

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.12.003

清热神芎丸中黄连质量控制方法研究

王 建, 李正国, 刘琳琳, 卞艳晶

(山东省济宁市食品药品监督管理局, 山东 济宁 272025)

摘要:目的 建立清热神芎丸中黄连的质量控制方法。方法 用高效液相色谱(HPLC)法测定清热神芎丸中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的含量。采用 Thermo Gold C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(每 1 000 mL 中加入十二烷基硫酸钠 4 g, 以磷酸调节 pH 至 4.0; 45:55)作为流动相, 检测波长为 345 nm。结果 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀进样量分别在 0.125 0~0.749 7 μg 和 0.015 5~0.093 2 μg 范围内与色谱峰面积线性关系良好, *r* 分别为 0.999 979 和 0.999 984 (*n*=6), 平均加样回收率分别为 98.14% 和 98.72%, *RSD* 分别为 1.41% 和 1.02% (*n*=6)。结论 该方法简便、准确, 分离度及重复性好, 可作为清热神芎丸中黄连质量控制方法。

关键词: 高效液相色谱法; 清热神芎丸; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀; 黄连; 质量控制

中图分类号: R285.5; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)12-0009-04

Study on Quality Control Method of *Coptis Chinensis* in Qingre Shenxiong Pills

Wang Jian, Li Zhengguo, Liu Linlin, Bian Yanjing

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

Abstract: Objective To establish a quality control method for *Coptis chinensis* in Qingre Shenxiong Pills. **Methods** The berberine hydrochloride and palmatine chloride in Qingre Shenxiong Pills were determined by HPLC method. The Thermo Gold C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, acetonitrile - 0.05 mol/L monopotassium phosphate solution (4 g lauryl sodium sulfate was added per 1 000 mL, pH was adjusted to 4.0 with phosphoric acid, 45:55) was taken as the mobile phase, and the detection wavelength was 345 nm. **Results** The linear ranges of berberine hydrochloride and palmatine chloride were 0.125 0-0.749 7 μg and 0.015 5-0.093 2 μg, *r*=0.999 979, 0.999 984 (*n*=6), and their average recoveries were 98.14% and 98.72%, the *RSDs* were 1.41% and 1.02% (*n*=6). **Conclusion** The method is simple and accurate with good separation and repeatability, which can be used for quality control of *Coptis chinensis* in Qingre Shenxiong Pills.

Key words: HPLC; Qingre Shenxiong Pills; berberine hydrochloride; palmatine chloride; *Coptis chinensis*; quality control

清热神芎丸收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第四册)》^[1], 由大黄、川芎、黄连、黄芩等 7 味药物组方, 有消肿止痛、通便泻火功效。标准中收载了显微鉴别和黄连的薄层鉴别方法, 但尚不能对药品的质量进行有效控制。黄连是清热神芎丸方中主药之一, 具有清热燥湿、抗菌消炎、利胆等药理作用^[2-4]。本研究中对考察制剂中黄芩、大黄质量控制方法的基础上^[5-6], 参考文献^[7-11], 以黄连的主要有效成分盐酸小檗碱和盐酸巴马汀为指标, 优化色谱分离条件, 建立测定该制剂中两指标含量的高效液相色谱(HPLC)法, 并制订了合理的限度。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, Agilent G1314C DAD 型紫外检测器(安捷伦公司); XS205DU 型十万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); BS110S 型万分之一电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); SK8200LHC 型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(批号为 0752-200206, 含量为

86.7%), 盐酸巴马汀对照品(批号为 110756-200110, 含量为 86.1%), 购自中国食品药品检定研究院; 清热神芎丸(批号分别为 20141013, 20140525, 20140906, 20141004, 20140316, 20140811, 20141005, 20140620, 20140105, 20140314, 20140808, 20140127, 20140316, 20141027, 20140203, 20140227, 山东方健制药有限公司); 按照处方工艺, 取黄芩、大黄、川芎等制备不含黄连的阴性样品。甲醇、乙腈均为色谱纯(天津四友精细化学品有限公司); 水为重蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Gold C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(每 1 000 mL 中加入十二烷基硫酸钠 4 g, 以磷酸调节 pH 至 4.0; 45:55); 检测波长: 345 nm; 柱温: 25 ℃。理论板数按盐酸小檗碱计算应不低于 3 000。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 称取盐酸小檗碱对照品 12.01 mg、盐酸巴马汀对照品 11.28 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇适量溶解, 定容, 摇匀, 作为对照品贮

备液。再分别精密吸取上述盐酸小檗碱贮备液 15 mL, 盐酸巴马汀对照品贮备液 2 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

供试品溶液: 取本品 0.50 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-盐酸(100:1)溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 35 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇-盐酸(100:1)溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 按处方量及制备工艺制备不含黄连的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

对照药材溶液: 称取黄连对照药材 0.05 g, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

2.3 方法学考察

专属性考察: 精密吸取 2.2 项下 4 种溶液各 10 μ L, 按拟订色谱条件进样分析。结果供试品溶液色谱中, 在与盐酸小檗碱和盐酸巴马汀对照品溶液色谱相同保留时间处有相应吸收峰, 阴性对照品溶液色谱则无此吸收峰, 表明处方中其他药味对测定无干扰(见图 1)。

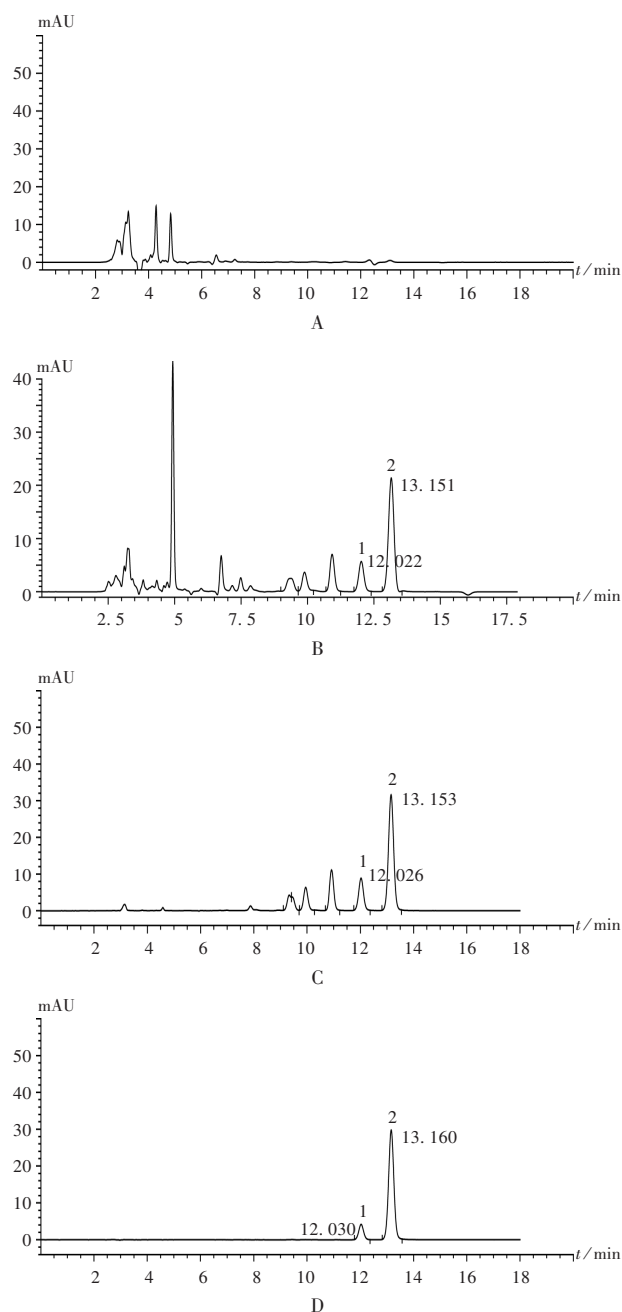
线性关系考察: 精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μ L, 进样测定。以进样量(X , μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得盐酸小檗碱回归方程为 $Y = 1328.727X - 2.505$ ($r = 0.999979$, $n = 6$), 盐酸巴马汀为 $Y = 1404.406X - 0.625$ ($r = 0.999984$, $n = 6$)。结果表明, 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀进样量分别在 0.1250 ~ 0.7497 μ g 和 0.0155 ~ 0.0932 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取混合对照品溶液, 按上述色谱条件连续进样 5 次。结果盐酸小檗碱和盐酸巴马汀平均峰面积分别为 415.968 ± 3.324 和 53.836 ± 0.420 , RSD 分别为 0.80% 和 0.78% ($n = 5$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批样品 5 份, 依法制备供试品溶液, 进行测定。结果盐酸小檗碱的平均含量为 (0.5768 ± 0.00355) mg/g, RSD 为 0.62% ($n = 5$); 盐酸巴马汀平均含量为 (2.2250 ± 0.0145) mg/g, RSD 为 0.65% ($n = 5$)。表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液, 每隔 1 h 测定 1 次, 测定 10 次。结果盐酸巴马汀、盐酸小檗碱平均峰面积分别为 83.635 和 332.310, RSD 分别为 0.55% 和 0.45% ($n = 10$), 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

加样回收试验: 精密吸取混合对照品溶液 2 mL(含盐酸巴马汀 0.1502 mg、盐酸小檗碱 0.5418 mg) 6 份, 置具塞三角瓶中, 挥干甲醇。取已知含量的样品 6 份, 分别置上述具塞三角瓶中, 依法制备供试品溶液, 测定盐



1. 盐酸巴马汀 2. 盐酸小檗碱
A. 阴性对照品溶液 B. 供试品溶液
C. 对照药材溶液 D. 混合对照品溶液

图 1 专属性考察高效液相色谱图

酸巴马汀、盐酸小檗碱含量, 计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 16 批样品, 每批 2 份, 均按 2.2 项下方法操作, 制备供试品溶液。按拟订色谱条件进行测定。结果见表 2、图 2 和图 3。

2.5 耐用性试验

流动相 pH 考察: 调节流动相的 pH 分别为 4.0, 4.2, 3.8, 按供试品测定方法测定, 结果见表 3。结果显

表1 加样回收试验结果(n=6)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		\bar{X} (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.145 0	0.559 3	0.150 2	0.541 8	0.290 8	1.097 5	97.07	99.34				
0.143 7	0.554 2	0.150 2	0.541 8	0.289 7	1.084 4	97.20	97.86				
0.144 3	0.556 4	0.150 2	0.541 8	0.293 5	1.093 8	99.33	99.19	98.14	98.72	1.41	1.02
0.142 3	0.548 9	0.150 2	0.541 8	0.287 4	1.090 2	96.60	99.91				
0.140 8	0.543 1	0.150 2	0.541 8	0.291 0	1.078 6	100.00	98.84				
0.135 9	0.549 7	0.150 2	0.541 8	0.284 1	1.076 4	98.67	97.21				

注:A为盐酸巴马汀,B为盐酸小檗碱。

表2 样品含量测定结果(n=2)

批号	盐酸巴马汀 (A,mg/g)	盐酸小檗碱 (B,mg/g)	总含量 (mg/g)	比值 (B/A)
20141013	0.261	0.997	1.26	3.82
20140525	0.577	2.225	2.80	3.86
20140906	0.390	1.528	1.92	3.92
20141004	0.259	0.994	1.25	3.84
20140316	0.604	2.446	3.05	4.05
20141027	0.240	0.948	1.19	3.95
20141005	0.282	1.086	1.37	3.85
20140203	0.562	2.043	2.61	3.64
20140811	0.349	1.327	1.68	3.80
20140620	0.290	1.162	1.45	4.01
20140105	0.258	1.002	1.26	3.88
20140314	0.338	1.305	1.64	3.86
20140808	0.350	1.376	1.73	3.93
20140227	0.247	0.973	1.22	3.94
20140116	0.271	1.046	1.32	3.86
20140124	0.248	0.978	1.23	3.94

表3 流动相 pH 考察

流动相 pH	取样量 (mg/g)	盐酸巴马汀 含量(mg/g)	盐酸小檗碱 含量(mg/g)
4.0	0.504 8	0.577 2	2.244
4.2	0.504 8	0.583 3	2.253
3.8	0.504 8	0.575 7	2.259

示,流动相 pH 适量变化,不影响 2 种成分的分离度和测定结果。

流动相比例考察:以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相,分别组成 45:55,50:50 和 52:48 的流动相进行测定,结果见表 4。可见,流动相中乙腈用量减少,2 种成分保留时间延长,分离度增加;乙腈用量增加则保留时间缩短,流动相组成比例的适量变化不影响测定结果。

柱温考察:分别设置柱温为 20,25,30 ℃,对样品分离效果进行考察,结果见表 5。可见,20 ℃ 时影响盐酸小

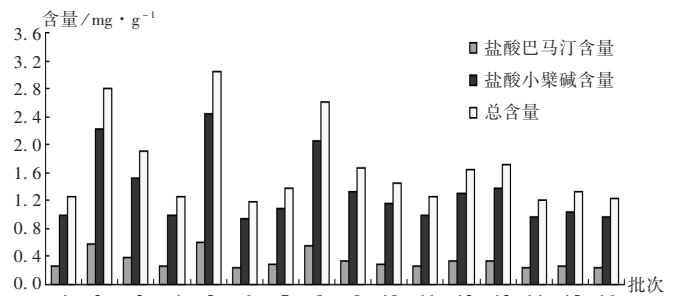


图2 16 批次样品中 2 种成分含量分布图

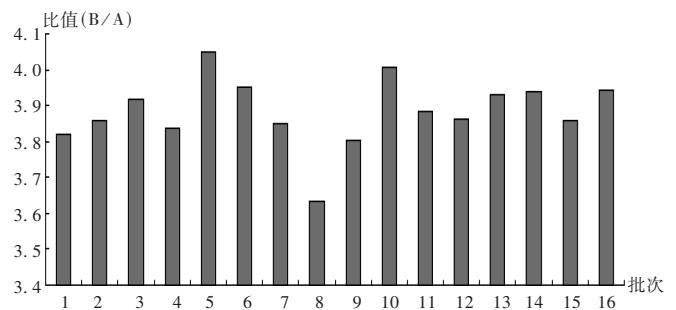


图3 16 批次样品中 2 种成分比值分布图

表4 流动相比例考察

流动相	取样量 (g)	盐酸巴马汀 含量(mg/g)	盐酸小檗碱 含量(mg/g)
45:55	0.504 8	0.577 2	2.254
50:50	0.504 8	0.576 3	2.244
52:48	0.504 8	0.582 8	2.247

檗碱色谱峰峰面积的积分值,色谱分离效果降低,保留时间延长,故选柱温为 25 ℃。

检测波长考察:分别以 343,345,347 nm 为检测波长进行测定,结果见表 6。可见,波长的适度变化不影响含量测定。

色谱柱考察:在色谱分析中,以色谱柱的类型和规格对分离效果影响较大。本研究中分别选用 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)[色谱柱(I)]、Thermo Hypersil Gold C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm,5 μm)[色谱柱(II)]和 Waters Sun Fire™ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,

表5 柱温考察结果

柱温	取样量 (g)	盐酸巴马汀 含量(mg/g)	盐酸小檗碱 含量(mg/g)
30℃	0.5048	0.5770	2.228
25℃	0.5048	0.5772	2.241
20℃	0.5048	0.5683	2.256

表6 检测波长考察结果

检测波长	取样量 (g)	盐酸巴马汀 含量(mg/g)	盐酸小檗碱 含量(mg/g)
345 nm	0.5048	0.5763	2.240
347 nm	0.5048	0.5742	2.244
343 nm	0.5048	0.5757	2.230

表7 色谱柱考察结果

色谱柱	取样量 (g)	盐酸巴马汀 含量(mg/g)	盐酸小檗碱 含量(mg/g)
I	0.5048	0.5764	2.234
II	0.5048	0.5750	2.242
III	0.5048	0.5763	2.236

5 μm)[色谱柱(III)]进行考察,结果2种成分均可有效分离,但色谱柱(III)色谱峰保留时间长。结果见表7。

3 讨论

3.1 测定条件选择

检测波长选择:经二极管阵列检测器(DAD)在线检测,盐酸小檗碱和盐酸巴马汀在345 nm波长处均有较强吸收,故以345 nm为检测波长。

流动相选择:选用Thermo Hypersil Gold C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,参考文献[2],以乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.05 mol/L磷酸氢二钾溶液和乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液为流动相进行检测,结果本研究中所用流动相色谱法分离效果最好,黄连主要成分得到有效分离,可用于多成分测定。

提取方法选择:以甲醇-盐酸(100:1)为溶剂,分别采用超声提取样品和超声提取后过中性氧化铝柱2种方法制备供试品溶液。结果测得盐酸小檗碱和盐酸巴马汀含量相同,均可用于该产品的含量测定,但应对所使用中性氧化铝进行考察。第1种样品处理方法较简便,故选择本研究中选定的方法。但样品溶液经中性氧化铝柱处理后,样品中黄连的5个色谱峰分离较好,可除去其他杂质色谱峰,可用于黄连的液相色谱鉴别。

提取时间考察:取样品4份,每份约0.5 g,精密称定,分别置具塞三角瓶中,分别以不同的超声提取时间制备供试品溶液,按上述方法测定,计算样品中盐酸巴马汀与盐酸小檗碱的含量,结果提取30,45,60 min的

效果基本一致,故选用30 min。

3.2 测定结果分析

16批样品的HPLC色谱图有5个主要色谱峰,与黄连对照药材的色谱峰一致,盐酸小檗碱和盐酸巴马汀含量呈正相关,15批样品中2种成分含量的比值基本一致,比值的平均值为3.88, RSD为2.4%,其中1批次样品(批号20140203)2种成分比值较低(3.64)。可知样品所用黄连品种基本一致。样品中2种成分含量的总和存在较大差异,7批次样品总含量在1.68~3.055 mg/g之间;9批次样品总含量在1.19~1.45 mg/g之间。2010年版《中国药典(一部)》规定黄连中以盐酸小檗碱计含小檗碱(C₂₀H₁₇NO₄)不得少于5.5%,巴马汀(C₂₁H₂₁NO₄)不得少于1.5%。按最低含量计算,制剂中小檗碱与巴马汀的含量分别不得低于2.00 mg/g和0.55 mg/g。本研究中显示,所测样品中有3批次符合要求,其他批次2种成分均偏低,需进一步对生产工艺和原料进行研究,确定合理限度。因此,亟待建立该产品中黄连的质量控制方法,以保证产品质量。

参考文献:

- [1] WS₃-B-0840-91. 卫生部药品标准·中药成方制剂(第四册)[S].
- [2] 雷志英,黄连及黄连素的药用安全性[J]. 中国药业,2010,19(9):84-86.
- [3] 谢梅,徐春红,胡正波,等. 管碟法比较盐酸小檗碱和黄连药材对金色葡萄球菌的抑菌效力[J]. 中国药业,2012,21(19):9-11.
- [4] 徐国良,马晓雪,张启云. 代谢组学评价黄连对大鼠药理作用的初步研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(14):1845-1847.
- [5] 刘琳琳,卞艳晶,王红. RP-HPLC法测定清热神芩丸中黄芩苷的含量[J]. 齐鲁药事,2010,29(10):590-591.
- [6] 李正国,于立佐. 清热神芩丸中大黄质量控制方法的研究[J]. 齐鲁药事,2007,26(9):531-533.
- [7] 李志峰,王琦,冯育林,等. 黄连的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(7):1273-1275.
- [8] 彭福,瞿显友,钟国跃,等. HPLC法测定黄连不同部位中6个生物碱[J]. 中草药,2012,43(3):509-512.
- [9] 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.
- [10] 刘晖晖,张辉,莫结丽,等. 一测多评法测定黄连配方颗粒中4个成分的含量[J]. 中国药学杂志,2012,21(10):39-40.
- [11] 耿志鹏,郑海杰,张艺,等. RP-HPLC测定不同产地黄连中6种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(19):2576-2580.

(收稿日期:2017-10-29)