

· 质量分析研究 ·

数码扫描薄层色谱影像直接测定黄连提取物中 4 种生物碱含量

郭隆钢¹, 孙 帅², 谢培山¹, 徐新军³, 王锐银¹(1. 广东优力生物科技发展有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广州万正药业有限公司, 广东 广州 510663; 3. 中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立直接数码扫描薄层色谱的影像, 利用计算机软件测定黄连提取物中巴马汀、小檗碱、表小檗碱、黄连碱含量的新方法。 **方法** 薄层色谱的制备: 硅胶高效薄层板; 展开剂为乙酸丁酯: 甲醇: 异丙醇: 氨水(25 % ~ 28 %)=5 : 2 : 1.5 : 1.2; 定量操作获得荧光薄层色谱经摄像获取色谱的影像, 经专业软件数码扫描, 替代常规薄层色谱需采用薄层扫描仪定量的测定方法, 利用获取的色谱中小檗碱、巴马汀、表小檗碱、黄连碱斑点的积分值, 直接外标法同时测定含量。 **结果** 经精密度、准确度、重复性测试, 结果符合方法学验证的技术要求。与液相色谱测定的数据比较完全具有可比性。 **结论** 用自编计算机软件(‘digiscan’)作为虚拟扫描仪进行数码扫描薄层色谱的影像(薄层色谱视觉数据的永久记录), 通用软件 Origin Pro 积分, 外标法计算含量, 不需要昂贵的薄层色谱扫描仪, 即可进行含量测定, 通过黄连提取物中 4 种生物碱的含量测定, 证明这一替代方法用于中药有效成分含量测定的可行性。本法最大优点是不需要昂贵的薄层扫描仪, 依靠软件操作, 薄层色谱的影像可长期保存, 测定不受时间和地点的限制, 检测成本效益高。符合中药指标成分含量测定的需求, 有推广应用的价值, 尤其适合生产企业的全程检验、新药研发过程检验及市场商品的检验。

关键词: 黄连生物碱; 小檗碱; 巴马汀; 黄连碱; 表小檗碱; 数码扫描薄层色谱图像; 含量测定

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0092-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.022

Quantitative Determination of Four Alkaloids in Extractive of Rhizoma Coptidis by Direct Digital Scanning of Thin Layer Chromatogram

GUO Longgang¹, SUN Shuai², XIE Peishan¹, XU Xinjun³, WANG Ruiyin¹(1. Guangdong Union Biotechnology Development Co., Ltd., Guangzhou 510663 Guangdong, China; 2. Guangdong ImVin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510663 Guangdong, China; 3. College of Pharmacy, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a method of direct digital scanning of thin layer chromatogram integrated with professional software for quantitative determination of four alkaloids (palmatine, berberine, coptisine, epiberberine) in extractive of Rhizoma Coptidis. **Methods** Thin layer chromatography(TLC) was conducted on pre-coated Silica gel 60 high performance TLC plate, developing with the solvent system of n-butyl acetate, methanol, isopropanol and ammonia (25 % -28 %) in the proportion of 5 : 2 : 1.5 : 1.2. The available TLC image was photographed under visualization device, and the TLC image of the four alkaloids was scanned and analyzed by self-developed professional software “Digiscan” and commercial software “Origin pro”. The contents of four alkaloids of palmatine, berberine, coptisine, epiberberine were also detected by direct external standard method. **Results** The accuracy, repeatability and reproducibility of the established method were complied with the requirements of the methodology validation. The

收稿日期: 2014-10-20

作者简介: 郭隆钢, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量控制。Email: 472311573@qq.com。通讯作者: 谢培山, 主任药师, 研究方向: 质量分析方法研究及质量标准制订。Email: xiepsnew@163.com; 徐新军, 副教授, 研究方向: 中药、化学药品、生物技术药物质量标准及稳定性研究。Email: xxj2702@sina.com。

results were compatible with those of the HPLC. **Conclusion** Digital scanning of thin layer chromatogram integrated with professional software is feasible for the quantitative determination of four alkaloids (palmatine, berberine, coptisine, epiberberine) in extractive of Rhizoma Coptidis. With home-developed software ('*digiscan*') as virtual scanner and by scoring the peak area and calculating the content by means of 'Origin Pro' software without need of the expensive professional TLC Scanner, the established method shows good prospect for the determination of effective components in Chinese medicine. It can be expected to be used as the alternative method of quantitative TLC analysis for quality control of herbal drugs for it is convenient, economical, practical (it can be performed at anytime and anywhere), and so it would be especially suitable for manufacture process quality control and marketing quality supervising.

Keywords: Alkaloids of Rhizoma Coptidis; Berberine; Palmatine; Coptisine; Epi-berberine; Digital scanning of thin layer chromatogram; Content determination

黄连主要生物碱^[1-2]的含量测定已屡有报道。1995 年版以前的《中国药典》是采用薄层色谱定量测定小檗碱方法, 由于黄连以小檗碱为主的系列生物碱在紫外光 366 nm 下可激发黄色荧光, 灵敏度较紫外吸收高 3 倍以上, 基线平稳、分离度好, 很适合薄层扫描定量, 但其后因崇尚 HPLC 法而被修改^[3-9]。在日常质量检测及研发新药或生产厂家的生产过程检验的实际应用中, 简单、快速、灵敏、准确仍然是值得优先考虑的问题。一味追求“高精尖”的趋势, 并不一定适合中药材的实际需要以及中药企业界的期望。薄层色谱用于黄连生物碱含量测定依然值得关注。薄层色谱产生的色谱图像是不同于柱色谱的突出特点, 色谱展开的各个化学成分的浓度可以在薄层扫描仪积分, 外标法测量得出定量的数据信息, 再经回归计算得出含量。在此基础上, 我们联想到将薄层色谱拍摄的图谱影像实际上就是该色谱图像的“永久数据库”。利用计算机软件不需要薄层色谱扫描仪对此影像进行同样原理的扫描、积分和外标法测量和计算应该得出同样的结果。本研究采用自编软件数码扫描按照含量测定要求制备的薄层色谱的图像, 再经通用软件积分、定量。如此, 在薄层色谱鉴别实验的基础上, 只需按照定量操作的要求, 可以获得与 HPLC 方法有可比性的测定结果, 不失为一种实用的方法选择。

1 仪器与试药

1.1 仪器 薄层色谱半自动点样仪(Linomat 5)、薄层色谱摄影仪(TLC visualizer), 瑞士 CAMAG 公司; 薄层色谱双槽展开缸(Twin trough chamber), 上海信宜仪器厂有限公司。

1.2 试药 乙酸丁酯(批号: 20120201-1)、甲醇(批

号: 20120401-2)、异丙醇(批号: 20111201-1) 分析纯, 天津大茂化学试剂厂; 氨水, 批号: 20120201-2, 分析纯(浓度 25 %~28 %), 广州化学试剂厂; 香草醛(Vanillin), 天津福晨化学试剂厂; 盐酸小檗碱(Berberine HCl)、盐酸巴马汀(Palmatine HCl)、黄连碱(Coptisine)、表小檗碱(epiberberine), 标示纯度 $\geq 98\%$, 四川维克奇生物科技有限公司; 黄连提取物, 本实验室制备。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱实验条件

2.1.1 供试品制备 标准提取物溶液取 25 mg 黄连标准提取物, 加入 50 mL 甲醇, 超声提取 15 min, 定容至 50 mL, 溶液过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液作为标准提取物溶液。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取盐酸巴马汀(PalmatineHCl)、盐酸小檗碱(BerberineHCl)、黄连碱(Coptisine)、表小檗碱(epiberberine)对照品, 加甲醇分别配制成 0.027, 0.055, 0.010, 0.024 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液即得。

2.1.3 展开条件 薄层板: HPTLC 硅胶 60 板(Merck)。展开剂: 乙酸丁酯: 甲醇: 异丙醇: 氨水 = 5 : 2 : 1.5 : 1.2; 展开缸加入展开剂后预平衡 15 min, 再放入薄层板展开。展开: 上行 8 cm。温度: 约 20 $^{\circ}\text{C}$; 相对湿度: 45 % ~ 50 %。检视: 展开后在空气中尽量挥干表面溶剂, 将薄层板放置在五氧化二磷真空干燥箱中干燥 1 h, 取出, 在薄层色谱摄影仪(Visualization Device, CAMAG)UV 366 nm 下检视荧光色谱并拍摄影像, 存档备用, 见图 1。

2.2 图像的处理及数据分析 将得到的薄层色谱影像

用自编软件“Digisacan”进行数码扫描,得到原始数据后导入 OriginPro 软件中进行制图和积分,用 Excel 计算结果。

2.3 线性关系考察 得到 4 种生物碱的线性回归方程分别为:盐酸巴马汀: $y=508408x-4206.4$ $r^2=0.9990$; 盐酸小檗碱: $y=537721x-2340$ $r^2=0.9991$; 表小檗碱: $y=1963775x-7464.6$ $r^2=0.9995$; 黄连碱: $y=1802452x-11119.7$ $r^2=1.0000$ 。线性范围:盐酸巴马汀 0.013~0.079 μg , 盐酸小檗碱 0.027~0.135 μg , 表小檗碱 0.005~0.025 μg , 黄连碱 0.012~0.047 μg 。定量限为盐酸巴马汀 0.013 μg , 盐酸小檗碱 0.027 μg , 表小檗碱 0.005 μg , 黄连碱 0.012 μg 。

2.4 重复性考察 将 4 种生物碱的供试液点样量为 1.5 μL 点 5 个条带,按照上述方法操作记录“Origin Pro 7.5”中所得的积分面积,盐酸巴马汀 RSD 为 2.10 %; 盐酸小檗碱 RSD 为 0.32 %; 表小檗碱 RSD 为 1.35 %; 黄连碱 RSD 为 0.63 %。表明精密度良好。

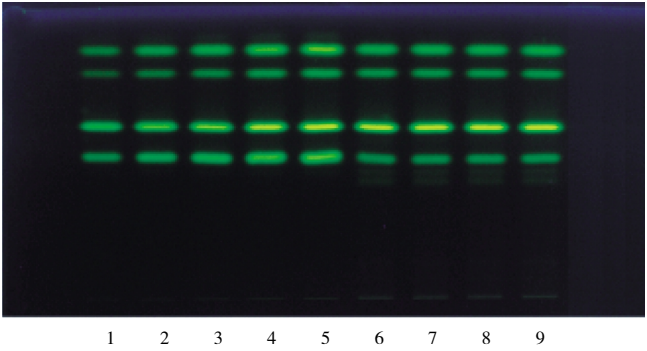
2.5 加样回收实验 按照 2.1 项中方法制备黄连提取物以及 4 种生物碱对照品的供试品溶液,点样量为黄连提取物 2 μL , 盐酸巴马汀 1.5 μL , 盐酸小檗碱 2.5 μL , 表小檗碱 1.5 μL , 黄连碱 1.5 μL 。平行 3 份,同板测定加样回收率见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=3)

Table 1 Recovery of 4 alkaloids							
化学成分	编号	加样前/g	加样后/g	加样量/g	回收率/%	平均值/%	RSD/%
巴马汀	1	0.0350	0.0830	0.0405	109.84	109.74	0.49
	2	0.0350	0.0833	0.0405	110.22		
	3	0.0350	0.0825	0.0405	109.16		
小檗碱	1	0.1380	0.2596	0.1375	94.22	94.46	1.28
	2	0.1380	0.2573	0.1375	93.39		
	3	0.1380	0.2639	0.1375	95.76		
表小檗碱	1	0.0195	0.0349	0.0156	99.45	101.09	1.89
	2	0.0195	0.0362	0.0156	103.20		
	3	0.0195	0.0353	0.0156	100.63		
黄连碱	1	0.0320	0.0662	0.036	97.35	98.76	1.40
	2	0.0320	0.0672	0.036	98.80		
	3	0.0320	0.0681	0.036	100.12		

2.6 黄连提取物含量测定结果 用薄层色谱图像数码扫描定量法测得黄连提取物中 4 种生物碱的含量,巴马汀为 4.19 %, 小檗碱为 16.51 %, 表小檗碱为 2.33 %, 黄连碱为 3.83 %。

存档的薄层色谱影像用自编软件“Digiscan”进行扫描,得到扫描图像,见图 2 及图 3。原始数据,数据输入“Origin Pro75”软件进行积分,所得积分



对照品: 1. 盐酸巴马 0.5 μL + 盐酸小檗碱 1.0 μL + 表小檗碱 0.5 μL + 黄连碱 0.5 μL ; 2. 盐酸巴马汀 0.8 μL + 盐酸小檗碱 1.3 μL + 表小檗碱 0.8 μL + 黄连碱 0.8 μL ; 3. 盐酸巴马汀 1.0 μL + 盐酸小檗碱 1.5 μL + 表小檗碱 1.0 μL + 黄连碱 1.0 μL ; 4. 盐酸巴马汀 1.3 μL + 盐酸小檗碱 1.8 μL + 表小檗碱 1.3 μL + 黄连碱 1.3 μL ; 5. 盐酸巴马汀 1.5 μL + 盐酸小檗碱 2.0 μL + 表小檗碱 1.5 μL + 黄连碱 1.5 μL 。供试品: 6~9, 黄连提取物 1.5 μL 。
(温度: 20 $^{\circ}\text{C}$; 相对湿度: 50 %)

图 1 黄连提取物含量测定图谱

Figure 1 Determination of four alkaloids in extractive of Rhizoma Coptidis(t: 20 $^{\circ}\text{C}$; RH: 50 %)

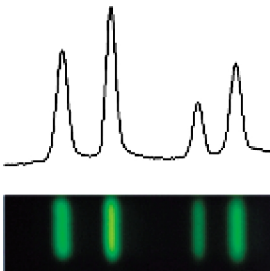


图 2 盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、表小檗碱、黄连碱(从左到右)薄层数码扫描图谱

Figure 2 The digiscan chromatogram of four alkaloids(palmatine, berberine, coptisine, epiberberine)

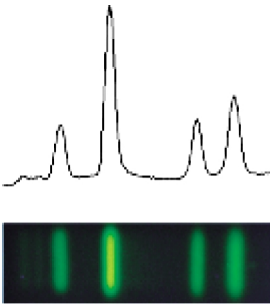


图 3 黄连提取物薄层数码扫描图谱

Figure 3 The digiscan chromatogram of Rhizoma Coptidis

数据以 4 个生物碱的对照品为外标,计算结果。测定结果与用 HPLC 法测定结果比较,结果见表 2。

3 讨论

本研究中展开剂中所用的氨水应保证 25 %以上

表 2 薄层图像扫描定量(HPTLC)及高效液相色谱(HPLC)法测定黄连提取物的结果比较

Table 2 Comparison of the four alkaloids contents determined by HPTLC and HPLC

检测方法	巴马汀 /%	小檗碱 /%	表小檗碱 /%	黄连碱 /%
HPTLC 法(n=4)	4.19	16.51	2.33	3.83
HPLC 法	4.18	15.93	2.23	3.80
RSD/%	0.17	2.53	3.10	0.56

的浓度。展开后挥干板面残存的展开剂，将薄层板放置在五氧化二磷真空干燥箱中干燥 1 h 以上，保证薄层板的干燥。应保持板面的干净无灰尘、纤维等，以免干扰下一步的测定。薄层色谱图像的影像的质量应尽量调整到与肉眼观察的实际情况一致。显然获得质量上乘的薄层色谱是最基本的保证。

处理过的图像用自编软件“digisacan”数码扫描图谱。得到扫描数据，于“Origin Pro 7.5”中绘图并积分，数据用 Excel 表格处理并计算结果。初步实验证明本文介绍的方法可行，并着手进一步编写一站式软件。

综上所述，利用薄层色谱拍摄的影像通过相关软件进行数码扫描，积分及外标法测定黄连提取物中巴马汀、小檗碱、表小檗碱、黄连碱的含量，经方法学验证符合含量测定的要求。所得结果与 HPLC 所测的结果极为接近，RSD 分别 0.17 % ~ 3.10 %。此方法

简便、低成本，不需要薄层色谱扫描仪，灵敏度高，色谱影像分析检验不受时间地点限制，适合生产过程检测、新药研发过程检验及市场商品的快速检验。

致谢：薄层色谱扫描软件“Digiscan”由杜若骝工程师开发。

参考文献：

[1] 钟国跃, 黄小平, 马开森, 等. 我国黄连(味连)质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 495-497.

[2] Yan D, Jin C, Xiao XH, et al. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2008, 70(6): 845-849.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 285-286.

[4] 李信炯, 胡晓林, 杨世华, 等. 黄连薄层鉴别及其生物碱扫描测定[J]. 中成药, 1987, 9(1): 12.

[5] 叶玉兰, 赵苹苹, 罗泽澜. 黄连及其炮制品中 5 种生物碱含量测定[J]. 中成药, 1996, 18(3): 16.

[6] 刘法锦, 孙冬梅, 鲁佳慧, 等. 薄层色谱扫描法测定黄连吴茱萸药对中黄连生物碱的含量[J]. 中成药, 2010, 32(1): 75-79.

[7] 于玥, 张考飞, 李军, 等. 保健食品中添加小檗碱的检测方法研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 36(9): 1551-1554.

[8] 李威, 肖轶雯, 邱细敏, 等. 2D - HPLC 结合捕集柱同时测定黄连药材中 6 个生物碱[J]. 药物分析杂志, 2014, 37(4): 654-658.

[9] 胡俊辉. 干姜黄芩黄连人参汤中 11 种药效成分的 RP-HPLC 测定[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(1): 77-81.

(编辑：邓响潮)

陈皮姜软胶囊质量标准研究

韩 亮, 刘昌辉, 宓穗卿, 王宁生(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要：目的 建立中药复方制剂陈皮姜软胶囊的质量标准。方法 采用 TLC 法鉴别陈皮姜软胶囊中干姜；用高效液相色谱法对制剂中 6-姜酚进行定量分析。结果 定性鉴别分离度好，专属性强；6-姜酚的含量测定线性范围为 42.08 ~ 420.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$, $n=6$)，平均回收率为 100.80 % (RSD=1.33, $n=6$)。结论 所建立之方法准确可靠、灵敏度高、专属性强，可有效控制陈皮姜软胶囊的质量。

关键词：陈皮姜软胶囊；质量标准；高效液相色谱；6-姜酚

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1003-9783(2015)01-0095-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.023

收稿日期：2014-10-22

作者简介：韩亮, 男, 博士研究生, 研究方向：中药有效性及安全性评价和药物代谢动力学研究。Email: hanliang72@126.com. 通讯作者：王宁生, 教授, 博士生导师, 研究方向：中药有效性及安全性评价和药物代谢动力学研究。Email: nswang@gzucm.edu.cn.

基金项目：国家自然科学基金项目(81403179)；广东省教育厅育苗工程资助项目(2013LYM_0046)。