

邱 刚, 芮亚培, 白 曲, 等. HPLC 法测定暗红小檗中小檗碱含量[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 299–300.

# HPLC 法测定暗红小檗中小檗碱含量

邱 刚, 芮亚培, 白 曲, 次仁美朵, 曲尼措姆, 索朗群宗, 格桑拉姆

(西藏农牧学院动物科学学院, 西藏林芝 860000)

**摘要:** 采用高效液相色谱法测定暗红小檗茎中盐酸小檗碱的含量。Welchrom C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈–0.03 mol/L 磷酸二氢钠(25 : 75)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 345 nm。结果表明, 回归方程  $y = 5\,099x + 107\,440$ , 相关系数  $r = 0.961$ , 盐酸小檗碱在 0.042 ~ 0.142 8 μg/mL 之间呈良好线性关系。平均加样回收率为 101.19%,  $RSD = 0.58\%$ 。本方法精确、高效, 适合用于生药材中药用成分含量测定, 经过比较, 暗红小檗中小檗碱含量较高, 可以作为当地小檗碱来源的替代品。

**关键词:** 高效液相色谱法; 暗红小檗; 小檗碱; 含量

**中图分类号:** S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)05–0299–02

暗红小檗(*Berberis agricola*)是小檗科小檗属植物, 是中国的特有植物。据记载, 暗红小檗以茎枝和根入药, 能治疗细菌性痢疾、肝炎、胃肠炎、中耳炎、咽喉炎、急性眼结膜炎等病症。小檗属是小檗科中最大的一个属, 全世界约有 500 种, 我国约有 200 种, 入药的有 50 种, 各省均有分布, 西南、西北等地区种类较多, 东北地区也有一定储量。在西藏, 暗红小檗主要生长于海拔 3 200 ~ 3 600 m 的路边山坡灌木丛中。

据记载, 暗红小檗根和茎内含小檗碱、木兰花碱等多种活性成分, 小檗碱为季胺型异喹啉类生物碱, 主要存在于小檗科植物小檗、毛茛科植物黄连、芸香科植物黄柏中, 俗称黄连素, 是应用非常广泛的从植物中提取出来的抗菌消炎药物, 对肠炎、痢疾、角膜炎等症疗效显著<sup>[1]</sup>。经研究发现有多种小檗科植物具有生理活性, 民间取根煎服, 为清热解毒的草药, 具有悠久的历史。该属植物均含有异喹啉类生物碱, 又多数含有小檗碱, 在我国西北、西南等地常常以其他小檗属植物代黄连、黄柏使用, 作为小檗碱成分的资源植物。据《西藏经济植物》记载, 西藏所产的小檗属植物大多小檗碱含量在 1% 以上, 高者达 4% 以上<sup>[2]</sup>。除小檗碱外, 研究认为小檗属植物提取物对心脑血管系统、血糖、肿瘤、肝脏等多方面具有药理作用<sup>[3]</sup>。

据报道黄连中小檗碱的含量采用 HPLC 法测定, 具体方法很多, 在实践中发现各有优缺点。为此, 笔者在综合分析黄连中小檗碱含量测定方法的基础上, 经过多次实践, 采用了乙腈–磷酸二氢钠流动相测定暗红小檗中盐酸小檗碱的含量。该法操作简便快速, 结果准确稳定, 重现性好, 成本较低, 值得推广使用。

## 1 材料

收稿日期: 2012–09–13

基金项目: 西藏农牧学院青年科研基金。

作者简介: 邱 刚(1981—), 男, 西藏林芝人, 硕士, 讲师, 主要从事兽医医药理及毒理方面研究。E-mail: 421916413@qq.com。

通信作者: 芮亚培(1981—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事新兽药开发方面研究。E-mail: 294624605@qq.com。

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦公司), Welchrom C<sub>18</sub> 色谱柱[月旭材料科技(上海)有限公司], BS214S 电子天平(德国 Satorius 公司), 粉碎机(旗箭), 微量移液器(艾本德), 棕色容量瓶, pH 计, KQ3200V 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药材

样品采自西藏林芝地区八一镇周边和工布江达县、米林县, 经西藏农牧学院兰小中、张华老师及笔者鉴定为暗红小檗。样品为经自然干燥的茎、叶。

### 1.3 试剂

乙腈: 色谱纯, 成都科龙化学试剂厂生产, 批号为 20101122; 甲醇: 色谱纯, 美国 fisher 公司生产; 磷酸二氢钠: 分析纯, 成都科龙化学试剂厂生产, 批号为 20100308; 盐酸小檗碱(*Bezefine hydrochloride*)对照品: 中国药品生物制品检定所生产, 批号 110713–200911, 含量为 86.8%。

### 1.4 色谱条件

色谱柱: Welchrom C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈–0.03 mol/L 磷酸二氢钠(25 : 75); 流速 1.0 mL/min, 检测波长 345 nm, 柱温 20 ℃。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备<sup>[1]</sup>

精确称取 100 ℃ 干燥 2 h 的盐酸小檗碱对照品 26.36 mg, 置 250 mL 烧杯中, 加沸水约 150 mL 溶解, 稍冷后加入 HCl 溶液 3 mL 搅匀, 冷却, 转移至 250 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 精确量取 2 mL 置 25 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 含盐酸小檗碱 8.4 μg)。

### 2.2 标准曲线的绘制

精确吸取盐酸小檗碱 5.0、7.0、11.0、13.0、17.0 μg 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进样测定, 以峰面积( $y$ )为纵坐标, 对照品浓度( $x$ )为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程为  $y = 607\,028 + 107\,440x$ ,  $r = 0.980\,3$ , 结果表明: 盐酸小檗碱在 0.042 ~ 0.142 8 μg/mL 之间呈良好线性关系。对照品色谱图见图 1, 5 次进样峰面积值与浓度的标准曲线见图 2。

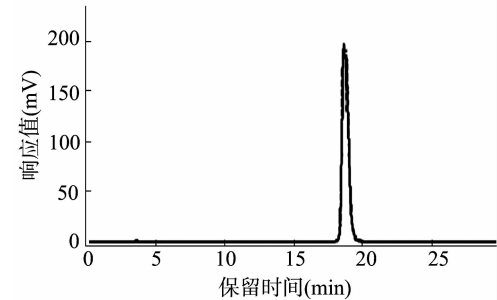


图1 对照品色谱图

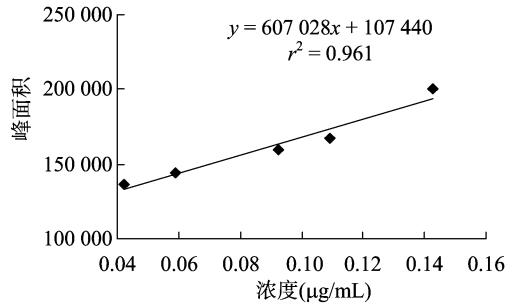


图2 标准曲线

2.3 供试品溶液的制备<sup>[3]</sup>

精确称取 0.25 g 暗红小檗茎粉置于 50 mL 磨口三角瓶中,加甲醇 20 mL 称重,浸泡 16 h,超声处理 30 min,用甲醇补足重量,过滤,取续滤液 10 mL 蒸干,用流动相定容在 25 mL 容量瓶中备用。供试品色谱图见图 3。

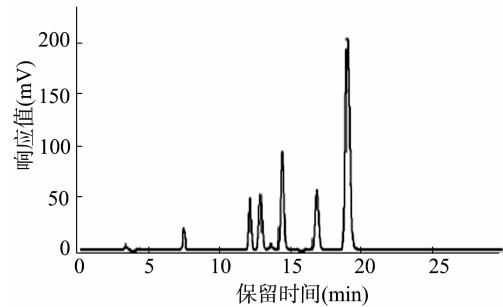


图3 供试品色谱图

2.4 精密度试验

精确吸取对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,重复 6 次,盐酸小檗碱峰面积 RSD = 1.3%,精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批药材,按“2.3”制备 5 份样品,测得盐酸小檗碱平均含量为 0.26%,RSD = 1.8%,表明本方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一批药材按“2.3”制备样品 1 份,分别于 0、1、2、4、8h 注入液相色谱仪中测定,盐酸小檗碱峰面积 RSD = 1.65%,稳定性良好。

2.7 加样回收率试验

精确称取 0.10 g 药材共 9 份,分别按照 80%、100%、

120% 加入盐酸小檗碱对照品,按“2.1”方法制备样品,每处理 3 次重复,并按上述色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果

加样量 (mg)	药材中小檗碱含量 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
0.212	0.245	0.450	98.5	0.25
	0.249	0.453	98.3	
	0.248	0.451	98.0	
	平均		98.27	
0.263	0.285	0.550	100.36	0.185
	0.283	0.549	100.55	
	0.286	0.553	100.73	
	平均		100.55	
0.348	0.287	0.662	104.25	1.29
	0.293	0.670	106.20	
	0.291	0.663	103.76	
	平均		104.74	

2.8 样品含量测定

取 3 批暗红小檗生药材,按上述样品制备项下操作,结果见表 2。

表 2 3 批暗红小檗中盐酸小檗碱含量测定结果

暗红小檗批次	平均含量 (%)	RSD (%)
2011-06-12	0.427	3.511 9
2011-07-19	0.45	3.605 6
2011-08-06	0.47	3.214 6

3 讨论

暗红小檗生药材中主要含小檗碱、药根碱、非洲防己碱、小檗红碱、小檗胺等成分,盐酸小檗碱含量采用化学滴定法、紫外分光光度计法等测定。但这 2 种方法误差比较大,经对比后,确定采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱的含量,并对其中具体方法进行了改进<sup>[3]</sup>。色谱条件和样品处理方法如前文所述,盐酸小檗碱与其他组成成分分离较好,试验重现性好,精密度好而且回收率高。

经过比较,暗红小檗中小檗碱含量较高,可以作为西藏药用小檗碱来源之一<sup>[4-5]</sup>。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:二部[M]. 2005 版. 北京:中国农业出版社,2005.  
[2] 倪志诚. 西藏经济植物[M]. 北京:北京科学技术出版社,1990.  
[3] 徐正余. 西藏科技志[M]. 西藏:西藏人民出版社,1995.  
[4] 杨朝莲,冯 华,张运杰,等. HPLC 法测定三棵针中盐酸小檗碱的含量[J]. 贵阳中医学院学报,2005,25(3):57-58.  
[5] 张 琦,田淑琴,郑丽琴,等. 藏药小檗皮中小檗碱的含量测定[J]. 中国民族医药杂志,2000,6(3):41-42.