

RP-HPLC 同时测定黄连及酒黄连中 3 种生物碱的含量

★ 龚千锋* 杨金梅 郑晗 (江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:建立高效液相色谱法测定黄连及经过不同酒制方式后黄连中生物碱含量的方法。方法:色谱柱为 C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈:0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (28:72), 磷酸二氢钾用磷酸调 pH 为 3.0, 检测波长为 345 nm。结果:在以上色谱条件下, 小檗碱、巴马汀、和药根碱分离效果好。结论:方法灵敏度高, 重现性好, 可用于黄连等含小檗碱型生物碱中药材及制剂的质量控制。

关键词:反相高效液相色谱法; 黄连; 酒黄连; 生物碱; 含量测定

中图分类号: R 284.1 文献标识码: A

Determination of the Alkaloids in Differently Processed Coptis Chinensis Franch by RP-HPLC

GONG Qian-feng, YANG Jin-Mei, ZHENG Han

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To establish a HPLC method for separation and determination of the alkaloids in differently processed Coptis chinensis Franch. Methods: HPLC system consisted of C_{18} column (4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μ m), mobile phase was composed of acetonitrile solution of potassium phosphate (0.05 mol/L, 28:72, adjusting pH value with phosphoric acid to 3.0), and the detection wavelength was 345 nm. Results: Three kinds of berberine-type alkaloids which are jatrorrhizine, epiberberine and berberine could be separated completely. Conclusion: HPLC is of high sensitivity and good reproducibility. It can be used for quality control of drug and Chinese crude drug containing alkaloids.

Key words: RP-HPLC; processed Coptis chinensis Franch; alkaloids; assay

酒黄连有酒炒、酒蒸、酒煮、酒洗等不同, 在《银海精微》、《珍珠囊》、《普济方》、《本草求真》、《得配本草》等书中有记载。酒制升提, 用酒炮制黄连, 能使黄连长于上行, 清上焦热邪。但由于酒制方式不同, 作用也有所区别: (1) 酒炒长于清上焦热, 如《医宗粹言》谓: “酒炒去头目之火”。 (2) 酒蒸长于治消渴, 如《本草求真》谓“治消渴, 用酒蒸黄连”。 (3) 酒煮长于治伏暑, 如《本草求真》谓“治伏暑, 用酒煮黄连”等。此外, 酒制黄连还可缓和黄连的苦寒之性^[1]。不同酒制方式, 功效何以有别, 本文对不同酒制方式黄连中 3 种主要生物碱的含量作了对比研

究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Dionex UltiMate3000 液相色谱仪, PDA-3000 二极管阵列紫外检测, Chromeleon 工作站, KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), METTLER AE 240 型十万分之一电子天平(瑞士 METTLER), Sartorius 万分之一电子天平(德国赛多利斯), Rayn-ger ST 型红外测温仪(美国 Raytek), RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), SHZ-D(Ⅲ) 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)。

* 作者简介: 龚千锋(1952-), 男(汉族), 江西南昌人, 现任江西中医学院中药系教授, 博士生导师, 学士学位, 主要从事中药研究工作。

1.2 试药

黄连(购于樟树药材市场,经本院中药鉴定教研室刘庆华老师鉴定为毛茛科植物味连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根)。对照品:盐酸小檗碱(Berberine hydrochloride)、盐酸巴马亭(Palmatine-hydrochloride)、盐酸药根碱(Jatrorrhizine hydrochloride)均购自为中国药品生物制品检定所。黄酒(绍兴县东江有限公司,供实验使用);甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材的炮制及溶液的制备

2.1.1 生黄连 取原药材,去除杂质,润透后切成片,晾干^[2]。

2.1.2 酒黄连的炮制 (1)酒炒黄连:取净切片黄连,酒炙法炒干,每 1 kg 黄连用黄酒 0.125 kg^[2]。(2)酒煮黄连 取净制黄连,大小分档,加黄酒适量,黄酒淹过药面,煮至酒被吸尽,取出,晾干。(3)酒蒸黄连 取净制黄连适量,大小分档,置笼屉内,用黄酒蒸制 1.5 h,取出,晾干。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱对照品 13.32、3.10、4.99 mg,分别置 50 ml 容量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)溶解并稀释至刻度,作为标准储备液,分别精密吸取标准储备液各 15 ml,置同一 50 ml 容量瓶中,稀释至刻度,做为混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取生黄连及黄连的不同酒制品粉末约 1.0 g(过三号筛),置于具塞锥形瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)50 ml,称定重量,静置 30 min 后,连接冷凝管,加热至沸腾,并保持微沸 1 h,再超声 30 min,放冷,用混合溶剂补足减失的重量,摇匀,备用。

取上提取液 2 ml,置于 25 ml 容量瓶中,加入混合溶剂定容,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(28:72) 磷酸调节 pH 为 3.0; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 345 nm; 柱温: 30 °C; 理论塔板数按盐酸小檗碱峰计算不低于 5 000。

2.3 主要化学成分含量测定

2.3.1 线性关系 精密吸取上述混合对照品溶液 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μl 依次注入液相色谱仪,进行分析见图 1,并以进样量为横坐标(X),3

次测得的峰面积均值为纵坐标(Y),峰面积对相应进样量进行线性回归计算,得盐酸小檗碱、盐酸巴马亭及盐酸药根碱的回归方程分别为:

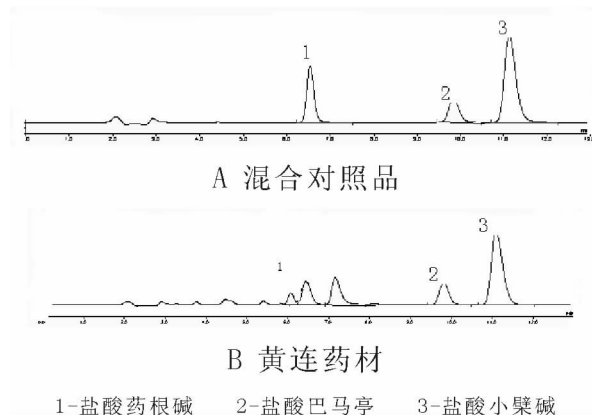


图 1 高效液相色谱图

$$Y = 64.834X + 0.193, r = 1$$

$$Y = 67.168X - 0.0097, r = 0.9999$$

$$Y = 68.71X + 0.0863, r = 0.9994$$

其结果分别表明在 0.07992 ~ 1.998、0.0186 ~ 0.465、0.02994 ~ 0.7485 μg 范围内进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密吸取生黄连供试品溶液 10 μl,连续进样 5 次,测定各组分的峰面积值,计算得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱峰面积的 RSD 分别为 0.42%、0.10%、0.17%。

2.3.3 重复性试验 取生黄连细粉,按 2.1.4 项下制备供试品溶液方法平行制备 5 份供试液,在上述色谱条件下进行含量测定。计算得 5 份样品中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱含量的 RSD 分别为 0.28%、0.16%、0.19%,结果表明重现性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取生黄连供试品溶液 10 μl,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样,测定各组分的峰面积值,计算得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱峰面积的 RSD 分别为 0.99%、0.89%、0.92%,结果表明,供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.5 加样回收试验 分别取 5 份已知 3 种生物碱含量的黄连药材各约 30 mg,精密称定,分别精密加入对照品溶液(含盐酸小檗碱 2.04 mg,盐酸巴马亭 0.52 mg,盐酸药根碱 0.16 mg),按供试液制备和含量测定方法操作,结果该法测定黄连药材中的小檗碱、巴马亭、药根碱,回收率分别为 98.1% (RSD 为 0.44%) (n=5)、98.0% (RSD 为 0.6%) (n=5)、99.9% (RSD 为 0.75%) (n=5)。

2.3.6 样品含量测定 按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,测定不同酒制方式所得的样品,结

气相色谱法测定葡萄内酯中的溶剂残留^{*}

★ 黎艳刚 张普照 陈海芳 王发英 魏玲 涂明珠 杨武亮^{**} (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

摘要:目的:建立葡萄内酯中3种有机溶剂残留测定方法。方法:采用毛细管气相色谱法,FID检测器,应用DM-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),载气为氮气,柱温采取程序升温,初始温度40℃,保持4 min,然后以40℃/min升至200℃,保持1 min,测定葡萄内酯中丙酮、甲醇和吡啶的残留量。结果:被测组分均能得到有效分离,在所考察的浓度范围内线性关系良好, $r=0.9995\sim0.9999$,平均回收率为96.25%~99.58%。结论:本方法灵敏、准确、可靠,可用于葡萄内酯中有机溶剂的检测。

关键词:气相色谱法;葡萄内酯;残留溶剂

中图分类号:R 927.2 **文献标识码:**A

果见表1。

表1 黄连及其酒制品的含量测定($n=3$,%)

样品	盐酸小檗碱	盐酸药根碱	盐酸巴马亭	总碱
生黄连	6.75	0.53	1.72	9.00
酒炒黄连	7.74	0.55	1.90	10.19
酒蒸黄连	8.03	0.76	1.99	10.78
酒煮黄连	6.43	0.49	1.57	8.44

由表1可见,黄连生品中3种生物碱含量较酒炒,酒蒸低,但比酒煮的高,表明不同酒制方式对其含量有所影响。

3 讨论

(1)提取工艺的考察。在提取工艺的考察试验中,选择了盐酸-甲醇超声提取法、盐酸-甲醇回流法、盐酸-甲醇回流超声法、盐酸-水回流提取法,测定结果表明盐酸-甲醇回流超声法提取法的提取效果最好,且过程简便、提取时间短,重现性好,故在实验中选择盐酸-甲醇回流超声法提取。

(2)检测波长的选择。采用全波长扫描发现盐酸小檗碱、盐酸巴马亭和盐酸药根碱这3种生物碱在345 nm附近都有最大吸收,因此选择345 nm为检测波长。

(3)流动相的选择。实验比较了流动相乙腈:0.1%磷酸=28:72、乙腈:0.1%磷酸(含0.1%三乙胺)=25:75以及乙腈:0.05 mol/L磷酸二氢钾(用磷酸调pH3.0)=28:72,结果显示第一种流动相所

得待检色谱峰有严重拖尾现象,影响色谱峰的分离;第二种流动相所得色谱峰峰形对称性不好,且药根碱不能与其他成分完全分开;第三种流动相所得色谱峰峰形对称性及分离度均符合要求,其保留时间也符合分析要求,故选择乙腈:0.05 mol/L磷酸二氢钾(用磷酸调pH至3.0)=28:72,为本实验流动相。

(4)柱温的影响。30℃时测定的结果较好,温度过低,流动相易析出絮状物,对仪器有损。

(5)研究结果表明,黄连经不同酒制方式炮制后3种生物碱含量有不同程度的变化,其中酒炒和酒蒸后含量均比生品的高,而酒煮后比生品低,酒制黄连能使成分溶出更有利,但酒煮在高温条件下,可能有部分生物碱溶解在酒里随蒸气而损失掉,要根据临床实际需要来选择不同的炮制方式,更好地为临床服务。

(6)通过本试验,建立了黄连药材及其酒制品简便快速准确的含量测定方法,方法的建立将为今后黄连炮制机理的研究以及黄连饮片质量标准化奠定基础。

参考文献

- [1]郑虎占. 中药饮片应用标准化研究[M]. 北京:学苑出版社, 2004,1:110.
- [2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:21.

(收稿日期:2008-12-03)

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(30660230)

^{**} 通讯作者:杨武亮,男,Tel:0791-7118657,E-mail:yangwuliang@163.com