

· 论 著 ·

反相离子对高效液相色谱法测定黄柏及其颗粒剂中小檗碱及巴马汀的含量

王 敏¹, 李 翔², 王 洪³, 董 昕³, 姜子洋^{3*}

(1. 乌鲁木齐齐医学院药剂教研室, 呼图壁 831200; 2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 3. 药学院分析测试中心)

[摘要] **目的:** 探讨应用反相离子对高效液相色谱法测定黄柏药材 (*Phellodendron chinense* Schneid.) 及其颗粒剂中小檗碱及巴马汀的含量。 **方法:** 采用反相离子对高效液相色谱法并进行方法学考察, 色谱条件: Lichrospher C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈: 25 mmol/L 磷酸二氢钠: 25 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (2:1:1); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 345 nm; 柱温 25℃。黄柏药材及其颗粒剂以盐酸甲醇溶液 (1:100) 提取。 **结果:** 小檗碱和巴马汀色谱峰的理论塔板数分别为 14 906 和 14 847, 分离度分别为 2.33 和 2.86, 拖尾因子分别为 1.09 和 1.06, 符合定量分析的要求。回归方程分别为 $Y=698\ 278X-3\ 846$, $r=1.000$ 和 $Y=536\ 632X-7\ 738$, $r=0.999\ 9$, 线性范围分别在 40~500 ng 和 20~250 ng 之间。方法学考察结果表明, 小檗碱和巴马汀低、中、高 3 个进样量的日内精密度和日间精密度的 RSD 均小于 2.5% 和 1.5%, 48 h 内稳定性试验的 RSD 分别为 0.66% 和 0.70%, 重现性试验的 RSD 分别为 0.11% 和 0.12% ($n=5$), 最低检测限分别为 2.0 ng 和 1.0 ng, 加样回收率结果分别为 100.4%, RSD=0.12% ($n=3$) 和 99.80%, RSD=0.22% ($n=3$)。测定 3 批黄柏药材和 5 批黄柏颗粒剂中小檗碱及巴马汀的含量。 **结论:** 该方法简便可行, 结果可靠, 能够用于黄柏药材及其颗粒剂中小檗碱及巴马汀含量测定的研究。

[关键词] 反相离子对; 色谱法, 高压液相; 黄柏; 颗粒剂; 小檗碱; 巴马汀

[中图分类号] R 282.710.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0195-03

Reversed-phase ion pair high performance liquid chromatography in determination of berberine and palmatine in *Phellodendron chinense* Schneid. and its granules

WANG Min¹, LI Xiang², WANG Hong³, DONG Xin³, LOU Zi-yang^{3*} (1. Department of Pharmaceutics, Urumqi Military Medical College, Hutubi 831200, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Testing Center, School of Pharmacy)

[ABSTRACT] **Objective:** To determine berberine and palmatine in *Phellodendron chinense* Schneid. and its granules. **Methods:** The reversed-phase ion pair high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used and the validation of the method was tested. The chromatography condition was with Lichrospher C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase was ACN: 25 mmol/L NaH₂PO₄: 25 mmol/L SDS (2:1:1), flow speed was 1.0 ml/min, detection wavelength was 345 nm, and temperature of column was 25℃. *Phellodendron chinense* Schneid. and its granules were extracted with methanol solution of hydrochloric acid. **Results:** The theoretical plate number of berberine and palmatine were 14 906 and 14 847, the resolution were 2.33 and 2.86, the tailing factor were 1.09 and 1.06, respectively; all the parameters were suitable for determination. The calibration curves were linear in the range of 40-500 ng, $Y=698\ 278X-3\ 846$, $r=1.000$ (berberine) and 20-250 ng, $Y=536\ 632X-7\ 738$, $r=0.999\ 9$, $r=0.999\ 4$ (palmatine). The intra-day and inter-day precision (RSD) at low, middle and high injection amount was all less than 2.5% (berberine) and 1.5% (palmatine). The stability (RSD) was 0.66% (berberine) and 0.70% (palmatine) in 48 h. The recurrence (RSD, $n=5$) was 0.11% (berberine) and 0.12% (palmatine). The limits of detection was 2.0 ng (berberine) and 1.0 ng (palmatine). The recoveries were 100.4% (RSD=0.12%, $n=3$) for berberine and 99.80% (RSD=0.22%, $n=3$) for palmatine. The contents of berberine and palmatine in 3 batch of *Phellodendron chinense* Schneid. and 5 batch of its granules were determined. **Conclusion:** Our method can be used for determination of berberine and palmatine in *Phellodendron chinense* Schneid. and its granules, which is simple and reliable.

[KEY WORDS] reversed-phase ion pair; chromatography, high pressure liquid; *Phellodendron chinense* Schneid.; granules; berberine; palmatine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 195-197]

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 或黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮, 具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之功效。黄柏的主要成分为小檗碱 (berberine)

及巴马汀 (palmatine)。2000 版《中国药典》仅规定

[作者简介] 王 敏 (1980-), 女 (汉族), 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: louziyang@126.com

了黄柏药材的鉴别方法,并未对含量测定进行规定。小檗碱和巴马汀的含量测定方法主要有薄层扫描法^[1]、毛细管电泳法^[2,3]和高效液相色谱法^[4]。薄层色谱法的样品制备繁琐,杂质干扰较大,精密度较差;毛细管电泳法的重现性较差,样品测定需要添加内标;高效液相色谱法精密度和重现性均较好,广泛用于中药有效成分的含量测定,具有准确、可靠的优点。为了有效地控制黄柏药材及其颗粒剂的质量,本实验建立了反相离子对高效液相色谱法测定其中小檗碱及巴马汀含量的方法,以期为黄柏药材及其制剂的质量控制提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 DIONEX 高效液相色谱仪: P680 Pump 泵, PDA-100 二极管阵列紫外检测器, DIONEX Chromeleon 工作站, TCC-100 柱温箱, ASI-100 自动进样器; METTLER AE240 电子天平; BRANSON SB3200-T 型超声仪; 上海淀久 DJ-04 药材粉碎机。小檗碱和巴马汀对照品购自中国药品生物制品检定所; 3 批黄柏药材均购自上海德康医药商店, 并经本院生药学教研室陈万生副教授鉴定为黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮; 5 批黄柏颗粒剂由本院生药学教研室自行研制(批号: 030323、030410、030426、030607、031107); 乙腈为色谱纯; 磷酸二氢钠、十二烷基硫酸钠均为分析纯; 水为双蒸水。

1.2 对照品溶液的制备 精密称取小檗碱和巴马汀各对照品 10.0 mg, 分别加甲醇溶解并定容至 25 ml, 制成 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 储备液。分别精密吸取小檗碱和巴马汀储备液各 0.5 ml 和 0.25 ml, 加甲醇溶解并定容至 10 ml, 制成 1 ml 含 20 μg 小檗碱和 10 μg 巴马汀的对照品混合溶液。

1.3 色谱条件 色谱柱: 汉邦 Lichrospher C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈: 25 mmol/L 磷酸二氢钠: 25 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (2: 1: 1); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 345 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 线性关系考察 将小檗碱和巴马汀对照品混合溶液依次连续自动进样 2、5、10、15、20 和 25 μl , 分别重复 5 次, 以对照品的质量 (X , ng) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度试验 以 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 小檗碱和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 巴马汀对照品混合溶液 2、10 和 25 μl , 在 1 d 之内连续进样 5 次, 以及连续 5 d 分别进样, 根据所得

峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。

1.5.2 稳定性 以小檗碱和巴马汀对照品混合溶液, 在 0、3、6、12、18、24、36、48 h 后测定峰面积。

1.5.3 重现性 精密称取同一黄柏药材样品 5 份, 各约 0.04 g, 分别按 1.6 项方法制成样品溶液, 进样 10 μl 分析。

1.5.4 最低检测限 将黄柏药材样品溶液进行稀释测定, 测定信噪比为 3: 1 时, 小檗碱和巴马汀的最低检测限。

1.5.5 加样回收率 精密称取小檗碱和巴马汀含量为 12.20 mg/g 和 6.77 mg/g 的黄柏药材 3 份, 各约 0.04 g, 分别加入 0.400 mg/ml 小檗碱和 0.400 mg/ml 巴马汀对照品储备液 1.0 ml 和 0.5 ml、1.2 ml 和 0.7 ml、1.5 ml 和 0.8 ml, 分别按 1.6 项方法制成样品溶液, 进样 10 μl 分析, 每份测定 3 次, 计算加样回收率。

1.6 样品测定 对 3 批黄柏药材和 5 批黄柏颗粒剂进行含量测定。黄柏药材样品溶液的制备: 精密称取黄柏药材粉末约 0.04 g (过 40 目筛) 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50 ml 盐酸甲醇溶液 (1: 100), 密塞并称量。冷浸 15 min 后, 超声 30 min, 放冷至室温后, 补足溶液至恒重, 摇匀, 常压过滤, 弃去初滤液, 续滤液经 0.45 μm 滤膜过滤, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

黄柏颗粒剂样品溶液的制备: 取黄柏颗粒剂约 0.10 g, 精密称定, 加适量盐酸甲醇溶液 (1: 100) 溶解, 超声 10 min, 放冷至室温后, 定容至 50 ml, 摇匀, 常压过滤, 弃去初滤液, 续滤液经 0.45 μm 滤膜过滤, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2 结果

小檗碱的回归方程为 $Y = 698.278X - 3.846$, $r = 1.000$, 在 40~500 ng 之间的线性关系良好。巴马汀的回归方程为 $Y = 536.632X - 7.738$, $r = 0.9999$, 在 20~250 ng 之间的线性关系良好。小檗碱对照品溶液低、中、高 3 个进样量的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 2.1%、0.55%、0.16% 和 2.5%、0.72%、0.25%。巴马汀对照品溶液低、中、高 3 个进样量的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 1.2%、0.63%、0.18% 和 1.5%、0.77%、0.27%。结果表明方法的精密度良好。小檗碱和巴马汀对照品溶液峰面积 RSD 分别为 0.66% 和 0.70%。结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。黄柏药材中小檗碱平均含量为 11.20 mg/g, RSD = 0.11% ($n = 5$); 巴马汀平均含量为 6.28

mg/g, RSD=0.12% ($n=5$), 表明方法的重现性良好。小檗碱和巴马汀的最低检测限分别为 2.0 ng 和 1.0 ng。黄柏药材中小檗碱和巴马汀的加样回收率分别为 100.4%, RSD=0.12% ($n=3$) 和 99.80%, RSD=0.22% ($n=3$)。黄柏药材及其颗粒剂色谱图见图 1。结果见表 1。

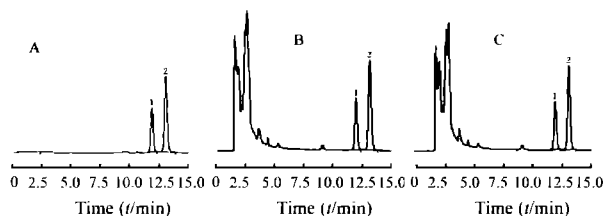


图 1 对照品(A)、黄柏药材(B)及颗粒剂(C)的 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatography of reference substances(A), *Phellodendron chinense* Schneid. (B) and its granules(C)
1: Palmatine; 2: Berberine

表 1 黄柏及其颗粒剂中小檗碱和巴马汀含量的测定结果

Tab 1 Determination results of berberine and palmatine
($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Sample	Batch	Berberine	Palmatine
<i>Phellodendron chinense</i> Schneid.	1	12.20 ± 0.04	6.77 ± 0.03
	2	11.96 ± 0.04	6.68 ± 0.01
	3	12.63 ± 0.05	6.72 ± 0.02
Granules of <i>Phellodendron chinense</i> Schneid.	030323	4.97 ± 0.04	2.57 ± 0.02
	030410	5.41 ± 0.01	2.78 ± 0.01
	030426	5.09 ± 0.03	2.62 ± 0.01
	030607	4.91 ± 0.04	2.49 ± 0.01
	031107	5.27 ± 0.01	2.77 ± 0.01

3 讨论

在 1.3 项的色谱条件下, 以对照品溶液进样, 根据小檗碱和巴马汀的色谱峰参数进行计算, 其理论塔板数分别为 14 906 和 14 847, 分离度分别为 2.33 和 2.86, 拖尾因子分别为 1.09 和 1.06, 均达到定量分析的要求。

因小檗碱和巴马汀为极性较强的生物碱类化合物, 采用甲醇-水、乙腈-水或甲醇-磷酸溶液等流动相系统进行分析, 两者在反相色谱柱中保留时间短, 峰型较差, 且色谱峰重叠无法得到有效分离。改用乙腈-磷酸二氢钠-十二烷基硫酸钠系统后, 分离效果明显改善, 且峰形较好。此方法具有分析时间短, 重现性好等优点, 可以用于黄柏药材及其制剂的含量测定研究。

增加流动相中乙腈的比例, 可以显著缩短色谱峰的保留时间, 调整乙腈的比例为 50%, 可以使小

檗碱和巴马汀与杂质完全分离, 且具有较短的分析时间。当磷酸二氢钠浓度为 10 mmol/L 时, 色谱峰的拖尾因子较差; 当磷酸二氢钠浓度为 50 mmol/L 时, 峰型与 25 mmol/L 相似, 但柱压持续升高, 可能与磷酸二氢钠浓度升高后结晶析出有关。十二烷基硫酸钠浓度低于 25 mmol/L 时, 同样会导致色谱峰的形状变差, 同时导致杂质峰变多; 当十二烷基硫酸钠浓度为 50 mmol/L 时, 峰型无明显改变, 柱压也较高。最终确定流动相为乙腈: 25 mmol/L 磷酸二氢钠: 25 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (2:1:1), 可以获得满意的分析效果。

因小檗碱和巴马汀极性较大, 且在酸性条件下以阴离子的形式存在, 其含量测定方法多采用毛细管电泳法^[2,3], 但因重现性较差的缺点限制了该方法在定量分析中的广泛应用。高效液相色谱法凭借定量准确、重现性好的优点, 在各种药物定量分析研究中被广泛应用。刑俊波等^[4]采用正相色谱的方法测定了黄柏及其制剂中小檗碱的含量, 并没有检测巴马汀的含量, 采用正相色谱的方法是否能有效分离这 2 种成分还有待于进一步研究。本实验建立了反相离子对高效液相色谱法测定其中小檗碱及巴马汀含量的方法, 可以有效地将 2 种成分分离, 峰型好, 定量结果满意。

采用超声提取的方法对黄柏药材进行制备, 比索氏提取法^[5]具有简便、快速的优点, 并且可以避免高温对待测组份的破坏。由于颗粒剂的特点, 采用超声促溶的方法即可保证提取完全。

小檗碱和巴马汀的最大吸收波长在 345 nm, 以此为测定波长可以避免杂质干扰。

[参考文献]

- [1] 戈早川, 周建明. 胶束薄层扫描法测定黄连及其制剂中的小檗碱、巴马汀和药根碱[J]. 分析化学研究简报, 2003, 32(1): 99-101.
- [2] Ji XH, Li Y, Liu HW, et al. Determination of the alkaloid content in different parts of some Mahonia plants by HPCE[J]. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 2000, 74: 387-391.
- [3] Chen YR, Wen KC, Her GR. Analysis of coptisine, berberine and palmatine in adulterated Chinese medicine by capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 866: 273-280.
- [4] 刑俊波, 王晓娟. 高效液相色谱法测定黄柏及其制剂中盐酸小檗碱含量的研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(11): 1978-1979.
- [5] 吕曙华, 徐刚, 吕归宝, 等. 离子对高效液相色谱法测定春血安胶囊中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J]. 中草药, 2003, 34(4): 332-333.

[收稿日期] 2004-07-15

[修回日期] 2004-09-10

[本文编辑] 尹 茶