

白毛茛中生物碱的提取和 HPLC 分析

Holly A Weber¹ Maureen Joseph²

¹(Midwest Research Institute 425 Volker Blvd, Kansas City, MO 64110, USA)

²(Agilent Technologies, Inc 2850 Centerville Road, Wilmington, DE 19808-1610, USA)

摘要 白毛茛根粉未经室温萃取后用 HPLC 分析其中的生物碱成分, 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C18 快速分离, 该方法可准确测定白毛茛中主要的生物碱, 包括小檗碱(berberine)和白毛茛碱(hydrastine)。萃取和 HPLC 分析还可用于其他几种生物碱的测定, 包括氢化小檗碱(canadine)、白毛茛分碱(hydrastinine)和巴马亭(palmatine), 也可以应用于其它含小檗碱的植物根。Eclipse XDB-C18 快速分离柱采用等梯度分离, 所有组分在 15min 内获得了高的分离度。

关键词 生物碱提取, HPLC 分析

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0306-03

白毛茛属于 *Hydrastis canadensis* L., 是最老的草药植物之一, 作为天然药物正在受到人们的关注。在白毛茛中存在 2 种具有活性的生物碱, 即小檗碱和白毛茛碱。氢化小檗碱、白毛茛分碱、5-羟基小檗碱和 canadine 是含量很小的生物碱。巴马亭与小檗碱密切相关, 但在 *H. canadensis* 中未检测到, 而在另一种含有小檗碱的植物黄连 *Coptis* 中却检测到了巴马亭^[1]。

白毛茛已经用作消炎药和抗生素。也用作治疗鼻充血、感冒、流感和各种肠紊乱。植物的整个根部入药, 目前市售的有散装药(干燥或粉末化的根部)、片剂、胶囊和药酒。白毛茛植物已经被过度采收, 现在许多白毛茛只能在农场生长以作为草药的补充来源。在作为草药补充物的销售产品中生物碱的含量是不一致的。故迫切需要一种简单的方法来萃取和分析生物碱, 以便评估产品的质量。图 1 所示为白毛茛中生物碱的化学结构。

1 实验部分

1.1 萃取步骤

有文献^[1,2]报道在室温下从 *H. canadensis* 中萃取生物碱是可行的。然后用 HPLC 对生物碱萃取物进行精确定量分析。以下步骤总结了用于分析纯白毛茛根部粉末的最优化室温萃取条件。

- (1) 称取约 0.5 g 的根部粉末;
- (2) 加入 100 mL 的乙腈:水:H₃PO₄(70:30:0.1, V/V/V) 的混合液;
- (3) 超声波处理 5 min, 振荡(手腕摇动)10 min, 离心 5 min;
- (4) 5 倍稀释萃取物;

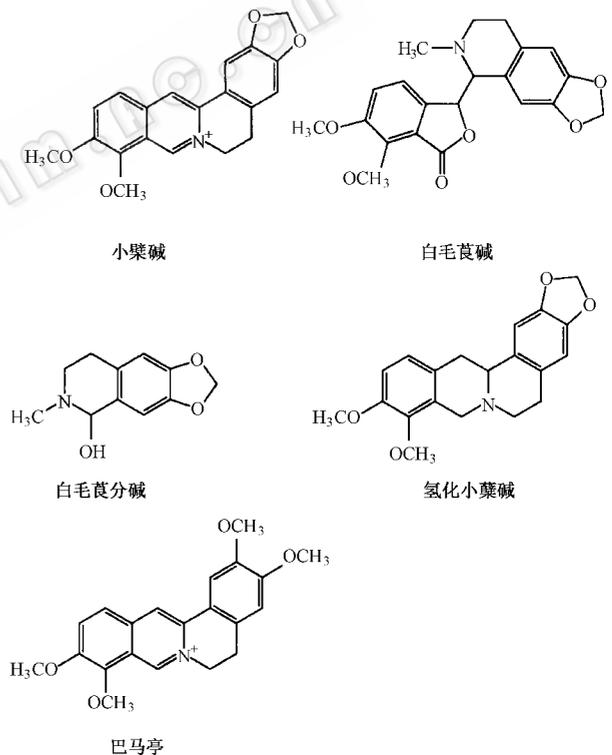


图 1 白毛茛及相关植物中主要生物碱的结构

Fig.1 Structures of key alkaloids in goldenseal and related plants

(5) 对稀释萃取物直接进行 HPLC 分析。

1.2 HPLC 分析

对白毛茛中生物碱进行 HPLC 分析, 要求能够分离主要的生物碱。另外, 还希望能分离巴马亭, 因为它存在于其它含有小檗碱的植物中。我们开发了一种 HPLC 方法能够分离所有这些组分。采用 Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱, 乙酸

铵缓冲液和乙腈混合流动相,可得到最优化的分离度和峰形。图 2 显示分离的结果,同时列出了所采用的全部优化分离条件。为获得一致的保留时间,温度控制在 30°C [3]。

1.3 方法认证

此 HPLC 方法用于室温萃取法的认证。研究了生物碱的线性、精密性和回收率。表 1 列出了这些结果。方法的

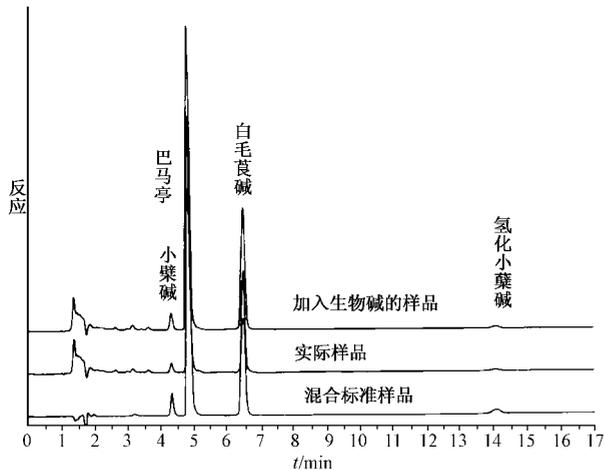


图 2 白毛茛萃取物在 Eclipse XDB-C18 色谱柱上的 HPLC 分离结果

Fig.2 HPLC separation of goldenseal extract on Eclipse XDB-C18 column

精密性是优异的,不同生物碱的回收率范围在 $92\% \sim 102\%$,对于定量分析也是优异的。线性很好(图 3),灵敏度良好。从标准样品的数据计算的小檗碱的检测限(LOD)为 0.50 mg/mL ,定量限(LOQ)为 1.65 mg/mL 。所以,可以对很低的含量进行精确定量,使之易于测试不同白毛茛产品的质量。

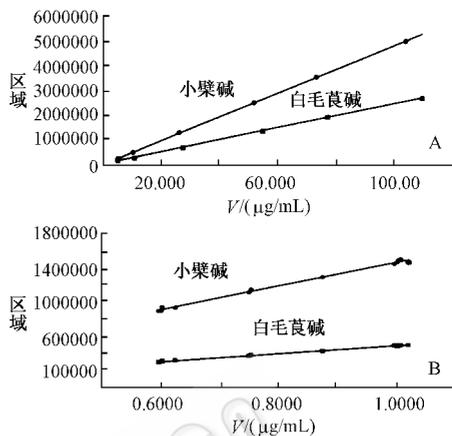


图 3 小檗碱和白毛茛碱标准样品以及白毛茛萃取物中小檗碱和白毛茛碱的线性

Fig.3 Linearity of berberine and hydrastine as standards and from goldenseal extracts

表 1 室温萃取方法的认证结果

Table 1 Validation Results of the Ambient Extraction Method

| | 巴马亭 | 小檗碱 | 白毛茛碱 | 氢化小檗碱 |
|--|--|--|--|---|
| 精密性 ($n = 10$) | $0.18 \pm 0.002 (s) \%$ | $3.06 \pm 0.05 (s) \%$ | $2.04 \pm 0.01 (s) \%$ | $0.08 \pm 0.001 (s) \%$ |
| 生物碱回收率 ($\sim 0.3 - 2 \text{ g}$ of GS) ($\sim 0.6 - 1 \text{ mg/mL}$) ($n = 12$) | $0.18 \pm 0.003 (s)$ | $3.10 \pm 0.06 (s) \%$ | $2.05 \pm 0.02 (s) \%$ | $0.08 \pm 0.001 (s) \%$ |
| 标准加入和回收率 ($n = 3$) | 加入量 = $\sim 0.15\%$ $92.2 \pm 5.5 (s) \%$ | 加入量 = $\sim 2.0\%$ $101.5 \pm 0.2 (s) \%$ | 加入量 = $\sim 2.0\%$ $101.9 \pm 0.2 (s) \%$ | 加入量 = $\sim 0.10\%$ $101.9 \pm 7.9 (s) \%$ |

(s) = 标准偏差

1.4 结果

白毛茛测定室温萃取和 HPLC 分析方法用于测定来自 3 个不同供货商的 6 批白毛茛根部粉末样品中的生物碱含量,结果列于表 2。这些结果说明来自不同供货商的样品的质量是不同的,也说明需要一个很好的 HPLC 定量分析方法。

2 结论

室温萃取法分析白毛茛是简便而可靠的,然后用 Zorbax Eclipse XDB-C18 快速分离色谱柱进行等梯度 HPLC 分析,在 15min 内获得了 6 种生物碱的分离,分离度高,峰形好。该分析方法提供了白毛茛中生物碱,包括小檗碱和白毛茛碱含量

的可靠定量结果。该方法已用于分析来自不同供货商的白毛茛,也可以用于其它含小檗碱植物的分析。

致谢

本工作由下列人员完成:

美国中西部研究所的 Holly A. Weber, Matthew K. Zart, Andrew E. Hodges, Kellie D. White, Roger K. Harris, 和 Alice P. Clark, 通讯地址: Midwest Research Institute, 425 Volker Blvd, Kansas City, MO 64110.

国家毒物学项目组的 Diane Overstreet 和 Cynthia Smith, 通讯地址: National Toxicology Program, 111 Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709.

表 2 用室温萃取法和 HPLC 对多批来自于不同供货商的白毛茛根部粉末进行测试的结果

Table 2 Results of testing goldenseal root powder from multiple lots and multiple vendors with the ambient extraction method and HPLC

| 供货商 | 批号 | 巴马亭/% | 小檗碱/% | 白毛茛碱/% | 氢化小檗碱/% | 已知生物碱的总含量/% |
|-----|----|-------|-------|--------|---------|-------------|
| 1 | A | nd* | 3.27 | 2.36 | 0.09 | 5.94 |
| | B | nd | 3.29 | 2.40 | 0.07 | 5.98 |
| 2 | C | 0.19 | 3.01 | 1.99 | 0.09 | 5.53 |
| | D | 0.18 | 3.06 | 2.04 | 0.08 | 5.36 |
| 3 | E | nd | 4.60 | 4.06 | 0.12 | 8.99 |
| | F | nd | 3.93 | 2.67 | 0.20 | 6.93 |

* nd = 未检测到

本研究由国家环境卫生科学研究所(National Institute of Environmental Health Sciences)资助 ,合同号 N01-ES-55385 and N01-ES-05457.

若需要更多的信息 请访问我们的网站 :www.agilent.com/chem.

Extraction and HPLC Analysis of Alkaloids in Goldenseal

Holly A Weber¹ Maureen Joseph²

¹(Midwest Research Institute 425 Volker Blvd Kansas City , MO 64110 USA)

²(Agilent Technologies , Inc 2850 Centerville Road Wilmington , DE 19808 - 1610 USA)

Abstract An ambient extraction of goldenseal root powder followed by HPLC analysis of the alkaloids on a Zorbax Rapid Resolution Eclipse XDB-C18 column provides an accurate method for the determination of key alkaloids in goldenseal , including berberine and hydrastine . The extraction and HPLC analysis can be applied to several other alkaloids , including canadine , hydrastinine , and palmatine , and may be applicable to other berberine-containing plant roots . The Rapid Resolution Eclipse XDB-C18 column is used for an isocratic separation with high resolution of all components in under 15 minutes .

Key words extraction alkaloids , HPLC analysis

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>