

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.02.011

高效液相色谱-切换波长法同时测定左金丸中 盐酸小檗碱及吴茱萸碱含量

敖华蓉, 龚春燕[△]

(湖北省宜昌市第二人民医院, 湖北 宜昌 443000)

摘要:目的 建立同时测定左金丸中盐酸小檗碱、吴茱萸碱含量的高效液相色谱(HPLC)-切换波长法。方法 色谱柱为 Ultimate AQ C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(以磷酸调 pH 至 5.0), 梯度洗脱, 检测波长盐酸小檗碱为 265 nm, 吴茱萸碱为 225 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。结果 盐酸小檗碱、吴茱萸碱质量浓度分别在 2.25 ~ 112.50 μg/mL ($r=0.9996$) 和 2.8 ~ 140.0 μg/mL ($r=0.9993$) 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 99.70% 和 99.12%, RSD 分别为 2.78% ($n=6$) 和 2.94% ($n=6$); 3 批左金丸中盐酸小檗碱、吴茱萸碱的平均含量分别为 110.37 mg/g 和 1.28 mg/g ($n=3$)。结论 该方法简便、灵敏、准确、重复性好, 可为制订左金丸的质量标准提供理论依据。

关键词: 高效液相色谱-切换波长法; 左金丸; 盐酸小檗碱; 吴茱萸碱; 含量测定; 质量标准

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)02-0033-04

Simultaneous Determination of Berberine Hydrochloride and Evodiamine in Zuojin Pills by HPLC - Wavelength Switching Method

AO Huarong, GONG Chunyan

(Yichang Second People's Hospital, Yichang, Hubei, China 443000)

Abstract: Objective To establish an HPLC - wavelength switching method for the simultaneous determination of berberine hydrochloride and evodiamine in Zuojin Pills. **Methods** The chromatographic column was Ultimate AQ C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the

第一作者: 敖华蓉, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为临床医学, (电子信箱) 335776079@qq.com。

[△]通信作者: 龚春燕, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药事管理, (电子信箱) 273055523@qq.com。

230, 254, 276 nm 波长处, 色谱图杂峰较多; 而在 270 nm 波长处, 间苯二酚与水杨酸分离度均较好, 色谱图杂峰较少, 且对测定无干扰。因此, 确定检测波长为 270 nm。

本研究中参考文献[11-14], 考察了流动相为甲醇-磷酸二氢钾溶液(0.1 mL NaOH 调 pH 至 6.14)(35:65, 40:60, 20:80, V/V), 甲醇-0.05% 磷酸溶液(20:80, 30:70, 50:50, V/V), 甲醇-2% 乙酸溶液(25:75, 20:80, 35:65, 30:70, V/V) 时等度和梯度洗脱对色谱行为的影响, 结果表明, 流动相为甲醇-2% 乙酸溶液、梯度洗脱时间为 15 min 时, 各色谱峰分离良好, 无拖尾。

参考文献:

- [1] 都兴东. 皮炎灵搽剂对家兔的皮肤刺激性[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(8): 789.
- [2] 蒋平, 李娜, 孙石永, 等. 皮炎灵搽剂外用皮肤安全性实验[J]. 解放军药学学报, 2015, 31(2): 138-139.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [4] 张晓霞, 吕建平, 张钰. 酮康唑搽剂的改进及质量控制[J]. 疾病监测与控制杂志, 2015, 9(1): 46-48.
- [5] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010: 227, 414-415.

- [6] 陈晓亮, 汪旭. 高效液相色谱法测定复方间苯二酚搽剂中间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量[J]. 安徽医药, 2017, 21(1): 53-56.
- [7] 范菲, 刘鹏鸣, 李锋武, 等. HPLC 法同时测定复方水杨酸溶液中四组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2185-2187.
- [8] 王峰. HPLC 法测定复方醋酸氟轻松酊中水杨酸和间苯二酚的含量[J]. 中国医药科学, 2012, 2(19): 92-93.
- [9] 刘福, 吴功柱. HPLC 法测定复方间苯二酚洗剂中 2 组分的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(19): 1504-1505.
- [10] 傅承清, 张晋云. HPLC 法测定灰指灵药膏中间苯二酚、水杨酸、苯甲酸的含量[J]. 药学实践杂志, 2004, 22(6): 355-356.
- [11] 陈中建, 陈松, 王秀丽. 用 HPLC 法同时测定水杨酸间苯二酚火棉胶中水杨酸和间苯二酚的含量[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(2): 151-153.
- [12] 赖文红, 黄力, 苏芳. 含碘复方苯甲酸醇溶液的质量标准研究[J]. 解放军药学学报, 2013, 29(1): 60-62.
- [13] 张娟, 胡旺生. 高效液相色谱法测定硫磺霜中间苯二酚的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2877-2877.
- [14] 王晓青, 刘皈阳, 马建丽, 等. 反相高效液相色谱法同时测定皮肤墨水中间苯二酚和苯酚含量[J]. 中国药业, 2014, 23(9): 33-34.

(收稿日期: 2018-06-04)

mobile phase was acetonitrile - 1.5 mol/L sodium lauryl sulfate solution (adjusted pH to 5.0 by phosphoric acid), gradient elution, the detection wavelength was 265 nm for berberine hydrochloride, 225 nm for evodiamine, the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the sample size was 10 µL. **Results** The berberine hydrochloride and evodiamine showed good linear relationships with peak area in the ranges of 2.25 - 112.50 µg/mL ($r=0.999\ 6$) and 2.8 - 140.0 µg/mL ($r=0.999\ 3$), the average recovery rates were 99.70% and 99.12%, respectively, the RSDs were 2.78% ($n=6$) and 2.94% ($n=6$), respectively. The average contents of berberine hydrochloride and evodiamine in 3 batches of Zuojin Pills were 110.37 mg/g and 1.28 mg/g ($n=3$). **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and reproducible, which can provide a theoretical basis for the quality standard of Zuojin Pills.

Key words: HPLC - wavelength switching method; Zuojin Pills; berberine hydrochloride; evodiamine; content determination; quality standard

左金丸源自元代朱丹溪《丹溪心法·火六》^[1],由黄连和吴茱萸组方,两者配伍,有泻火疏肝、和胃止痛功效,可用于肝火犯胃而见吞酸、胃痛之证^[2],临床多用于肝火犯胃型急慢性胃炎^[3]、反流性食管炎^[4]、慢性糜烂性胃炎^[5]、腹泻型肠易激综合征^[6]、胆汁反流性胃炎^[7]等胃肠道疾病的治疗。黄连 *Coptis chinensis* Franch. 为毛茛科植物黄连的干燥根茎,具有清热燥湿、泻火解毒功效,主要成分为盐酸小檗碱^[2,8]。吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 为芸香科植物吴茱萸的干燥近成熟果实,具有散寒止痛、降逆止呕功效,主要成分为吴茱萸碱^[2,9]。现有报道多集中于单一成分的研究,或将两者在同一波长下测定。对此,本研究中采用高效液相色谱(HPLC)-切换波长法同时测定左金丸中盐酸小檗碱、吴茱萸碱含量,为其质量控制提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型 HPLC 仪,包括 Agilent Chem 化学工作站、G4212B 型 DAD 双波长切换检测器(美国 Agilent 公司);Ultimate AQ C₁₈ 色谱柱(月旭科技<上海>股份有限公司);AG135 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);BP121S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-300ES 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(批号为 110713-200609)、吴茱萸碱对照品(批号为 110802-200606),供含量测定用,均购自中国食品药品检定研究院;左金丸(厦门中药厂有限公司,国药准字 Z35020033,批号分别为 20160406,20160510,20161812,规格为每 12 丸约 1 g);乙腈、十二烷基硫酸钠溶液、磷酸、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate AQ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 µm);流动相:乙腈(A)-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(以磷酸调 pH 至 5.0,B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);

检测波长:盐酸小檗碱为 265 nm、吴茱萸碱为 225 nm;流速:1 mL/min;柱温:25 °C;进样量:10 µL。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	75	25	16	35	65
5	75	25	24	35	65
10	55	45			

2.2 溶液制备

称取盐酸小檗碱、吴茱萸碱对照品各适量,精密称定,加甲醇制成两者质量浓度分别为 450 µg/mL 和 560 µg/mL 的溶液,即得混合对照品溶液。称取样品适量,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,超声(功率为 250 W,频率为 40 kHz)处理 45 min,放至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,得溶液 1;精密吸取该溶液 10 mL 置 100 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经 0.45 µm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按左金丸处方制备缺黄连、吴茱萸药材的阴性对照样品,再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

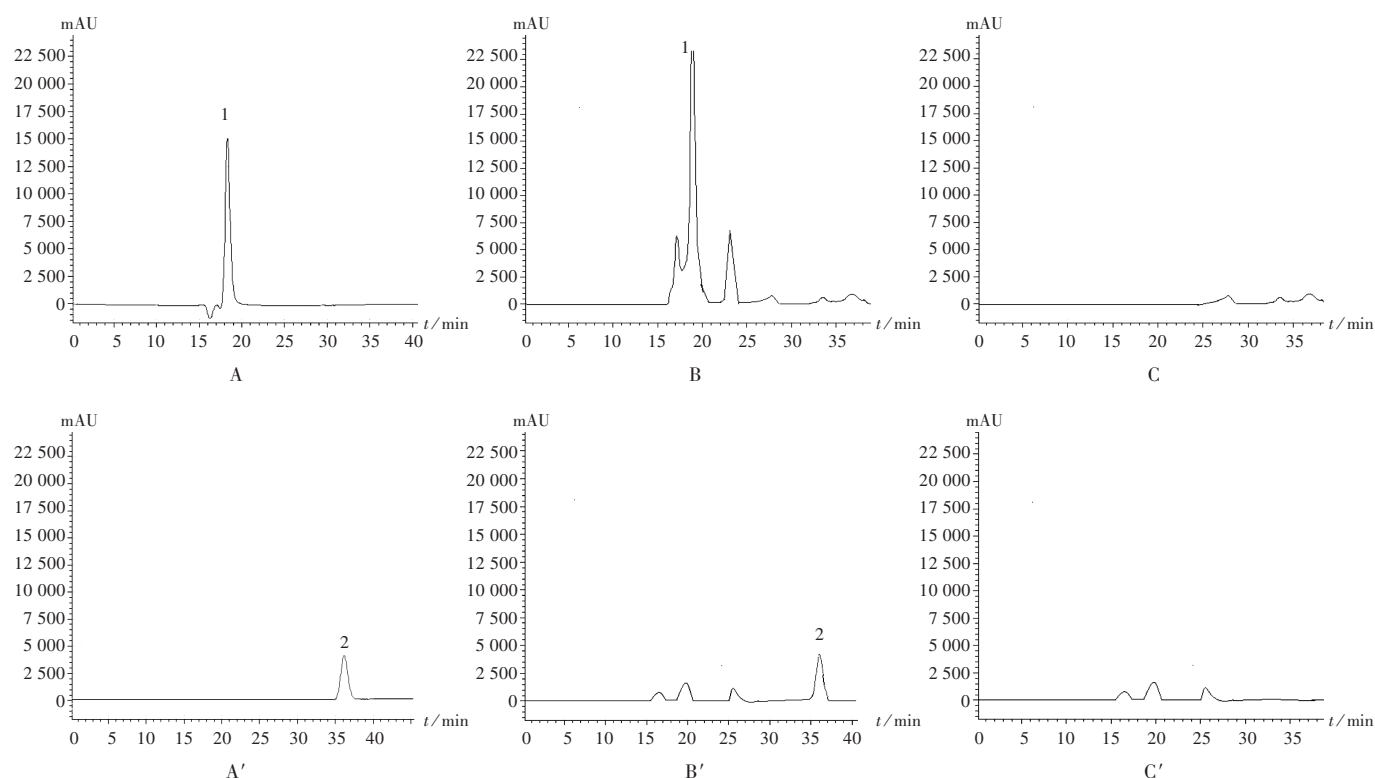
2.3 方法学考察

系统适用性试验:取 2.2 项下混合对照品溶液、阴性对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件分别在波长为 265 nm 和 225 nm 时进样测定,记录色谱图,见图 1。理论板数以盐酸小檗碱峰计应不小于 3 000,以吴茱萸碱峰计应不小于 4 000,分离度均大于 1.5。

专属性试验:取 2.2 项下供试品溶液、阴性对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件分别在波长为 265 nm 和 225 nm 时进样测定,记录色谱图,见图 1。在 265 nm 波长处盐酸小檗碱阴性对照无干扰,在 225 nm 波长处吴茱萸碱阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。

耐用性试验:依法制备供试品溶液,分别改变色谱柱品牌及型号、柱温、流速,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 2。可见,在一定条件下,改变色谱柱品牌及型号、柱温、流速,不影响样品含量测定。

线性关系考察:分别各称取盐酸小檗碱、吴茱萸碱对照品适量,精密称定,以甲醇溶解,制成盐酸小檗碱质



注:A,B,C检测波长为265 nm;A',B',C'检测波长为225 nm。

1. 盐酸小檗碱 2. 吴茱萸碱

A,A'. 混合对照品溶液 B,B'. 供试品溶液 C,C'. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱

表2 耐用性试验结果

条件	含量(mg/g)		RSD(%)	
	A	B	A	B
色谱柱 Ultimate AQ C ₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)	117.03	0.98	0.86	0.93
Synchronis™ C ₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)	115.46	1.05		
柱温 25℃	119.01	1.10	0.97	0.81
30℃	115.48	1.05		
35℃	116.15	1.02		
流速 0.8 mL/min	116.53	1.07	0.85	0.74
1.0 mL/min	117.02	0.98		
1.2 mL/min	115.73	0.92		

注:A为盐酸小檗碱,B为吴茱萸碱。表3同。

量浓度分别为0, 2.25, 4.50, 22.50, 112.50 μg/mL, 吴茱萸碱质量浓度分别为0, 2.80, 5.60, 28.00, 140.00 μg/mL的系列单一对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(X, μg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得盐酸小檗碱、吴茱萸碱回归方程分别为 $Y=27409X-1063$, $r=0.9996$ ($n=5$); $Y'=18075X'-1326$, $r=0.9993$ ($n=5$)。盐酸小檗碱、吴茱萸碱质量浓度线性范围分别为2.25~112.50 μg/mL和2.8~140.0 μg/mL。

精密度试验:精密量取混合对照品溶液适量,共6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸小檗碱、吴茱萸碱峰面积的RSD分别为1.15%, 1.39% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取供试品溶液(批号为20160510)适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 12, 24, 36 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸小檗碱、吴茱萸碱峰面积的RSD为1.43%和1.26% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置36 h内稳定。

重复性试验:取样品(批号为20160510)适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸小檗碱、吴茱萸碱峰面积的RSD为1.07%和1.54% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取样品(批号为20160510)适量,共12份,分别精密加入一定量的盐酸小檗碱、吴茱萸碱对照品溶液(各6份),依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果见表3。

2.4 样品含量测定

分别称取不同批号的样品适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样10 μL,测定样品中

表 3 加样回收试验结果 ($n=6$)

样品含量(g)		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
108.450	1.170	110	1	216.723	2.205	98.43	103.50				
108.290	1.120	110	1	217.905	2.081	99.65	96.10				
109.120	1.090	110	1	218.823	2.064	99.73	97.40	99.70	99.12	2.78	2.94
104.560	1.130	110	1	217.464	2.126	102.64	99.60				
107.360	1.160	110	1	212.091	2.127	95.21	96.70				
109.270	1.080	110	1	222.075	2.094	102.55	101.40				

盐酸小檗碱和吴茱萸碱的峰面积,按外标法计算含量。结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	盐酸小檗碱	吴茱萸碱
20160406	110.06	1.39
20160510	110.43	1.21
20160812	110.62	1.23
$\bar{X}$ (%)	110.37	1.28
RSD(%)	0.87	0.52

3 讨论

3.1 流动相选择

预试验中,参考文献[10-11],考察了乙腈(A)-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液、乙腈(A)-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(以磷酸调 pH 至 5.0)-水(含 0.05% 甲酸)-乙腈(B)、乙腈-0.04% 磷酸溶液为流动相时,盐酸小檗碱、吴茱萸碱色谱峰的出峰情况。结果表明,当流动相为乙腈(A)-1.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠溶液(以磷酸调 pH 至 5.0)时,上述 2 种成分峰形完整、清晰可辨。

3.2 检测波长选择

预试验中采用全波长扫描法,将供试品溶液置 0~400 nm 波长范围内扫描,结果在 265 nm 和 225 nm 波长时,盐酸小檗碱、吴茱萸碱均有色谱峰出现,但 265 nm 波长处吴茱萸碱峰形杂乱、不明显,而盐酸小檗碱峰形尖锐,图形对称,保留时间适中;225 nm 波长处盐酸小檗碱峰形易受其他物质干扰,而吴茱萸碱则峰形完整、清晰,周围无杂峰。因此选择双波长测定上述 2 种成分,保证了试验结果的准确可靠。

3.3 pH 选择

用反相离子对色谱法分析碱性成分时,碱性成分的色谱行为会随流动相 pH 的变化而有较大改变^[12]。预试验中考察了不同 pH(3.5, 5.0, 6.5)对盐酸小檗碱、吴茱萸碱色谱行为的影响。结果表明,当 pH 较低时($pH \leq 3.5$),各色谱峰出峰时间过长,其原因可能与离子对的稳定常数有关;当 pH 较高时($pH \geq 6.5$),上述 2 种成分色谱峰未能达到完全基线分离,部分色谱峰峰形对称性

差;当 pH 为 5.0 时,各色谱峰分离效果较好,峰形尖锐、对称性好,保留时间适中,有利于供试品溶液的分析测定。因此以磷酸调流动相 pH 至 5.0。

3.4 洗脱条件选择

预试验中考察了等度洗脱和不同比例的梯度洗脱,最终确定,在上述梯度洗脱程序下,40 min 内可检出供试品溶液中的盐酸小檗碱及吴茱萸碱。

综上所述,本研究中建立的 HPLC-切换波长法简便、灵敏、准确、重复性好,可为制订左金丸的质量标准提供理论依据。

参考文献:

- [1] 陈永灿. 左金丸临证思考[J]. 江苏中医药, 2015, 47(11): 63-64.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 763-764.
- [3] 华晓东, 芮菁, 任变文. 左金丸对胃肠道的调节作用[J]. 药物评价研究, 2017, 40(2): 190-195.
- [4] 李力强, 张贵锋, 曾艺文, 等. 左金丸加味辨证治疗反流性食管炎的临床研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(2): 286-290.
- [5] 于亚杰. 柴胡疏肝散合左金丸治疗慢性糜烂性胃炎的临床疗效[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(1): 86-87.
- [6] 李力强, 张贵锋, 曾艺文, 等. 左金丸合四逆散辨证治疗腹泻型肠易激综合征 72 例临床观察[J]. 中医杂志, 2016, 57(14): 1214-1217.
- [7] 段文强. 左金丸合半夏泻心汤加减治疗胆汁反流性胃炎 48 例临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(2): 182-183.
- [8] 赵楠, 李隆云, 白志川. 中药材黄连的研究现状与展望[J]. 重庆理工大学学报(自然科学版), 2015, 29(1): 53-58.
- [9] 张璐, 冯育林, 王跃生, 等. 吴茱萸现代研究概况[J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(2): 78-82.
- [10] 张建锋, 刘文, 张石宇, 等. 黄连的 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1): 97-101.
- [11] 田静, 陶金, 许斌, 等. 吴茱萸药材的高效液相指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(6): 793-795.
- [12] THEODORIDIS G, PAPADOYANNIS I, VASILIKIOTIS G, et al. Reversed phase high performance liquid chromatography photodiode array analysis of alkaloid drugs of forensic interest[J]. J Chromatogr B, 1995, 668(2): 253-263.

(收稿日期: 2018-06-25)