

# 复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定

席桂同 陈述

(中国中医科学院西苑医院,北京海淀,100091)

**摘要** 目的:建立测试黄连素片中盐酸小檗碱含量的高效液相方法,并对此方法进行系统的方法学验证,以确保应用该方法测试的结果准确、可靠。方法:采用色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent, 美国),流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(45:55,含5%的0.05 mol/L 庚烷磺酸钠溶液),检测波长为265 nm。结果:盐酸小檗碱在2.5~80 μg/mL 范围内线性关系良好,得到线性回归方程为  $Y = 421.5X + 17.32$ ,相关系数为0.9997( $n = 6$ );低、中、高浓度批内精密度的RSD值分别为0.30%、0.58%、0.30%,批间精密度的RSD为0.80%;重复性RSD为0.27%;低、中、高浓度的加样回收率分别为99.66%、99.88%、99.98%;供试品溶液室温放置8h稳定,RSD为0.41%。结论:本方法测定黄连素片中盐酸小檗碱的含量准确、可靠,操作简单、用时短,可用于黄连素片中盐酸小檗碱的含量测定。

**关键词** 高效液相色谱法;盐酸小檗碱;黄连素片;含量测定

## Content Determination of Berberine Hydrochloride in Compound Berberine Tablets

Xi Guitong, Chen Shu

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**Abstract Objective:** To establish the HPLC method to determine content of berberine hydrochloride in Berberine Tablets, and to ensure the results are accurate and reliable by systematical testing methodology. **Methods:** The chromatographic column: Agilent TC-C<sub>18</sub> column (4.6 × 150 mm, 5 μm, Agilent, America), mobile phase: acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (0.05 mol/L sodium heptanesulfonate solution 45:55, 5%), the detection wavelength was 265nm. **Results:** The berberine hydrochloride in 2.5 μg · mL<sup>-1</sup> - 80 μg · mL<sup>-1</sup> linear relationship was good, and the linear regression equation was  $Y = 421.5X + 17.32$ , and correlation coefficient was 0.9997 ( $n = 6$ ); low, high concentration within batch precision values of RSD were 0.30%, 0.58%, 0.30%, inter batch precision RSD was 0.80%; repeatability RSD was 0.27%; the low, recoveries, in high concentrations were 99.66%, 99.88%, 99.98%; the test solution was placed at room temperature for 8h, and RSD was 0.41%. **Conclusion:** This method for determination of berberine hydrochloride in tablet of berberine is accurate and reliable with simple operation and short time. It can be used for content determination of berberine hydrochloride in tablets of berberine.

**Key Words** HPLC; Berberine hydrochloride; Berberine Tablets; Content determination

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.025

复方黄连素片是由盐酸小檗碱、木香、吴茱萸、白芍等几味中药组成的复方制剂,是一种临床常用药,用于治疗湿热痞满,呕吐泻痢,高热口渴,疔毒脓肿,目赤牙痛,心火力盛,心烦不寐,血热吐衄等<sup>[1]</sup>。盐酸小檗碱为毛茛科植物黄连根茎中所含的一种主要生物碱<sup>[2]</sup>,可由黄连、黄柏或三棵针中提取,也可人工合成。本品对细菌只有微弱的抑菌作用,但对痢疾杆菌、大肠杆菌引起的肠道感染有效<sup>[1]</sup>。笔者采用高效液相方法建立了实用、准确、可靠的盐酸小檗碱含量检测方法,通过方法学验证,该方法回收率、准确度及重现性均为良好,具体叙述如下。

## 1 实验材料

1.1 仪器与设备 岛津265型紫外分光光度计; Agilent 1290型高效液相色谱仪(配有脱气机、自动

进样器、恒温箱、液相色谱泵、柱温箱及荧光检测器),由 Chemstation 化学工作站系统控制(Agilent, 德国);METTLER TOLEDO AB135-S型十万分之一天平(METTLER, 瑞士);XW-80A涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂);TGL16M型冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司);AHL-2001-P痕量型分析型超纯水机(艾科浦,重庆颐洋企业发展有限公司)。

1.2 试药与材料 盐酸小檗碱对照品:由中国药品生物制品检定研究院提供,批号:0731-200507;黄连素片:由四川某股份有限公司提供,批号:140210、140212、140214、140217、140219;磷酸二氢钾:天津科密欧化学试剂有限公司,分析纯,批号:131126;乙腈:美国Tedia公司,色谱纯,批号:1210574;纯水:自制去离子超纯水。

## 2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent, 美国);保护柱:Gemini C<sub>18</sub>(4 mm × 3.0 mm, 10 μm, Phenomenex, 美国);流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(45:55, 含5%的0.05 mol/L 庚烷磺酸钠溶液);流速:1.2 mL/min;柱温:35℃;进样量:5 μL。检测波长265 nm。

### 2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取盐酸小檗碱对照品50 mg(称量前需将盐酸小檗碱对照品于100℃干燥至恒重),置于50 mL容量瓶中,加适量50%乙腈水溶液溶解后,再用流动相50%乙腈水溶液稀释至刻度线,摇匀,即得浓度为1 mg/mL的盐酸小檗碱对照品储备溶液,置于4℃冰箱保存。

2.2.2 供试品溶液的配制 取黄连素片10片,精密称定,研碎,精密称取适量(约含盐酸小檗碱5 mg),置于带塞锥形瓶中,加入约20 mL 50%乙腈水溶液,超声处理0.5 h,充分摇匀,冷却至室温,完全转移至50 mL的容量瓶中,再用50%乙腈水溶液定容至刻度线,摇匀。精密移取进样前5 mL上述溶液至50 mL的容量瓶中,用流动性定容至刻度线,充分摇匀,再用0.45 μm的微孔滤膜过滤后,取续滤液进样5 μL。

2.2.3 阴性对照液 制备缺少黄连的空白黄连素片(盐酸小檗碱成分以基质代替,其余处方同复方黄连素片),再按“2.2.2 供试品溶液的配制”项下方法,配制成阴性样品溶液。

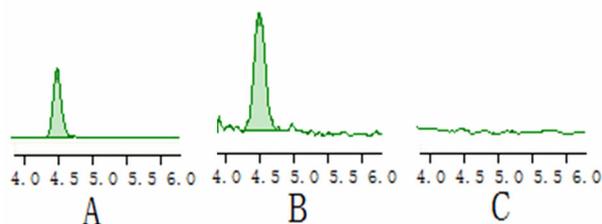
## 3 结果

3.1 检测波长的选择 以流动相作为空白对照,将盐酸小檗碱对照液和供试品溶液在紫外分光光度计上扫描,扫描区间为200~300 nm,结果得出,盐酸小檗碱在265 nm处显示有最大吸收。因此,选择265 nm作为检测波长。

3.2 系统适用性与专属性考察 分别取盐酸小檗碱对照品溶液、阴性对照液、供试品溶液适量,在上述色谱条件下进样20 μL。记录并观察3份溶液的色谱图。结果得出,盐酸小檗碱峰的理论塔板数不低于3 000,阴性对照液中无干扰峰干扰测定,对照液与供试液中盐酸小檗碱峰的保留时间一致,盐酸小檗碱峰周围无干扰峰,基质不干扰测定,本方法专属性好。典型色谱图如下图1所示。

3.3 线性关系考察 精密移取浓度为1 mg/mL的盐酸小檗碱对照品储备溶液适量,用流动相逐级稀释成含盐酸小檗碱浓度为80、40、20、10、5、2.5 μg/

mL等6个浓度级别的系列对照品工作溶液,进样5 μL。记录各浓度盐酸小檗碱对照液的峰面积。结果得出,盐酸小檗碱在2.5~80 μg/mL范围内线性关系良好,以盐酸小檗碱浓度为横坐标,所得峰面积为纵坐标,得线性回归方程为 $Y = 421.5X + 17.32$ ,相关系数为0.999 7(n=6)。



A 对照品溶液 B 供试品溶液 C 阴性对照液

图1 专属性考察图谱

3.4 精密度考察 配制低、中、高浓度(盐酸小檗碱浓度为5、20、64 μg/mL)的对照品工作溶液,每个浓度平行配制5份,分别进样5 μL,记录峰面积,见表1。结果得出,低、中、高浓度盐酸小檗碱的RSD值分别为0.30%、0.58%、0.30%,表明盐酸小檗碱批内精密度良好。

另取盐酸小檗碱浓度为20 μg/mL的对照品工作溶液,连续3 d,每天平行5份测定,记录峰面积,见表2。结果得出,盐酸小檗碱的RSD值为0.80%,表明盐酸小檗碱批间精密度良好。

表1 批内精密度考察结果

组份	低浓度(50 μg/mL)		中浓度(200 μg/mL)		高浓度(640 μg/mL)	
	测得浓度(μg/mL)	准确度(%)	测得浓度(μg/mL)	准确度(%)	测得浓度(μg/mL)	准确度(%)
1	5.036	100.7	19.91	99.6	64.13	100.2
2	5.026	100.5	19.89	99.5	63.84	99.8
3	5.033	100.7	20.15	100.8	64.35	100.5
4	5.009	100.2	20.08	100.4	64.16	100.3
5	5.051	101.0	19.93	99.7	64.26	100.4
平均值	5.031	100.6	19.99	99.96	64.15	100.2
RSD(%)	0.30		0.58		0.30	

表2 批间精密度考察结果

组份	第1天		第2天		第3天	
	测得浓度(μg/mL)	准确度(%)	测得浓度(μg/mL)	准确度(%)	测得浓度(μg/mL)	准确度(%)
1	19.91	99.6	20.01	100.1	19.71	98.6
2	19.89	99.5	20.25	101.3	20.03	100.2
3	20.15	100.8	20.08	100.4	19.91	99.6
4	20.08	100.4	19.91	99.6	19.81	99.1
5	19.93	99.7	20.31	101.6	20.05	100.3
平均值	19.99	99.96	20.11	100.1	19.90	99.51
RSD(%)	0.58		0.17		0.15	
总RSD(%)				0.8		

3.5 重复性考察 取同一批次的供试品6份,按照“2.2.2”项下方法配制成6份供试品溶液,进样5

$\mu\text{L}$ , 记录峰面积, 见表 3。结果得出盐酸小檗碱峰面积的 RSD 值为 0.27%, 表明该方法重现性良好。

表 3 重复性考察结果

编号	No.						Mean	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
峰面积	4230	4234	4239	4211	4237	4218	4228	0.27

3.6 加样回收率考察 精密移取同一已知 (10.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的供试品溶液 1 mL, 平行 5 份, 分别加入低、中、高浓度 (盐酸小檗碱浓度为 5、20、64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的对照品工作溶液 1 mL, 混匀, 进样, 记录峰面积, 见表 4。本实验所得盐酸小檗碱低、中、高浓度的加样回收率分别为 99.66%、99.88%、99.98%, RSD 分别为 0.37%、0.32%、0.58%。

表 4 加样回收率考察结果

组份	低浓度 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		中浓度 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		高浓度 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	理论浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	测得浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	理论浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	测得浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	理论浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	测得浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	7.505	7.486	15.005	14.940	37.005	37.005
2	7.505	7.525	15.005	15.042	37.005	36.846
3	7.505	7.463	15.005	14.962	37.005	36.937
4	7.505	7.457	15.005	14.955	37.005	37.361
5	7.505	7.468	15.005	15.038	37.005	36.842
Mean	7.505	7.480	15.005	14.987	37.005	36.998
回收率 (%)		99.66		99.88		99.98
RSD (%)		0.37		0.32		0.58

3.7 稳定性考察 取同一份供试品溶液 (10.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 分别在室温下放置 0、4、6、8 h 后测定, 记录色谱峰, 见表 5。结果得出, 在室温下放置 8 h 后测定的 RSD 值为 0.41%, 可说明盐酸小檗碱供试品溶液室温放置 8 h 稳定。

表 5 室温放置稳定性考察结果

时间	0 h	4 h	6 h	8 h
峰面积	4246	4222	4252	4212
	4234	4252	4238	4229
	4224	4210	4267	4244
	4271	4232	4272	4238
	4232	4230	4230	4230
Mean	4241	4229	4252	4238
RSD (%)	0.43	0.36	0.42	0.28
总 RSD (%)		0.41		

3.8 样品含量测定 取 5 个批次 (批号分别为 140210、140212、140214、140217、140219) 的黄连素片, 按上述“2.2.2”项下方法配制供试品溶液, 取配制好的供试品溶液, 进样 5  $\mu\text{L}$ , 每个批次平行测定 3 次, 记录峰面积, 采用外标法计算复方黄连素片中盐酸小檗碱的含量, 含量计算结果见表 6。5 个批次供试品溶液中的盐酸小檗碱的含量分别为

10.068、9.987、10.028、10.021、9.985  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 6 含量测定结果

批号	140210	140212	140214	140217	140219
盐酸小檗碱含量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	10.064	9.987	10.025	10.039	9.973
	10.066	9.976	10.023	10.028	10.006
	10.074	9.999	10.035	9.995	9.976
Mean	10.068	9.987	10.028	10.021	9.985
RSD (%)	0.06	0.12	0.07	0.23	0.19

#### 4 小结

复方黄连素片是由盐酸小檗碱、木香、吴茱萸、白芍等几味中药组成的复方制剂, 具有清热燥湿, 行气止痛、止痢止泻的作用。复方黄连素片是一种临床常用药, 用于治疗湿热痞满, 呕吐泻痢, 高热口渴, 疔毒痈肿, 目赤牙痛, 心火力盛, 心烦不寐, 血热吐衄等<sup>[1]</sup>。复方黄连素片中盐酸小檗碱为君药, 盐酸小檗碱的含量对复方黄连素片制剂的质量控制具有重要的作用。《中华人民共和国药典》和药品标准中均有盐酸小檗碱的 HPLC 含量测定方法, 但是标准方法的色谱条件下, 盐酸小檗碱的峰型存在拖尾现象<sup>[3-10]</sup>。很多学者对盐酸小檗碱含量测定方法进行了深入的研究, 取得了很好的效果<sup>[11-15]</sup>。本文对盐酸小檗碱的 HPLC 测定方法进行了研究, 以更好的用于复方黄连素片的质量控制。

为解决拖尾现象, 本实验研究方法所用的流动相为乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (45:55, 含 5% 的 0.05 mol/L 庚烷磺酸钠溶液), 因为盐酸小檗碱属碱性较强的季铵型类生物碱, 调节流动相水相和有机相的比例, 并在流动相中加入缓冲溶液, 加入离子对试剂增大离子强度有利于解决峰型拖尾问题。经过反复的试验, 最终得出本研究中的流动相组成, 配合色谱柱、流速、柱温等条件下, 盐酸小檗碱峰有较好的峰型, 理论塔板数及分离度均为满意。本研究所采用的样品前处理方法为超声提取法, 该方法操作简便, 研究发现超声时间为 30 min 即能基本提取完全。总之, 本实验所得方法操作简便, 并经过了方法学验证, 结果表明, 本方法有较好的专属性, 精密度好, 准确度高, 并有良好的重现性, 提取回收率接近 100%, 可以作为复方黄连素片中盐酸小檗碱的含量测定, 用于该制剂的质量控制, 以确保其临床用药效果。

#### 参考文献

- [1] 李茂森. 复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定方法改进[J]. 中国药业, 2013, 22(14): 68-69.
- [2] 周国莉, 林晓莲, 程聪. HPLC 法测定复方黄连液中盐酸小檗碱的含量[J]. 中医药导报, 2010, 16(26): 80-81.

(下接第 257 页)

表5正交试验结果显示,以挥发油提出量为考察指标,各因素的影响顺序为C>A>B,其提取条件以A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>为佳,即加水12倍量,浸泡4h后,提取8h。表4方差分析结果表明A、B、C3个因素对薄荷中挥发油的提取具有显著地影响。但考虑到单因素试验中,提取到4h,累积收油率已达96.84%,能基本满足提取要求,从工业化大生产节省能源、缩短工时方面考虑,因此确定挥发油提取的优化工艺为加水12倍量,浸泡4h后,提取4h。

2.4 工艺条件验证 取10倍处方量的薄荷药材共3份。按所优选的工艺条件进行验证实验。见表7。

表7 提取工艺验证结果表

试验号	挥发油提出量(mL)	RSD(%)
1	2.81	1.99
2	2.74	
3	2.85	
平均值	2.80	

从表7可见,验证结果与试验结果基本一致,说明工艺合理可行,因此逍遥颗粒中薄荷挥发油的最佳提取工艺为:加水12倍量,浸泡4h后,提取4h。药渣保存待用。本次试验所确定的工艺条件重现性好、可操作性强,可进行扩大生产。

### 3 结果与讨论

1)实验过程中发现,粉碎的薄荷粗粉质轻,漂于水面上不宜浸透,故本实验过程中将薄荷药材简单破碎后即浸泡、提取,未进行粉碎度的单因素考察。

2)文献报道,在样品浸泡时间加入少量氯化钠的物质,能提高挥发油的得率,这有待于下一步实验

研究。

3)通过正交实验和验证实验表明薄荷挥发油的提取工艺是科学的、可行的,影响挥发油提取的主要因素为加水量,其次是提取时间、浸泡时间。提取的最佳工艺为加水12倍量,浸泡4h后,提取4h。

### 参考文献

- [1]唐柏平,龙翠仙.逍遥丸治疗围绝经期综合症322例[J].湖南中医杂志,2005,21(4):54.
- [2]赵献萍,何江英.逍遥散加减治疗乳腺增生病的临床疗效分析[J].河南中医学院学报,2009,24(5):62-63.
- [3]陈金金,许瑞,刘云肖,等.逍遥散治疗高考女生肝郁型月经不调的临床研究[J].河北中医药学报,2012,27(2):19-20.
- [4]王春霞,李永伟.逍遥散加减治疗痛经的临床应用[J].四川中医,2008,26(3):85.
- [5]于汝胜,李福周.逍遥散加减治疗脂肪肝64例[J].河北中医,2006,28(8):601.
- [6]夏珂,张宁,王业秋,等.昼夜给予逍遥散对肝损伤大鼠的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):168-170.
- [7]徐寅平.逍遥散治疗抑郁症32例[J].中医杂志,2009,50(6):525.
- [8]吴红彦,王虎平.以肝脾论治老年性痴呆及逍遥散对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力、中枢胆碱能神经活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,5(16):190-192.
- [9]金若敏,黄莉,周婉.中药逍遥片改善正常或脾虚小鼠肠运动相关功能[J].中国临床康复,2003,7(24):33161.
- [10]中华人民共和国卫生部.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂[S].第十五册,WS3-B-2968-98.
- [11]国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010.

(2014-04-15 收稿 责任编辑:曹柏)

(上接第254页)

- [3]张晓红,何中石,徐晓明,等.高效液相色谱法测定黄柏中盐酸小檗碱含量的不确定度评估[J].光谱实验室,2012,29(1):419-422.
- [4]高聪颖,许闽,周梯强,等.四方胃胶囊中盐酸小檗碱的含量测定[J].中医学报,2013,28(12):1860-1861.
- [5]李文连,徐辉,明晓峰.HPLC法测定黄连上清丸(水丸)盐酸小檗碱含量[J].中国药品标准,2006,7(1):21-23.
- [6]上官一平,方鲜枝.反相高效液相色谱法测定黄连中盐酸小檗碱含量[J].中国药业,2006,15(20):18-19.
- [7]吕换地,史奕,张景,等.黄连中盐酸小檗碱含量检验方法的对比与研究[J].科技信息:科学教研,2007,14(17):29-30.
- [8]邹红,梅静,许腊英.不同炮制工艺对黄连中盐酸小檗碱含量的影响[J].湖北中医学院学报,2008,10(1):36-38.
- [9]乐辉.HPLC法测定盐酸黄连素溶液中盐酸小檗碱含量[J].中国

药师,2009,12(4):541-542.

- [10]潘佑找,何晓衡,杨凯.HPLC法测定黄连盐酸小檗碱含量[J].安徽农学通报:上半月刊,2009,15(19):184-186.
- [11]杨燕飞.RP-HPLC同时测定坤泰胶囊中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量[J].中成药,2010,32(6):958-960.
- [12]徐宁.紫外分光光度法测定黄柏中盐酸小檗碱含量[J].中国药业,2010,20(12):48-49.
- [13]李洪亮,程齐来,张道英.RP-HPLC测定黄连上清片中盐酸小檗碱含量[J].光谱实验室,2010,27(4):1423-1426.
- [14]杨协清,宋月琴.HPLC法测定三黄胶囊中盐酸小檗碱含量[J].中药材,2010,33(6):1001-1002.
- [15]吕长淮.盐酸小檗碱含量测定方法概述[J].中国医药导报,2010,7(33):141-142.

(2014-04-26 收稿 责任编辑:王明)