

HPLC 测定止泻保童颗粒中盐酸小檗碱的含量^{*}

刘 佳, 陆雪萍, 崔 涛, 彭玲芳[△]

(云南白药集团创新研发中心 云南省药物研究所 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: 目的 建立测定止泻保童颗粒中盐酸小檗碱含量的高效液相色谱法。方法 采用 Ecosil C₁₈ 柱(4.6mm×250mm, 5μm), 以乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 1L 含 3.8g 十二烷基硫酸钠, 用磷酸调 pH 值至 4.0)为流动相, 流速 1.0mL/min, 检测波长 350nm。结果 盐酸小檗碱在 0.038~1.910μg 的范围内线性关系良好($r=0.9999$), 平均加样回收率为 98.25%, RSD=1.61%。结论 本方法简便, 快速, 准确, 重复性好, 可用于止泻保童颗粒中盐酸小檗碱含量测定。

关键词: 盐酸小檗碱; 止泻保童颗粒; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)02-0037-03

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.02.010

止泻保童颗粒具有健脾止泻, 温中化痢的功效。临床上用于小儿脾胃虚弱, 寒热凝结引起的水泻痢疾, 肚腹疼痛, 口干舌燥, 四肢倦怠, 恶心呕吐, 小便不利。是由人参、白术、茯苓、白扁豆、苍术、广藿香、木香、丁香、檀香、砂仁、肉豆蔻、肉桂、吴茱萸、芡实、薏苡仁、车前草、滑石、黄连、诃子肉、天冬、麦冬、槟榔 22 味药材组成, 为我公司生产产品(批准文号 Z53021564)。方中黄连具有清热燥湿, 泻火解毒之功效^[1], 其中的盐酸小檗碱是一种异喹啉类生物碱, 已作为传统的抗炎、抑菌药物在临床应用多年^[2-4], 是本方中主要药理作用的有效成分^[5-6]。为配合公司对该产品提出的中药品种保护延保申请, 需要建立盐酸小檗碱的含量测定项。本研究参照文献[7], 改进了测定止泻保童颗粒中盐酸小檗碱含量的 HPLC 方法。该方法测定准确, 重现性好, 能严格控制药品质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪: Waters 1525 (包括色谱泵: 1525 Binary HPLC Pump; 进样器: 2707 Autosampler; 柱温箱: AUTOSCIENCE AT-830; 检测器: 2487 Dual λAbsorbance Detector; 色谱工作站: Empower

Pro)。SK8200HP 型超声波振荡器(上海科导超声仪器有限公司)。Mettler Toledo AG 285 电子分析天平(十万分之一)。Milli-Q[®] Advantage A10[®] system 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

乙腈(色谱纯, 批号: JA025830, Merck KGaA), 水(超纯水, 自制), 其它试剂均为分析纯。盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110713-200911, 含量按 86.8%计)。止泻保童颗粒(云南白药集团生产, 批号为 ZHA1301)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇溶解, 制成每 1mL 含 0.02mg 的溶液, 即得。

供试品溶液的制备: 取本品, 研细, 取约 5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇-盐酸(100:1)混合溶液 10mL, 称定重量, 超声处理(功率 250W, 频率 33KHz)20min, 取出, 放冷, 再称定重量, 加甲醇-盐酸(100:1)混合溶液补足减失的重量, 经微孔滤膜(0.45μm)滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照溶液的制备: 按止泻保通颗粒制备方

^{*} 基金项目: 云南省科技领军人才培养计划项目(2014HA001)

收稿日期: 2016-01-08

作者简介: 刘佳(1982-), 女, 云南昆明人, 工程师, 研究方向: 中药、天然药物研究开发及质量标准。

[△]通信作者: 彭玲芳, E-mail: penglf428@126.com

法制得不含黄连的样品,再按上述供试品溶液制备方法制备,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

2.2.1 检测波长

应用紫外检测器对盐酸小檗碱对照品溶液进行光谱扫描,盐酸小檗碱在 350nm 处有最大吸收(见下图 1),所以将检测波长定为 350nm。

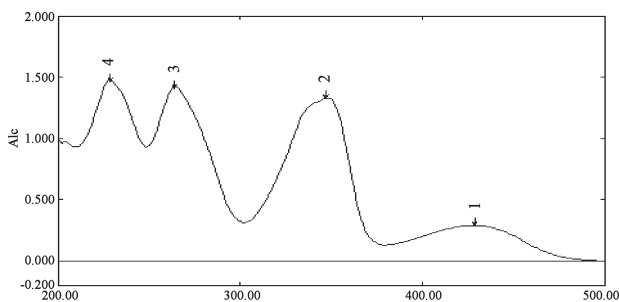


图 1 盐酸小檗碱紫外吸收光谱图

2.2.2 色谱条件

色谱柱:Ecosil C₁₈ 柱(4.6mm×250mm,5μm);柱温 25℃;以乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 1L 含 3.8g 十二烷基硫酸钠,用磷酸调 pH 值至 4.0)为流动相;流速:1.0mL/min;检测波长:350nm。

2.2.3 系统适用性

按上述色谱条件,分别进行对照品溶液、供试品溶液以阴性对照溶液检测(图 2~4)。结果表明,盐酸小檗碱对照品的保留时间约为 19.1min,分离度>1.5,阴性对照溶液在此峰位置无吸收,对本品中盐酸小檗碱含量测定无干扰。说明方法专属性良好。

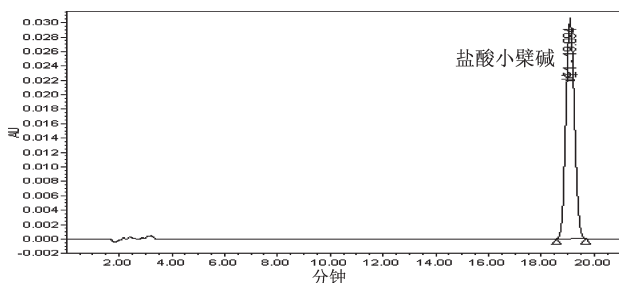


图 2 对照品溶液色谱图

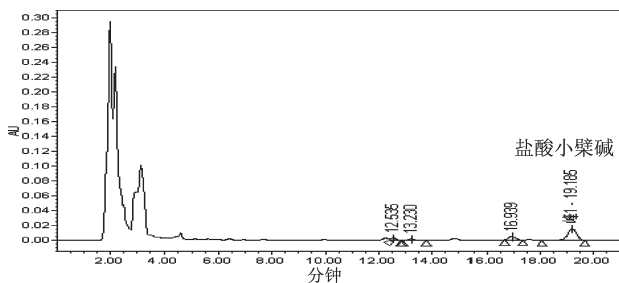


图 3 供试品溶液色谱图

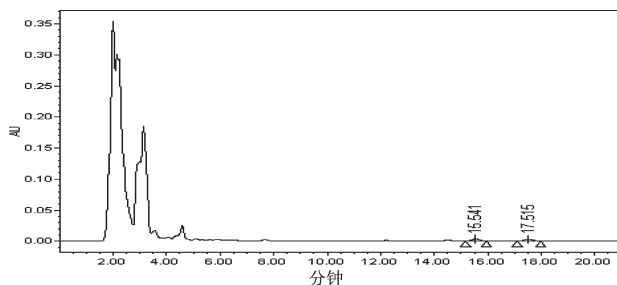


图 4 阴性对照溶液色谱图

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

精密称取盐酸小檗碱对照品(含量按 86.8%计)11.00mg 于 50mL 量瓶中,加入甲醇至刻度,得 191.0mg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液,分别取 191.0mg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液适量,稀释得浓度分别为 3.8,11.5,19.1,28.2,76.6mg/mL 的系列对照品溶液。分别精密吸取 10mL 的系列对照品溶液,注入液相色谱仪测定,以盐酸小檗碱吸收峰面积的积分值为纵坐标 Y,进样量(ng)为横坐标 X,进行线性回归。得线性回归方程为 $Y = 3469.7X - 2956.5$ ($r = 0.9999$),盐酸小檗碱进样量在 0.038~1.910μg 的范围内进样量和峰面积呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10μL,连续进样 6 次,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $RSD = 0.98\%$ ($n = 6$)。表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验

取同一批样品(批号:ZHA1301)共 6 份,按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,盐酸小檗碱的含量为 0.0202mg/g, RSD 值为 1.98% ($n = 6$)。表明本法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,分别在 0,1,2,4,8,24h 进样测定。结果表明, RSD 值为 0.27%。说明供试品溶液在 24h 内稳定。

2.3.5 回收率试验

分别精密吸取 271μg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液 0.1,0.2,0.3mL 各 3 份,共 9 份,自然挥干甲醇后,分别加入已知含量(0.0202mg/g)的同一批号样品约 2.5g,按供试品溶液制备方法制备,结果(见表 1)表明,该分析方法的盐酸小檗碱回收率为 96.62%

~101.70%($n=9$), RSD 值为 1.61%。试验结果表明,回收率良好。见表 1。

表 1 回收率试验结果表

已知含量 /(mg)	加入量 /(mg)	测得量 /(mg)	回收率 /(%)	平均值 /(%)
0.0505		0.0773	99.01	
0.0507	0.0271	0.0775	99.02	99.91
0.0507		0.0783	101.70	
0.0503		0.1028	96.97	
0.0506	0.0542	0.1035	97.61	97.62
0.0507		0.1039	98.28	
0.0503		0.1288	96.62	
0.0506	0.0812	0.1292	96.75	97.23
0.0508		0.1306	98.31	

2.4 样品测定

取止泻保童颗粒 10 批按照上述研究建立的测试方法,制备对照品溶液和各批号样品供试溶液,并分别进样检测,按外标法测定制剂中盐酸小檗碱的含量(表 2),结果见表 2。

表 2 样品测定结果表

批号	ZHA1301	ZHA1302	ZHA1303	ZDA1302	ZKA1301
盐酸小檗碱(mg/g)	0.0199	0.0265	0.0463	0.0333	0.0318
批号	ZKA1302	ZFA1301	ZFA1302	ZE1303	ZDA1301
盐酸小檗碱(mg/g)	0.0276	0.0340	0.0310	0.0273	0.0696

3 讨论

盐酸小檗碱的含量测定方法较多,大多采用高效液相色谱法,其中的流动相常加入离子对试剂,如十二烷基硫酸钠、三乙胺等,能够使强极性的化合物在非极性键合反相柱上得到较好的峰形,能改善分离度。本研究曾参考文献^[8-10]选择其它流动相条件进行试验,结果盐酸小檗碱色谱峰与相邻峰未达到最佳分离,而采用本法的色谱条件乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 1L 含 3.8g 十二烷基硫酸钠,用磷酸调 pH 值至 4.0),盐酸小檗碱峰有最佳的分离效果,拖尾因子<1.05,理论板数按盐酸小檗碱峰计算不小于 5000。

在配制流动相时,磷酸二氢钾易溶于水,十二烷基硫酸钠难溶于水、易溶于乙腈,因此,流动相配成同一相比较好。可先配制成 0.05mol/L-1 磷酸二氢

钾溶液,然后按比例加入乙腈配制成混合溶液,再在每 1L 混合溶液中加入 3.8g 十二烷基硫酸钠,最后用磷酸调 pH 值至 4.0。此外,在此流动相条件下含量测定结束后冲洗管路及色谱柱时,不宜直接用含水较高的比例冲洗,否则因十二烷基硫酸钠难溶于水易造成管路堵塞,建议先用乙腈-水(50:50)的流动相系统冲洗管路及色谱柱,再按常规方法冲洗管路及色谱柱。

本研究测定了 10 批上市止泻保童颗粒样品中盐酸小檗碱含量,结果样品中含黄连以盐酸小檗碱计的最高值(0.0696mg/g)及最低值(0.0199mg/g)相差较大。经研究表明,这主要与黄连药材中盐酸小檗碱含量有差别有关,因此需要控制好黄连药材中盐酸小檗碱含量。

参考文献:

- [1] 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,2010:285.
- [2] 钟祥,李应东. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2012,8(3):185-186.
- [3] 李新,朱玲娜. 黄连素在相关慢性疾病中的运用[J]. 中医药临床杂志,2014,26(5):520-522.
- [4] 左茹,曹雪滨,张文生. 黄连素药理作用研究进展[J]. 环球中医药,2014,7(7):568-572.
- [5] 侯艺辉,张贵君,徐蓓蕾. 用盐酸小檗碱作为黄连等中药质量评价指标探讨临床用药的安全性和有效性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):129-132.
- [6] 刘仁红,肖毅,陈虹余,等. 盐酸小檗碱灌肠治疗小儿细菌性结肠炎的临床应用[J]. 西部医学,2014,26(12):1635-1636.
- [7] 解世全,田芳,窦德强,等. HPLC 测定止泻保童颗粒中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国现代中药,2007,9(12):30-31.
- [8] 范永春,任爱农. 高效液相色谱法测定胆胃胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 云南中医中药杂志,2009,30(12):57-58.
- [9] 莫亚雄,杜利云. 高效液相色谱法测定火炭星胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 云南中医中药杂志,2011,32(3):53-54.
- [10] 蒋宁. 盐酸小檗碱片含量测定方法的改进[J]. 海峡医学,2012,24(9):64-66.
- [11] 富小璐. 梯度洗脱法测定双黄消炎片中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国医药指南,2013,11(3):58.
- [12] 冯建峰,彭宗玢. 高效液相色谱法测定伤科筋骨水中盐酸小檗碱含量[J]. 亚太传统医药,2012,8(6):27-28.
- [13] 吴雪丹,丁宝月,傅应华. HPLC 法测定复方苦参洗剂中盐酸小檗碱和黄芩苷[J]. 中成药,2012,34(5):868-871.

(下转第 69 页)

Clinical Observation of Traditional Chinese Medicine Comprehensive Treatment of Swallowing Disorders

WANG Zhaoxia¹, PANG Jingtao², LI Hong¹, LIU Kai², YANG Ran²

(1. Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261041, China;

2. Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

ABSTRACT: Objective To observe effect of integrated therapy of traditional Chinese medicine on swallowing disorder after stroke. **Methods** 70 patients with swallowing disorder after stroke was randomly divided into treatment group ($n=35$) and the control group ($n=35$). The treatment group was treated with Chinese medicine granules, acupuncture and conventional treatment and the control group with rehabilitation training and conventional treatment, both of them for 4 weeks. We compared the water swallow tests, Videofluoroscopic swallowing study (VFSS) and the incidence of aspiration pneumonia before and after treatment. **Results** The scores of water swallow tests and Videofluoroscopic swallowing study (VFSS) were significantly improved after treatment in both groups, And the treatment group improved more significantly ($P<0.05$). Patients in treatment group had higher score of water swallow tests and Videofluoroscopic swallowing study (VFSS) and lower incidence of aspiration pneumonia than control group ($P<0.05$). **Conclusion** The integrated traditional Chinese medicine therapy is effective in improving swallowing function, reducing the occurrence of aspiration pneumonia and improving the quality of life.

KEY WORDS: stroke; dysphagia; traditional Chinese medicine; acupuncture; Chinese material medica; comprehensive therapy; efficacy observation

(上接第 39 页)

[14] 权勤波,李启红. HPLC 法测定胃炎康胶囊中芍药苷,盐酸小檗碱及甘草酸的含量 [J]. 药物分析杂志,2012,32(1):120-122.

[15] 赵严丽,陈淑娟. 高效液相色谱法测定消渴平胶囊中盐

酸小檗碱含量[J]. 中国药业,2014,23(1):10-11.

[16] 赵严丽,魏燕珍. 高效液相色谱法测定糖维胶囊中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业,2015,24(4):45-46.

(编辑:徐建平)

Determination of Berberine Hydrochloride in Zhixie Baotong Granule by HPLC

LIU Jia, LU Xueping, CUI Tao, PENG Lingfang

(Yunnan Baiyao Group Innovation and R&D Center, Yunnan Institute of Materia Medica, Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: Objective To establish a HPLC method for the determination of berberine hydrochloride in Zhixie Baotong granule. **Methods** The HPLC system consisted of the Ecosil C₁₈ (4.6mm×250mm, 5μm) column, the mobile phase consisted of acetonitrile-0.05 mol/L KH₂PO₄ (50:50), the flow rate was 1.0 mL/min, the UV detector was set at 350nm. **Results** The linear response range was 0.038~1.910 μg ($r=0.9999$). The average recovery of puerarin was 98.25%, and RSD=1.61%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and repeatable. It can be applied in determination of berberine hydrochloride in Zhixie Baotong granule.

KEY WORDS: berberine hydrochloride; Zhixie Baotong granule; HPLC