

HPLC 法测定万氏牛黄清心丸中 小檗碱型生物碱的含量

闻璐毓 李康乐¹

(扬州市药品检验所,扬州 225001; ¹中国药科大学分析计算中心,南京 210009)

摘要 用 HPLC 法分离并测定了万氏牛黄清心丸中小檗碱、巴马汀、药根碱和黄连碱的含量。采用硅胶色谱柱,以无水乙醇-3%三乙胺(92:8)为流动相,检测波长 345 nm。实验结果表明样品中各组份的分离度好,四种生物碱的标准曲线的相关系数分别为 0.9999, 0.9998, 0.9996 和 0.9994, 回收率分别为 99.69% ± 1.20%, 98.38% ± 1.54%, 95.27% ± 1.83% 和 96.32% ± 2.01%。与药典方法比较,更加简便、准确。

关键词 HPLC; 万氏牛黄清心丸; 小檗碱型生物碱

万氏牛黄清心丸系根据《痘疹·医心法》中古方由牛黄、黄连等六味中药配制而成。具有清热解毒、开窍安神之功效。其中,主药黄连的主要成分为小檗碱(berberine)、巴马汀(palmatine)、药根碱(jatrorrhizine)、黄连碱(coptisine)等小檗碱型生物碱。中国药典 1990 年版采用盐酸-甲醇(1:100)(下简称酸性甲醇)提取,中性氧化铝柱层析后紫外分光光度法测定黄连总生物碱的含量。有文献报道用导数光谱法测定其含量^[1]。亦有文献报道用正相 HPLC 法^[2]、离子对色谱法^[3]测定含黄连药物中小檗碱型生物碱的含量。我们选用 HPLC 法,以原形硅胶为固定相,无水乙醇-3%三乙胺(92:8)为流动相的反相色谱系统,用甲醇超声振荡提取样品,外标法测定万氏牛黄清心丸中小檗碱型生物碱的含量。实验表明,按中国药典方法测得的总生物碱含量实际包括了生物碱与非生物碱的总体贡献。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

HP1090 高效液相色谱仪,盐酸小檗碱等生物碱对照品、黄连对照药材:中国药品生物制品检定所,万氏牛黄清心丸:市售产品。

1.2 色谱条件

色谱柱:μporasil 硅胶柱,(300×3.9 mm, 10 μm);流动相:无水乙醇-3%三乙胺(用醋酸调节 pH 至 7.5)(92:8);流速为 0.7 ml/min;检测波长 345 nm。黄连药材对照品及样品色谱图见图 1。

1.3 标准曲线

对照品储备液:取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、硫酸黄连碱对照品各 10 mg, 分别置 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 备用。

分别精密吸取对照品储备液适量, 用甲醇稀释成梯度浓度, 在上述色谱条件下分别进样 10 μl, 以浓度 C 对峰面积 A 进行回归。见表 1。

Tab 1. Calibration curves for each berberine-type alkaloid

Constituent	Linear range, μg/ml	Equation (×10 ⁻⁵)	r
Berberine	5.0~50	A=1.079C-0.3155	0.9999
Palmatine	0.5~20	A=1.332C-0.2579	0.9998
Jatrorrhizine	0.5~20	A=1.382C-0.4040	0.9996
Coptisine	0.5~20	A=1.179C-0.2154	0.9994

收稿日期 1994-11-18

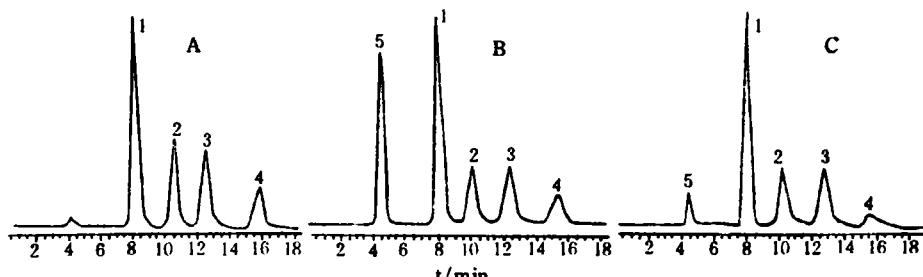


Fig 1. HPLC showing the separation of (A) coptis reference medical material, (B) extd. sample by the pharmacopoeia method, (C) extd. sample by ultrasonic vibration

1-berberine 2-palmatine 3-jatrorrhizine 4-coptisine 5-non-alkaloid

1.4 加样回收率

取已测含量的样品, 分别加一定量的对照品, 加甲醇适量超声振荡 30 min, 用甲醇稀释至刻度, 进样 10 μl, 外标法测定含量, 计算回收率, 结果见表 2。

1.5 样品测定

取样品约 0.5 g, 剪碎, 精密称定, 置 100 ml 容量瓶中, 同“1.4”项下操作。结果见表 2。

Tab 2. Recovery and content of four constituents

Constituent	Average recovery, %		Content, %	
	$\bar{x} \pm SD\%$	910802	920816	921103
Berberine	99.69 ± 1.20	1.31	1.24	1.14
Palmatine	98.38 ± 1.54	0.308	0.287	0.308
Jatrorrhizine	95.27 ± 1.83	0.232	0.324	0.314
Coptisine	96.32 ± 2.01	0.138	0.187	0.223

2.1 样品的定量方法

从图 1 可见, 黄连药材对照品的色谱图有四个峰, 分别为小檗碱、巴马汀、药根碱和黄连碱。用中国药典方法进行紫外测定的样液在上述色谱条件下进样, 有 5 个色谱峰, 以盐酸小檗碱计算, 对 5 个峰的总面积定量, 结果与紫外测定一致。见表 3。

Tab 3. Result of sample assay

Batch No.	Berberine-type alkaloids, %	Sum of alkaloid and non-alkaloid, %	
		HPLC	UV
910802	1.88	2.31	2.31
910812	1.92	2.37	2.35
920816	1.94	2.52	2.40
920820	1.96	2.57	2.48
921103	1.96	2.64	2.62

通过 HP1090 二极管阵列检测器系统的三维色谱分析发现峰 5 的光谱与小檗碱型生物碱的光谱完全不同。见图 2。当流动相改为无水乙醇-水(92:8)不加阴离子竞争离子三

乙胺^[4]时, 小檗碱等生物碱均被硅醇基保留未出峰, 只出现一个峰, 其保留时间、峰面积、光谱行为均与加三乙胺为流动相的峰 2 一致。从而可以说明峰 5 为非生物碱型物质。笔者认为, 在计算黄连总生物碱含量时, 只应对峰 1, 2, 3, 4 合并定量, 不应计算峰 5 的贡献。而紫外分光光度法不具备分离作用, 只能测定总体的紫外贡献。从表 3 可见, 药典方法测得的黄连总生物碱含量与实际的总生物碱含量有显著性差异($P < 0.01$)。

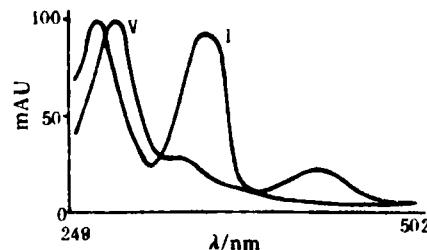


Fig 2. Spectrum of the HPLC peak

I. berberine V. non-alkaloid

2.2 样品的提取

中国药典采用的方法是用酸性甲醇索氏提取后经中性氧化铝柱层析, 操作繁琐, 费时。我们试用酸性甲醇、甲醇超声振荡提取, 与上述方法比较, 测得总生物碱含量一致, 而非生物碱为药典方法测得的含量最高, 酸性甲醇超声振荡次之, 甲醇提取最少。超声振荡时间从 30 min 到 1.5 h 所得结果基本一致, 故选用甲醇超声振荡提取 30 min。

参考文献

- 1 林黎明. 导数值导数光谱法测定万氏牛黄清心丸中黄连总生物碱的含量. 中国中药杂志, 1990, 15(1): 32
- 2 赵陆华, 蔡星瀛, 董善士等. HPLC 法测定黄连、黄柏及其中成药中小檗碱型生物碱的含量. 中国药科大学学报, 1989, 20(2): 82
- 3 Tetsuo Misaki, Kazuhiko Sagara, Mitsuhiro Ojima, et al. Simultaneous determination of berberine, palmatine and coptisine in crude drugs and oriental pharmaceutical preparations by ino-pair high-performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(1), 354
- 4 John A. Adamants. *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals Chromatographic Science Series; Volume 49*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1990, 186

Determination of Berberine-type Alkaloids in Wanshi Niuhuang Qingxin Wan by HPLC

Wen Liyu, Li Kangle¹

Yanzhou Institute of Drug Control, 225001; ¹Analysis and Computer Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract This paper describes separation and determination of berberine, palmatine, jatrorrhizine and coptisine in Wanshi Niuhuang Qingxin Wan by HPLC. The samples were analyzed on analytical silica column using anhydrous alcohol-3% triethylamine (92:8) as the mobile phase. Detection wavelength was 345 nm. The results indicate that this method is satisfactory for the separation of each constituent, the relative coefficient of calibration curves for four alkaloids is 0.9999, 0.9998, 0.9996 and 0.9994 respectively. The average recoveries are 99.6% ± 1.20%, 98.38% ± 1.54%, 95.27% ± 1.83% and 96.32% ± 2.01% respectively. Compared with the method in China Pharmacopoeia this method was convenient and accurate.

Key words HPLC; Wanshi Niuhuang Qingxin Wan; Berberine-type alkaloid

【文摘 024】 GlyA 基因的克隆及检验 蔡宇易, 吴梧桐, 史燕东. 药物生物技术, 1995, 2(1): 1~4

用聚合酶链式反应技术从大肠杆菌 K12 菌株中扩增出长 1.9 kb 的 DNA 片断, 并插入载体质粒 pT₇-中。经 Agarose 电泳和 DNA 序列分析, 确证该片断是 GlyA 目的基因(编码序列长 1251 bp, 调控序列长约 600 bp)。该实验在国内外均未见报道。

【文摘 025】 大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶的提取和纯化 刘景晶, 金健勤, 戴海滨, 吴梧桐. 药物生物技术, 1995, 2(1): 16~19

大肠杆菌能产生两种 L-天门冬酰胺酶, 其中 L-天门冬酰胺酶 I 具有抗癌活性, 以往对该酶的提取纯化常采用丙酮破碎细胞、有机溶剂反复分级沉淀的方法。本文报道一种新的提取纯化工艺。用蔗糖溶

液提取菌体细胞周质中的天门冬酰胺酶, 所获得的粗酶液经硫酸分级沉淀、DEAE-纤维素柱层和羧甲基纤维素柱层析纯化, 获得了比活为 220 IU/mg、SDS-PAGE 显示一条带的 L-天门冬酰胺酶。

【文摘 026】 应用固定化芽孢杆菌 CPU-931105 再生腺苷三磷酸 张宏兴, 王昊, 王丁刚, 吴梧桐, 彭海燕. 药物生物技术, 1995, 2(1): 20~23

筛选了含乙酰激酶较高活力的菌株, 芽孢杆菌 CPU-931105, 并将其固定化, 用于从 ADP 再生 ATP。采用明胶-戊二醛共价交联法, 使菌体中降解 ATP 的酶受到抑制, 而保持乙酰激酶的活力, 使产物 ATP 得以积累。在柱式反应器中, ADP 浓度为 1 mg/ml 时, 空间流速 SV 为 0.5 h⁻¹, 连续操作 7 天, 再生 ATP 的转化率可维持在 80% 以上。