

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.016

高效液相色谱法同时测定马尾连及硬水黄连提取物中4种生物碱类成分含量

卞艳晶

(山东省济宁市食品药品检验检测中心, 山东 济宁 272025)

摘要:目的 建立同时测定近缘植物马尾连和硬水黄连提取物中木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱4种生物碱类成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液加 0.3% 十二烷基硫酸钠-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 268 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。结果 木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱质量浓度分别在 2.158~86.300 mg/L、5.695~227.800 mg/L、3.815~152.600 mg/L、4.488~179.500 mg/L 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3% (n=6);马尾连提取物中木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱的平均加样回收率分别为 98.94%, 99.27%, 99.70%, 99.11%, RSD 分别为 0.96%, 0.80%, 1.19%, 1.52% (n=6), 含量分别为 0.797, 2.532, 1.591, 1.747 mg/g;硬水黄连提取物中黄连碱和小檗碱的平均加样回收率分别为 98.48% 和 98.90%, RSD 分别为 1.13% 和 1.85% (n=6), 含量分别为 1.960, 2.401 mg/g。结论 该方法简便快捷, 准确度高, 重复性和稳定性均较好, 可用于木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱4种生物碱类成分的含量测定。

关键词: 马尾连; 硬水黄连; 木兰花碱; 药根碱; 黄连碱; 小檗碱; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)18-0065-04

Simultaneous Determination of Four Alkaloids in the Extract of Radix et Rhizoma Thalictri and Radix Thalictri Brveipis by HPLC

BIAN Yanjing

(Jining Institute for Food and Drug Control of Shandong Province, Jining, Shandong, China 272025)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of the content of four alkaloids(magnoflorine, jatrorrhizine, coptisine and berberine) in the extract of Radix et Rhizoma Thalictri and Radix Thalictri Brveipis. **Methods** The chromatographic column was Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid aqueous solution plus 0.3% sodium dodecyl sulfate-acetonitrile(gradient elution), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 268 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of magnoflorine, jatrorrhizine, coptisine and berberine were 2.158-86.300 mg/L, 5.695-227.800 mg/L, 3.815-152.600 mg/L and 4.488-179.500 mg/L. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3% (n=6). The average recoveries of magnoflorine, jatrorrhizine, coptisine and berberine in the extract of Radix et Rhizoma Thalictri were 98.94%, 99.27%, 99.70% and 99.11% with RSDs of 0.96%, 0.80%, 1.19% and 1.52% (n=6), and their content was 0.797, 2.532, 1.591, 1.747 mg/g, respectively. The average recoveries of coptisine and berberine in the extract of Radix Thalictri Brveipis were 98.48% and 98.90% with RSDs of 1.13% and 1.85% (n=6), and their content was 1.960, 2.401 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, reproducible and stable, which can be used for the content determination of four alkaloids(magnoflorine, jatrorrhizine, coptisine and berberine).

Key words: Radix et Rhizoma Thalictri; Radix Thalictri Brveipis; magnoflorine; jatrorrhizine; coptisine; berberine; HPLC; content determination

马尾连又名马尾黄连,出自《本草纲目拾遗》,为毛茛科植物金丝马尾连、昭通唐松草、贝加尔唐松草、多叶唐松草、高原唐松草等的根及根茎,性寒,味苦,归心、肝、大肠经,具清热燥湿、泻火解毒之功效,主治湿热泻痢、黄疸、疮疡肿毒、目赤肿痛、感冒发热、癌肿^{[1]263-268}。硬水黄连为其近缘药用植物,又名水黄连、黄脚鸡等,为毛茛科植物短梗箭头唐松草的根或全草。《百草镜》载:“水黄连,打箭炉出者,形细长,少硬刺,较重于他连,以

皮肉带青色者为佳。出小西天者,色黑有毛者佳,无毛光黄者次之。”其味苦、性寒,归肝、肺、大肠经,具清热解毒、利湿退黄、止痢之功效,常用于治疗黄疸、痢疾、肺热咳嗽、鼻疳等^{[1]274-275}。两种药用资源均富含多种生物碱及黄酮苷类成分^[2-5]。目前,仅将小檗碱作为马尾连的指标性成分,硬水黄连则无相关质量研究报道^[6-7]。药理学研究表明,唐松草属植物中生物碱成分具有显著抗肿瘤、抗血小板聚集、抗硅肺、抗病毒、抗菌等作用^[8-10]。

第一作者:卞艳晶,女,大学本科,主管中药师,研究方向为中药检验检测,(电子信箱)1098207619@qq.com。

两者性味、功效相同,但其归经及其他药理作用有差异。本研究中提取纯化制备马尾连和硬水黄连提取物,建立了同时测定各提取物中木兰花碱、药根碱、黄连碱及小檗碱含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津制作所株式会社);RE2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TopPette 型微量移液器(大龙兴创实验仪器<北京>有限公司);PRM-1012X 型超声清洗机(宁波博尔超声波设备有限公司,功率为 720 W,频率为 25 kHz);DZF6030 型真空干燥机(上海丙林电子科技有限公司);MS105/A 型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易<上海>有限公司,精度为 0.01 mg)。

1.2 试药

木兰花碱对照品(展舒生物科技有限公司,批号为 2141095,纯度 $\geq 99\%$);盐酸药根碱对照品(批号为 110733-201609,纯度 $\geq 89.5\%$),盐酸黄连碱对照品(批号为 112026-201802,纯度 $\geq 94\%$),盐酸小檗碱对照品(批号为 110713-201814,纯度 $\geq 86.7\%$),均购于中国食品药品检定研究院;马尾连提取物(批号分别为 20200924,20200930,20201009),硬水黄连提取物(批号分别为 20201014,20201020,20201023),均为本实验室自制;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.1% 磷酸水溶液加 0.3% 十二烷基硫酸钠(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~8 min 时 10% B $\rightarrow$ 23% B, 8~20 min 时 23% B $\rightarrow$ 47% B, 20~28 min 时 47% B $\rightarrow$ 85% B, 28~35 min 时 85% B $\rightarrow$ 95% B);流速:1 mL/min;检测波长:268 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 马尾连和硬水黄连提取物制备

称取干燥的马尾连适量,粉碎,过 20 目筛,加 12 倍量纯净水回流提取 1 次,再加 8 倍量纯净水回流提取 1 次,合并提取液,减压浓缩至相对密度为 1.3,加乙醇醇沉至醇含量为 50%,静置 24 h,离心,取上清液,浓缩至无醇味,采用 001 $\times$ 7 阳离子树脂进行吸附,用 0.5 mmol/L 的氨水溶液进行洗脱,收集氨水洗脱液,浓缩,浓缩液上 201 $\times$ 4 阴离子树脂,纯净水洗脱,浓缩纯净水洗脱液,真空干燥,即得马尾连提取物。硬水黄连提取物制备过程同马尾连。

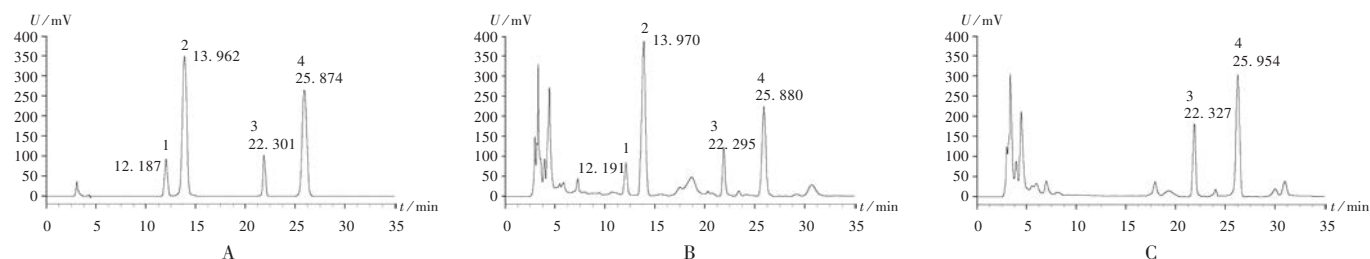
2.3 溶液制备

取木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱对照品各适量,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加适量乙腈溶解并定容,制备得木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱质量浓度分别为 86.30, 227.80, 152.60, 179.50 mg/L 的混合对照品溶液。取马尾连及硬水黄连提取物各 100 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用纯净水超声溶解,加乙腈定容,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得相应供试品溶液。

2.4 方法学考察

专属性试验:取 2.3 项下混合对照品溶液、2.2 项下马尾连和硬水黄连提取物供试品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱 4 种生物碱类成分的分离度均良好,表明方法专属性良好。色谱图见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.3 项下混合对照品溶液适量,加乙腈稀释为含木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱质量浓度分别为 2.157 5, 4.315 0, 8.630 0, 21.575 0, 43.150 0, 86.300 0 mg/L, 5.695 0, 11.390 0, 22.780 0, 56.950 0, 113.900 0, 227.800 0 mg/L, 3.815 0, 7.630 0, 15.260 0, 38.150 0, 76.300 0, 152.600 0 mg/L, 4.487 5, 8.975 0, 17.950 0, 44.875 0, 89.750 0, 179.500 0 mg/L 的系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,以峰面积(A)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(C, mg/L)



1. 木兰花碱 2. 药根碱 3. 黄连碱 4. 小檗碱

A. 混合对照品溶液 B. 马尾连提取物供试品溶液 C. 硬水黄连提取物供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. magnoflorine 2. jatrorrhizine 3. coptisine 4. berberine

A. Mixed reference solution B. Test solution of Radix et Rhizoma Thalictri extract C. Test solution of Radix Thalictri Brveipis extract

Fig. 1 HPLC chromatograms

为横坐标进行线性回归。结果见表 1。

表 1 4 种生物碱类成分线性关系考察、精密度、稳定性试验结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of the linear relation, precision and stability tests of four alkaloids ($n=6$)

成分	回归方程	线性范围 (mg/L)	r	精密度试验 RSD(%)	稳定性试验 RSD(%)
A	$A_1 = 3.1362 \times 10^5 C_1 + 1027.6$	2.158 ~ 86.300	0.999 8	0.84	2.14
B	$A_2 = 7.2295 \times 10^5 C_2 - 422.3$	5.695 ~ 227.800	0.999 9	0.49	1.87
C	$A_3 = 3.7419 \times 10^5 C_3 + 374.5$	3.815 ~ 152.600	0.999 6	1.12	1.69
D	$A_4 = 5.4182 \times 10^5 C_4 + 516.4$	4.488 ~ 179.500	0.999 8	0.77	1.54

注: A 为木兰花碱, B 为药根碱, C 为黄连碱, D 为小檗碱。表 2 至表 4 同。

Note: A is magnoflorine, B is jatrorrhizine, C is coptisine, D is berberine, as well as Tab. 2 to Tab. 4.

精密度试验: 精密吸取含木兰花碱、药根碱、黄连碱、槲碱质量浓度分别为 8.63, 22.78, 15.26, 17.95 mg/L 的混合对照品溶液 10 μ L, 按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积。结果见表 1, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取马尾连提取物供试品溶液, 室温下分别于 0, 2, 5, 8, 12, 24 h 时进样测定, 记录峰面积。结果见表 1, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。取硬水黄连提取物供试品溶液, 同法试验, 结果表明, 供试品溶液室温下在 24 h 内稳定。

重复性试验: 分别取马尾连提取物(批号为 20200924)和硬水黄连提取物(批号为 20201014)100 mg, 精密称定, 各 6 份, 按 2.3 项下方法配制供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 并计算含量。结果见表 2。

表 2 马尾连提取物和硬水黄连提取物中 4 种生物碱类成分重复性试验结果 ($n=6$)

Tab. 2 Results of the repeatability tests of four alkaloids in the extract of Radix et Rhizoma Thalictri and Radix Thalictri Brveipis ($n=6$)

成分	马尾连提取物		硬水黄连提取物	
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)
A	0.796	0.92	—	—
B	2.518	1.21	—	—
C	1.574	0.87	1.904	1.24
D	1.732	1.15	2.379	0.93

注: — 为未检测到。

Note: — indicates that the extract of Radix Thalictri Brveipis is not detected.

加样回收试验: 取已知含量的马尾连提取物(批号为 20200924)50 mg, 精密称定, 共 6 份, 加适量纯净水, 超声处理使溶解, 吸取木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱质量浓度分别为 43.15, 113.90, 76.30, 89.75 mg/L 的混合对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈定

容。取已知含量的硬水黄连提取物(批号为 20201014)50 mg, 精密称定, 共 6 份, 加适量纯净水, 超声处理使溶解, 加入木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱质量浓度分别为 21.575, 56.950, 38.150, 44.875 mg/L 的混合对照品溶液 2.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈定容。上述溶液均经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果见表 3。

表 3 马尾连提取物和硬水黄连提取物中 4 种生物碱类成分加样回收试验结果 ($n=6$)

Tab. 3 Results of the recovery tests of four alkaloids in the extract of Radix et Rhizoma Thalictri and Radix Thalictri Brveipis ($n=6$)

提取物	成分	取样量 (mg)	样品含量 (μ g)	加入量 (μ g)	测得量 (μ g)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
马尾连	A	50.21	39.967 2	43.150 0	82.672 7	98.97	98.94	0.96
		50.07	39.855 7	43.150 0	82.902 2	99.76		
		50.11	39.887 6	43.150 0	82.092 6	97.81		
		50.12	39.895 5	43.150 0	83.183 6	100.32		
		50.32	40.054 7	43.150 0	82.574 7	98.54		
		50.14	39.911 4	43.150 0	82.297 7	98.23		
	B	50.21	126.428 8	113.900 0	240.021 3	99.73	99.27	0.80
		50.07	126.076 3	113.900 0	240.215 5	100.21		
		50.11	126.177 0	113.900 0	238.334 3	98.47		
		50.12	126.202 2	113.900 0	239.407 4	99.39		
		50.32	126.705 8	113.900 0	238.510 0	98.16		
		50.14	126.252 5	113.900 0	239.742 5	99.64		
	C	50.21	79.030 5	76.300 0	155.574 7	100.32	99.70	1.19
		50.07	78.810 2	76.300 0	154.591 3	99.32		
		50.11	78.873 1	76.300 0	155.302 9	100.17		
		50.12	78.888 9	76.300 0	153.517 9	97.81		
		50.32	79.203 7	76.300 0	154.954 3	99.28		
		50.14	78.920 4	76.300 0	156.204 6	101.29		
	D	50.21	86.963 7	89.750 0	174.209 7	97.21	99.11	1.52
		50.07	86.721 2	89.750 0	174.792 9	98.13		
		50.11	86.790 5	89.750 0	177.761 1	101.36		
		50.12	86.807 8	89.750 0	175.094 9	98.37		
		50.32	87.154 2	89.750 0	176.347 8	99.38		
		50.14	86.842 5	89.750 0	176.763 0	100.19		
硬水黄连	C	50.19	95.561 8	95.375 0	188.342 6	97.28	98.48	1.13
		50.06	95.314 2	95.375 0	188.943 9	98.17		
		50.28	95.733 1	95.375 0	191.375 2	100.28		
		50.13	95.447 5	95.375 0	188.466 8	97.53		
		50.09	95.371 4	95.375 0	189.268 0	98.45		
		50.34	95.847 4	95.375 0	190.430 7	99.17		
	D	50.19	119.402 0	112.187 5	233.687 4	101.87	98.90	1.85
		50.06	119.092 7	112.187 5	227.791 2	96.89		
		50.28	119.616 1	112.187 5	231.478 3	99.71		
		50.13	119.259 3	112.187 5	229.337 6	98.12		
		50.09	119.164 1	112.187 5	230.712 1	99.43		
		50.34	119.758 9	112.187 5	229.007 0	97.38		

2.5 样品含量测定

取3批马尾连提取物(批号分别为20200924, 20200930, 20201009)和3批硬水黄连提取物(批号分别为20201014, 20201020, 20201023)各100 mg, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定3次, 计算马尾连提取物和硬水黄连提取物中木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱的含量。结果见表4。

表4 样品中木兰花碱、药根碱、黄连碱和小檗碱含量测定结果($n=3$)

Tab. 4 Content determination of magnoflorine, jatrorrhizine, coptisine and berberine in the samples($n=3$)

提取物	成分	批号	含量(mg/g)	$\bar{X}$ (mg/g)	RSD(%)
马尾连	A	20200924	0.797	0.797	0.82
		20200930	0.791		
		20201009	0.804		
	B	20200924	2.536	2.532	0.43
		20200930	2.520		
		20201009	2.541		
	C	20200924	1.586	1.591	0.87
		20200930	1.581		
		20201009	1.607		
	D	20200924	1.744	1.747	0.79
		20200930	1.735		
		20201009	1.762		
硬水黄连	C	20201014	1.961	1.960	1.12
		20201020	1.938		
		20201023	1.982		
	D	20201014	2.401	2.401	0.73
		20201020	2.384		
		20201023	2.419		

3 讨论

木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱对照品分别经紫外全波长扫描, 结果木兰花碱在271 nm和314 nm波长处有最大吸收, 药根碱在265 nm和345 nm波长处有最大吸收, 黄连碱在268 nm和341 nm波长处有最大吸收, 小檗碱在264 nm和346 nm波长处有最大吸收, 考虑到木兰花碱在340 nm波长附近无吸收, 且在268 nm波长处色谱峰的峰形及基线均良好, 故选择268 nm作为检测波长。

前期分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%醋酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸加0.2%十二烷基硫酸钠溶液、乙腈-0.1%磷酸加0.3%十二烷基硫酸钠溶液等不同流动相体系, 结果发现乙腈-0.1%磷酸加0.3%十二烷基硫酸钠溶液中色谱峰的基线平稳、峰形及分离度均显著好于其他体系, 且色谱图待测成分保留时间良好。故选择乙腈-0.1%磷酸加0.3%十二烷基硫酸钠为流动相。

选择木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱4种生物碱

类成分作为考察指标, 初步比较了本工艺条件下制备的马尾连提取物和硬水黄连提取物中成分的含量差异。结果发现, 马尾连提取物中4种成分含量由高至低为药根碱、小檗碱、黄连碱、木兰花碱; 而硬水黄连中仅检测到黄连碱和小檗碱, 但其中的黄连碱和小檗碱含量均高于同工艺下制备的马尾连提取物。黄连碱和小檗碱治疗肺病(如肺损伤、肺癌、肺炎等)疗效显著^[11-14], 可推测硬水黄连中黄连碱和小檗碱的含量高于马尾连, 可能是其归肺经的原因所在。

综上所述, 所建立的方法简便快捷, 准确度高, 重复性和稳定性均较好, 可同时测定马尾连及硬水黄连提取物中木兰花碱、药根碱、黄连碱、小檗碱的含量。由研究结果推测, 可能正是这些成分的缺失及含量差异, 导致两者功效及药理作用不同。后期将进行更深入的分子学研究, 以期获得可靠性结论。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第3册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] 江志波. 贝加尔唐松草和大叶龙胆化学成分研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [3] 杨丽华, 姜红宇, 徐香琴. 高原唐松草中生物碱化学成分研究[J]. 广东化工, 2019, 46(20): 28.
- [4] 韩春红, 刘谦, 刘金花, 等. 唐松草属植物化学成分研究进展[J]. 农业科学与技术: 英文版, 2013, 14(1): 54-58.
- [5] 潘正, 高运玲, 蔡应繁. 短梗箭头唐松草化学成分研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 658-660.
- [6] 李运, 张彩霞, 徐雪梅, 等. 甘肃产马尾连药材质量标准提升研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(11): 1338-1342.
- [7] 翟红伟, 潘晓鹏, 舒光明, 等. 藏族药高原唐松草的质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 34-39.
- [8] 李圣各, 苏钰清, 马冬珂, 等. 唐松草属植物中生物碱类化学成分和药理作用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 312-321.
- [9] 罗甸, 吕娜, 廖凌敏, 等. 金丝马尾连中1个具有抗病毒活性的异喹啉新生物碱[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2568-2570.
- [10] 张铁焱, 吴玉霞, 莫佐红, 等. 19种常见中药材醇提物的体外抗菌活性筛选[J]. 广西植物, 2020, 40(12): 1712-1720.
- [11] 洪凌. 基于抑制PI3K/Akt/NF- κ B信号通路的黄连碱改善LPS诱导急性肺损伤的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [12] 洪翠柳, 王晓玲. 小檗碱对人非小细胞肺癌细胞迁徙转移的影响及其分子机制的研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 73-76.
- [13] 孟治平, 路曼琪, 苏文强, 等. 盐酸小檗碱粉雾剂的制备及其对金黄色葡萄球菌肺炎的作用研究[J]. 中草药, 2020, 51(2): 348-355.
- [14] 唐艳超. 小檗碱对减压病大鼠肺血管内皮细胞损伤的预防效果和机制分析[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.

(收稿日期: 2021-02-01)