



RP-HPLC 法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、 巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究

张倩^{1,2}, 蔡丽芬^{1,2}, 钟国跃^{1*}, 罗维早¹

(1. 重庆市中药研究院 濒危药材繁育国家工程实验室, 重庆 400065;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:建立 HPLC 法在相同色谱条件下同时测定关黄柏中小檗碱、巴马汀、药根碱和黄柏酮的含量。方法:采用 RP-HPLC 法梯度洗脱。Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);检测波长 345 nm(检测小檗碱、药根碱、巴马汀)、210 nm(检测黄柏酮);流速 1 mL · min⁻¹;柱温 25 °C。结果:在一定范围内,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱和黄柏酮峰面积积分值 Y 与进样量 X 线性关系良好,加样回收率分别为 98.94%, 101.17%, 96.22%, 98.90%, 具有较好的精密度、重复性和稳定性。同时对关黄柏药材市场品进行了含量测定。结论:该方法用于测定黄柏药材中小檗碱、巴马汀、药根碱和黄柏酮的含量操作简便、准确、重复性好。

[关键词] 高效液相色谱法;关黄柏;小檗碱;药根碱;巴马汀;黄柏酮;质量标准

“黄柏”为常用中药材,具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功效,中医临床传统使用的“黄柏”包括“关黄柏”和“川黄柏”两个品种,关黄柏原植物为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr., 川黄柏为同属的黄皮树 *P. chinense* Schneid., 均使用其干燥树皮^[1]。2005 年版前药典一直将关黄柏和川黄柏归同作“黄柏”收载,至 2005 年版药典,始根据两者在成分含量和组成上的差异而将关黄柏从黄柏中分出单列,在[含量测定]项下分别规定了各自小檗碱的含量限量,即以盐酸小檗碱计关黄柏不得少于 0.60%、黄柏(川黄柏)不得低于 3.0%,但功能主治、用法用量均相同^[1],临床实际使用上也无区别。小檗碱虽系黄柏中的活性成分之一,但在黄连及小檗属、十大功劳属等多种植物中均含有,同时关黄柏及黄柏(川黄柏)中还含有药根碱、巴马汀、黄柏酮、黄柏内酯等其他活性成分^[2-4],对于黄柏类药材的质量标准仅规定小檗碱的含量限量,显然专属性和客观性都不足。适应中医复方用药、中药临床疗效物质基础复杂的特点,多种形式的指纹图谱、

活性相关多成分指标检测等已成为中药质量标准的发展趋势。为客观地评价和控制黄柏类药材的质量,建立其多成分含量限量的质量标准,本文在参考文献[5-7]的基础上,以关黄柏为对象,研究建立了在同一色谱条件下测定关黄柏中小檗碱、巴马汀、药根碱和黄柏酮等 4 种成分的方法,并对 12 批关黄柏药材市场品进行了质量评价。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 液相色谱仪、Sartorius BT 224S 电子天平、舒美 KQ-250 型超声波清洗器;盐酸小檗碱(批号 110713-200609)、盐酸药根碱(批号 110732-200506)、盐酸巴马汀对照品(批号 0733-200005),均购自中国药品生物制品检定所,黄柏酮对照品(批号 071225)购自上海融和医药科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为超纯去离子水,其余试剂均为分析纯。

关黄柏药材样品共 12 批,由重庆市中药研究院生药室采集,经秦松云副研究员鉴定其原植物为黄檗 *P. amurense*。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex Gemini C₁₈ 保护柱(3.0 mm × 4.0 mm);流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1% 磷酸水(每升含 0.02 mol 磷酸二氢钠),洗脱程序见表 1;柱温 25 °C;检测波长 345 nm(用于检测小檗碱、药根碱、巴马汀)、210 nm(用于检测黄

[稿件编号] 20091107002

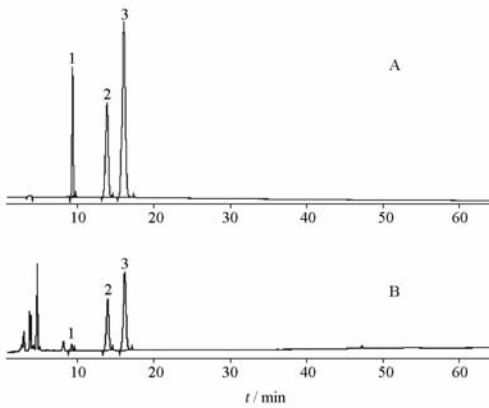
[基金项目] 《中国药典》2010 版一部标准研究项目(YS-258, 259, 260, 261)

[通信作者] * 钟国跃, 研究员, 主要从事中药资源、质量标准及民族药研究, Tel: (023) 89099001, E-mail: zgy001@yahoo.cn

柏酮);流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 色谱图见图 1~2。

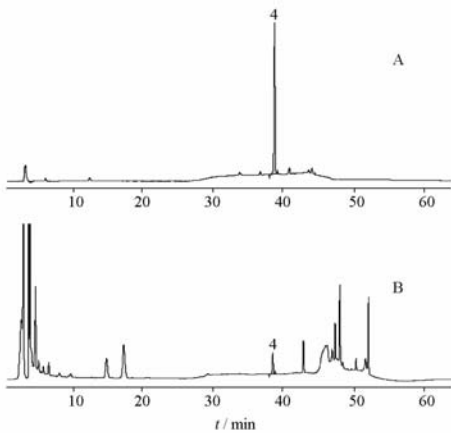
表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	25	75
20	25	75
40	65	35
45	90	10
50	90	10
65	25	75



A 对照品; B. 样品; 1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸小檗碱。

图 1 对照品及关黄柏样品色谱图(345 nm)



A. 对照品; B. 样品; 4. 黄柏酮(纯度 96%)。

图 2 黄柏酮对照品和关黄柏样品色谱图(210 nm)

2.2 对照品储备液的制备 精密称取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、黄柏酮对照品适量,加甲醇溶解并定容,分别制成 $0.88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸小檗碱、 $0.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸药根碱、 $0.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸巴马汀、 $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄柏酮对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取干燥关黄柏样品粉末(过 3 号筛)约 0.2 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加入 40 mL 60% 乙醇溶液,超声处理 45 min,冷却,60% 乙醇定容至刻度,摇匀静置,过滤,取续滤液过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密移取盐酸药根碱储备液,甲醇稀释至 1.9×10^{-4} , 3.8×10^{-4} , 7.6×10^{-4} , 1.9×10^{-3} , 3.8×10^{-3} , $7.6 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液;精密移取盐酸巴马汀储备液稀释至 2.0×10^{-5} , 2.0×10^{-4} , 2.0×10^{-3} , 2.0×10^{-2} , 4.0×10^{-2} , $8.0 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液;精密移取盐酸小檗碱储备液稀释至 5.5×10^{-3} , 5.5×10^{-2} , 0.11 , 0.22 , 0.44 , $0.88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液;精密移取黄柏酮储备液稀释至 7.5×10^{-4} , 3.75×10^{-3} , 7.5×10^{-3} , 1.5×10^{-2} , 3.0×10^{-2} , $6.0 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液;以上系列标准溶液在 2.1 项色谱条件下进样 $10 \mu\text{L}$,以峰面积积分值为纵坐标,进样量 (μg) 为横坐标制作标准曲线,回归方程及线性范围见表 2。

表 2 4 种对照品的回归方程、相关系数及线性范围

对照品	回归方程	r	线性范围/ μg
盐酸小檗碱	$Y = 4.0 \times 10^6 X + 87\ 871$	0.999 8	$5.5 \times 10^{-2} \sim 8.8$
盐酸药根碱	$Y = 5.0 \times 10^6 X - 38$	0.999 9	$1.9 \times 10^{-3} \sim 7.6 \times 10^{-2}$
盐酸巴马汀	$Y = 5.0 \times 10^6 X - 2\ 952$	0.999 9	$2.0 \times 10^{-4} \sim 0.8$
黄柏酮	$Y = 8.4 \times 10^5 X + 1\ 697$	0.999 9	$7.5 \times 10^{-3} \sim 0.6$

2.5 精密度试验 分别精密移取稀释后的盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、黄柏酮对照品储备液适量,在 2.1 项色谱条件下进样 $10 \mu\text{L}$,重复进样 5 次。盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱及黄柏酮峰面积积分值的 RSD 分别为 0.35%, 0.30%, 0.42%, 0.20%。

2.6 重复性试验 取 5 份同批次黄柏样品粉末 0.2 g,精密称定,照 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进样 $10 \mu\text{L}$ 测定。盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱及黄柏酮峰面积积分值的 RSD 分别为 1.5%, 0.17%, 0.56%, 1.5%。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制样后 0, 2, 6, 12, 24 h 在 2.1 项条件下进样 $10 \mu\text{L}$ 测定,盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱及黄柏酮峰面积积分值的 RSD 分别为 1.6%, 0.99%, 0.80%, 0.59%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。



2.8 加样回收率试验 分别取已知含量的3个批次关黄柏样品各3份,每份约0.2 g,精密称定,分别精密加入高、中、低3个浓度的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱储备液适量,照**2.3**项下方法制备,在**2.1**项条件下进样10 μL ,测定结果见表3~5。

表3 盐酸小檗碱加样回收率($n=9$)

No.	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.913	1.136	3.023	97.72	98.94	2.0
	1.913	1.420	3.280	96.28		
	1.913	1.704	3.613	99.81		
2	1.233	1.136	2.329	96.41	98.81	2.0
	1.233	1.420	2.637	98.81		
	1.233	1.704	2.925	99.26		
3	1.645	1.136	2.798	101.53	98.61	2.0
	1.645	1.420	3.045	98.61		
	1.645	1.704	3.383	102.02		

表4 盐酸药根碱加样回收率($n=9$)

No.	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.064	0.064	0.126	96.88	96.22	1.1
	0.064	0.080	0.140	95.00		
	0.064	0.096	0.158	97.92		
2	0.044	0.064	0.105	95.31	96.88	2.0
	0.044	0.080	0.120	95.00		
	0.044	0.096	0.137	96.88		
3	0.060	0.064	0.122	96.88	96.25	2.0
	0.060	0.080	0.137	96.25		
	0.060	0.096	0.152	95.83		

表5 盐酸巴马汀加样回收率($n=9$)

No.	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.144	0.592	1.739	100.55	101.2	1.2
	1.144	0.740	1.886	100.24		
	1.144	0.888	2.058	102.88		
2	0.696	0.592	1.298	101.63	101.55	2.0
	0.696	0.740	1.439	100.39		
	0.696	0.888	1.598	101.55		
3	1.209	0.592	1.796	99.07	102.10	2.0
	1.209	0.740	1.965	102.10		
	1.209	0.888	2.116	102.11		

取5份已知含量的同一批次关黄柏样品约0.2 g,精密称定,分别精密加入黄柏酮对照品储备液适量,按照**2.3**项下方法制备,在**2.1**项色谱条件下进

样10 μL ,见表6。

表6 黄柏酮加样回收率($n=5$)

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.199 7	1.031	1.746	96.66%	98.90%	1.9
0.200 3	1.034	1.782	99.85%		
0.200 1	1.033	1.753	97.14%		
0.200 0	1.032	1.791	100.87%		
0.199 5	1.029	1.779	99.96%		

注:加入量均为0.750 mg。

关黄柏样品的4种有效成分的平均加样回收率在95%~105%,且加样回收率的相对标准偏差均小于2%,表明该方法准确度良好。

2.9 关黄柏药材样品测定 称取各批次样品0.2 g,精密称定,按**2.3**项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取10 μL 注入液相色谱仪,在**2.1**项条件测定,以外标法用峰面积积分值计算黄柏中4种成分含量,见表7。

表7 关黄柏原药材中4种成分的质量分数 %

No.	来源	盐酸 小檗碱	盐酸 药根碱	盐酸 巴马汀	黄柏酮
1	哈尔滨市场	0.956	0.032	0.572	0.516
2	哈尔滨市场	0.617	0.022	0.348	0.471
3	哈尔滨市场	2.674	0.024	0.051	0.114
4	哈尔滨市场	0.822	0.030	0.605	0.524
5	哈尔滨市场	0.765	0.023	0.363	0.496
6	哈尔滨市场	0.967	0.050	0.671	0.603
7	哈尔滨市场	0.609	0.029	0.448	0.584
8	樟树中药饮片有限公司	0.451	0.035	0.580	0.476
9	同仁堂(亳州)饮片公司	2.550	0.067	0.633	0.498
10	不明	0.419	0.032	0.246	0.377
11	浙江中医药大学中药饮片厂	1.177	0.048	0.851	0.717
12	不明	1.109	0.106	0.389	0.887

3 讨论

关于测定波长的选择,取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄柏酮对照品溶液,在200~400 nm进行扫描比较,结果显示盐酸小檗碱在228, 264, 346 nm处均有较大吸收峰,盐酸巴马汀在226, 272, 344 nm处有较大吸收,盐酸药根碱在225, 265, 344 nm处有较大吸收,据此选择345 nm作为测定以上3种成分的吸收波长。黄柏酮在此范围内没有最大吸收峰,越靠近200 nm吸收值越大,因此选择



210 nm 为其检测波长。

关于提取溶剂的选择,参考已有文献报道^[5-7],本实验考察了甲醇、1% 盐酸甲醇、60% 乙醇 3 种提取溶剂的提取效果。测定峰面积结果表明 1% 盐酸甲醇和 60% 乙醇对小檗碱、巴马汀、药根碱的提取效果明显优于甲醇的提取效果,而 60% 乙醇对巴马汀、小檗碱和黄柏酮的提取效果优于 1% 盐酸甲醇的提取效果。据此本实验采用了 60% 乙醇作为提取溶剂。

关于提取方法的选择,本实验考察了超声提取,加热回流提取和索氏提取 3 种提取方法,结果表明超声提取 45 min 和 1 h 的样品各峰面积均大于加热回流提取 1,2,3 h 的样品峰面积,而索氏回流提取 8 h 的提取效果并不明显高于超声提取。超声提取 45 min 与超声提取 1 h 的提取效果无明显差异,据此选择超声提取 45 min 的方法。

关于流动相条件的考察,在水相为纯水的条件下,各峰不能得到良好的分离且峰形拖尾严重,在将水相条件调整为 0.1% 磷酸溶液后,各峰形得到明显改善,但分离效果仍不够理想。在 0.1% 磷酸溶液中加入磷酸二氢钠适量,配制成 0.02 mol · L⁻¹ 的磷酸二氢钠缓冲溶液后,各峰分离度均大于 1.5 的基线分离,达到分离要求。

对 12 批关黄柏药材市场品的含量测定表明,除 8,10 号样品外,均符合 2005 年版药典对关黄柏中盐酸小檗碱的含量限度规定(0.60%)。在关黄柏的质量评价中如何规定其他生物活性成分的含量限度将另文报道。

该方法是否适用于川黄柏,笔者也进行了方法的考察,结果表明该方法对川黄柏中 4 种成分的含量测定同样适用。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:214.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:664.
- [3] 李峰,贾彦竹. 黄柏的临床药理作用[J]. 中医药临床杂志, 2004,16(2):191.
- [4] 万德光. 中药品种品质与药效[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007:813.
- [5] 张焯,崔征,周海燕,等. 高效液相色谱法测定关黄柏不同采收期及黄檗不同部位的小檗碱、巴马汀含量[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(3):194.
- [6] 崔丽莉,张玉红,秦彦杰,等. HPLC 法同时测定黄檗皮中小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的含量[J]. 东北林业大学学报, 2004,32(6):117.
- [7] 丁晴,徐德然. HPLC 法同时测定黄柏中盐酸药根碱、盐酸巴马汀及盐酸小檗碱的含量[J]. 西北植物学报,2004,24(11):2143.

Simultaneous determination of jatrorrhizine, palmatine, berberine, and obacunone in Phellodendri Amurensis Cortex by RP-HPLC

ZHANG Qian^{1,2}, CAI Lifan^{1,2}, ZHONG Guoyue^{1*}, LUO Weizao¹

(1. National Engineering Laboratory for Propagation of Endangered Traditional Chinese Medicine, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

2. School of Chinese Pharmacology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method to determine the content of jatrorrhizine, palmatine, berberine, and obacunone in Phellodendri Amurensis Cortex simultaneously. **Method:** The separations were carried out at 25 °C on a Phenomenex Gemini C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with acetonitril and water containing 0.1% phosphoric acid in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelenghtes were 345 nm for jatrorrhizine, palmatine, berberine and 210 nm for obacunone. **Result:** The average recoveries of jatrorrhizine, palmatine, berberine, and obacunone were 98.94%, 101.17%, 96.22% and 98.90%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and repeatable, and can be used in content determination of jatrorrhizine, palmatine, berberine, and obacunone in Phellodendri Amurensis Cortex.

[Key words] RP-HPLC; Phellodendri Amurensis Cortex; berberine; jatrorrhizine; palmatine; obacunone; quality standard

doi: 10.4268/cjcmm20101603

[责任编辑 王亚君]