分析,结果,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、盐酸小檗碱的 RSD分别为 1.0%, 1.3%, 1.2%, 1.3%, 1.8%, 1.4%。表明供试品溶液在 12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 同一味连样品(峨眉地区),按 **2.3**项下方法平行制备 6份供试品溶液,在上述色谱条件下进行分析,计算含量。结果,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、盐酸小檗碱的 RSD分别为 1.3%, 1.1%, 1.3%, 0.83%, 1.6%, 1.2%,重复性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的味连样品(峨眉地区)粉末 6份,每份 0.05 g精密称定,分别精密加入对照品适量,按 **2.3**项下方法制成供试品溶液,进行分析,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、盐酸小檗碱的回收率结果见表 1。

2.9 含量测定 分别称取各产地味连及雅连与云

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 6种成分的加样回收率 (n = 6)

化合物	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
盐酸药根碱	0.236	0.233	0.472	101.3	101.6	1.3
	0.234	0.233	0.466	99.57		
	0.237	0.233	0.474	101.7		
	0.234	0.233	0.469	100.9		
	0.235	0.233	0.474	102.6		
	0.239	0.233	0.480	103.4		
盐酸非洲防己碱	0.257	0.250	0.509	100.8	102.5	1.5
	0.253	0.250	0.512	103.6		
	0.258	0.250	0.512	101.6		
	0.254	0.250	0.514	104.0		
	0.255	0.250	0.515	104.0		
	0.260	0.250	0.513	101.2		
盐酸表小檗碱	0.614	0.614	1.236	101.3	100.8	1.9
	0.606	0.614	1.236	102.6		
	0.616	0.614	1.235	100.8		
	0.608	0.614	1.239	102.8		
	0.609	0.614	1.223	100.0		
	0.621	0.614	1.220	97.56		
盐酸黄连碱	1.389	1.404	2.797	100.3	102.6	1.2
	1.373	1.404	2.816	102.8		
	1.395	1.404	2.838	102.8		
	1.376	1.404	2.825	103.2		
	1.378	1.404	2.838	104.0		
	1.406	1.404	2.850	102.8		
盐酸巴马汀	0.978	0.960	1.903	96.35	97.80	1.3
	0.966	0.960	1.906	97.92		
	0.982	0.960	1.925	98.23		
	0.968	0.960	1.892	96.25		
	0.970	0.960	1.922	99.17		
	0.989	0.960	1.938	98.85		
盐酸小檗碱	3.856	3.828	7.568	96.97	99.01	1.5
	3.810	3.828	7.612	99.32		
	3.871	3.828	7.618	97.88		
	3.818	3.828	7.699	101.4		
	3.826	3.828	7.623	99.19		
	3.902	3.828	7.703	99.29		

连样品粉末约 0.1 g 精密称定,按 **2.3**项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行分析,采用外标法以峰面积计算盐酸药根碱、盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量,见表 2。

3 讨论

目前运用 HPLC 对黄连的生物碱进行含量测定,流动相多采用 SDS 离子对配以磷酸二氢钾系统,或者单独的运用磷酸二氢钾或磷酸二氢钠,最多只能测定其中的 5种生物碱含量,而且分离度不是很好。本方法可以同时测定其中 6种生物碱含量,而且分离度良好,方法简便、准确,可用于黄连药材及其制剂中生物碱的全面考察。

本方法比较了 220, 270, 320, 356 nm 的检测波长,结果 270 nm 下基线稳定,各峰的丰度较高,且各测定成分的含量变化和峰面积响应以及线性都较

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

表 2 不同产地黄连样品中 6种生物碱的质量分数 ($n = 3$) mg·g^{-1}

No.	产地	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	总生物碱
1	重庆石柱县黄水镇中坪	4.760	5.540	15.29	35.36	19.70	84.76	165.4
2	重庆石柱县黄水镇枫木乡	4.770	5.007	13.83	28.95	18.48	81.31	152.4
3	重庆石柱县黄水镇楠木乡	4.590	6.340	15.64	30.94	20.70	80.57	158.8
4	重庆石柱县沙子镇	3.650	5.970	13.51	26.28	16.21	67.22	132.8
5	重庆南川市金佛山	4.950	4.610	11.56	30.20	16.54	77.02	124.0
6	重庆开县满月乡	3.950	5.210	10.08	22.88	15.98	57.77	115.9
7	湖北利川市建南镇	5.880	6.240	14.89	31.21	19.52	84.56	162.3
8	湖北利川市福宝山林场	4.500	5.870	13.05	29.53	19.31	76.66	148.9
9	湖北恩施市新塘乡	4.480	5.430	12.85	30.47	17.58	77.67	148.5
10	湖北十堰竹溪县丰溪乡	3.900	5.490	13.31	24.22	19.31	82.52	148.8
11	四川彭州市白鹿镇	5.240	6.340	15.43	27.74	22.55	91.95	169.3
12	四川彭州市小渔洞镇	5.310	5.830	14.53	24.96	20.50	72.40	143.6
13	四川洪雅县高庙镇	3.940	5.070	10.44	26.84	16.17	67.12	129.6
14	四川峨眉市龙池镇	4.310	6.070	13.07	26.08	19.71	68.30	137.5
15	四川峨眉市黄湾乡	4.850	5.870	15.18	25.63	18.94	74.81	145.3
16	四川峨眉市大为镇	4.070	6.210	12.51	27.20	19.23	76.21	145.4
17	四川峨眉市沙湾区	3.940	5.320	13.48	26.63	17.86	73.22	140.5
18	四川大邑县斜源镇	5.650	6.130	15.03	32.25	20.81	86.12	166.0
19	四川崇州市鸡冠山乡	4.630	7.470	16.82	35.47	25.51	102.40	192.3
20	四川邛崃市南宝乡	5.990	6.780	17.28	37.31	23.54	98.73	189.6
21	陕西省镇坪县上竹乡	4.050	6.420	12.38	26.99	19.44	80.17	149.4
22	湖南龙山县大安乡药场	5.050	5.570	12.76	27.76	19.00	82.44	152.6
23	四川峨眉市(雅连)	10.840	2.160	3.16	18.55	6.35	46.22	87.3
24	云南福贡县(云连)	6.580	3.000	2.80	15.32	9.58	69.36	106.6

好。在供试品溶液制备过程中,分别对提取方式(回流、超声)、提取溶剂(甲醇、乙醇、盐酸-甲醇)及用量、提取时间进行了考察,结果表明用 50 mL盐酸-甲醇(1∶100)超声提取 30 min为最佳提取条件。

采用本研究所建立的方法,对收集于重庆、湖北、四川、陕西及湖南等黄连产区的味连中 6种生物碱含量测定结果表明,不同产地的味连中各生物碱及总生物碱的含量存在显著差异,且味连与雅连、云连的成分含量差异显著。由于药材产地的生长环境及加工方法影响其化学成分,所以药材的品质和产地有着重要的关系。通过对不同产地的黄连样品进行更深入的化学分析,可以为完善黄连的质量控制提供依据,而且可以从化学成分方面揭示道地产区黄连的道地性。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 213.
[2] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2006, 9(5): 469.
[3] 叶玉兰, 赵苹苹, 罗泽澜. 黄连及其炮制品中 5种生物碱含量测定[J]. 中成药, 1996, 18(9): 16.
[4] 朱强, 王有为, 齐海涛, 等. 不同品系黄连产量和质量的研究[J]. 中草药, 2006, 37(12): 1866.
[5] Kong W J, Zhao Y L, Xiao X H, et al. Spectrum-effect relationships between ultra performance liquid chromatography fingerprints and anti-bacterial activities of Rhizoma Coptidis[J]. Anal Chim Acta, 2009, 634: 279.
[6] 向莉, 李盾. HPLC法研究黄连中表小檗碱等五种生物碱的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(1): 46.
[7] 袁久荣, 魏英勤, 袁浩, 等. RP-HPLC法同时测定黄连中四种原小檗碱型生物碱的含量[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(6): 36.
[8] 晁若冰, 张浩, 庄燕黎, 等. 高效液相色谱法测定黄连药材中小檗碱型生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 354.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

Simultaneous determination of six alkaloids in *Coptis chinensis* of different regions by RP-HPLC

GENG Zhipeng[1], ZHENG Haijie[1], ZHANG Yi[1*], LUO Weizao[2], QU Xianyou[2]
(1. *College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 611137, *China*;
2. *Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing* 400065, *China*)

[Abstract] A reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of gatrorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, palmatine and berberine in *Coptis chinensis* was developed. Analysis was carried out on an Xtimate^{TM} C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile-30 mmol·L^{-1} ammonium bicarbonate solution (including 0.7% ammonia and 0.1% triethylamine) by gradient elution. The detective wavelength was 270 nm, the column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. By the above method, the linear ranges of gatrorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, palmatine and berberine were 0.85-16.96 (r = 0.999 7), 1.25-24.96 (r = 0.999 5), 2.05-40.96 (r = 0.999 9), 3.65-72.96 (r = 0.999 9), 2.88-57.60 (r = 0.999 8), 13.25-264.96 mg·L^{-1} (r = 0.999 6), respectively. The average recoveries (n = 6) of the six alkaloids were 101.6% (RSD 1.3%), 102.5% (RSD 1.5%), 100.8% (RSD 1.9%), 102.6% (RSD 1.2%), 97.80% (RSD 1.3%), 99.01% (RSD 1.5%), respectively. The determined results demonstrate that there is a significant difference in the contents of six alkaloids and total alkaloids among the tested samples. The method is accurate, reliable and repeatable for simultaneous determination of gatrorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, palmatine and berberine in *C. chinensis*.

[Keywords] *Coptis chinensis*; gatrorrhizine; columbamine; epiberberine; coptisine; palmatine; berberine; RP-HPLC

doi: 10.4268/cjcmm20101917

[责任编辑 王亚君]

本刊近况简介

国外数据库收录

美国 SciFinder数据库:医学索引 Medline;《化学文摘》(CA);

荷兰 Elsevier公司 Scopus数据库;《国际药学文摘》(IPA);《毒物学文摘》(ToxFile);俄罗斯《文摘杂志》(AJ);波兰《哥白尼索引》(IC);WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)等。

国内数据库收录

"中国科学引文数据库"来源期刊;"中国学术期刊综合评价数据库"来源期刊;中国自然科学核心期刊;中国中文核心期刊;中国科技核心期刊;《中国学术期刊文摘》中、英文版。

主要引证数据或数据库统计结果据中国知网(CNKI)的统计结果,《中国中药杂志》国内外机构用户达到 2 836余个,分布 17个国家和地区;个人读者分布在 32个国家和地区。据中国科学技术信息研究所分析研究中心发布的中国科技期刊核心版引证报告(2008):《中国中药杂志》总被引频次为 4 943,影响因子 0.701,基金论文比 0.59,综合评价总分 80.3,全年发表文章达 900余篇。综合排名在药学类期刊中居第一位。各项指标在我国药学以及中医药学等学科领域科技期刊中均名列前茅。

荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊。历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖。中国科学技术协会精品项目工程 B类资助。2008年中国百种杰出学术期刊。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net