

HPLC 法测定癉清片中表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和丹皮酚

张晓静¹, 刘德福², 丁菲菲¹, 田 华¹, 邓雁如^{1*}, 郭利平^{3*}

1. 天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

2. 武警后勤学院附属医院 药剂科, 天津 300162

3. 天津中医药大学附属保康医院, 天津 300193

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定癉清片中表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚 6 种成分。方法 Waters SymmetryShield RP18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (0.3%甲酸和 0.3%三乙胺) - 水 (0.3%甲酸和 0.3%三乙胺), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 25 °C; 进样体积 20 μL。结果 表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚分别在 1.856~18.56、14.230~142.30、1.070~10.79、2.485~24.85、38.915~389.15、9.824~98.24 μg/mL 线性良好, r 值均大于 0.999 0。平均回收率分别为 98.66%、99.49%、99.59%、98.66%、100.40%、99.95%, RSD 值分别为 2.91%、2.67%、2.65%、1.91%、3.42%、2.28% ($n=9$)。结论 该方法专属性强, 灵敏度高、重复性好、简单易行, 可用于同时测定癉清片中表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚 6 种成分, 对完善癉清片的质量控制具有参考价值。

关键词: 癉清片; 表小檗碱; 黄连碱; 盐酸药根碱; 盐酸巴马汀; 盐酸小檗碱; 丹皮酚; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)05-0527-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.05.011

Determination of epiberberine, coptisine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, and paeonol in Longqing Tablets by HPLC

ZHANG Xiao-jing¹, LIU De-fu², DING Fei-fei¹, TIAN Hua¹, DENG Yan-ru¹, GUO Li-ping³

1. Tianjin Key Laboratory of Chemistry and Analysis of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital to Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

3. Baokang Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of epiberberine, coptisine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, and paeonol in Longqing Tablets. **Methods** The analysis was performed on Waters Symmetry Shield TM RP18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile (0.3% triethylamine and 0.3% phosphoric acid) - water (0.3% triethylamine and 0.3% phosphoric acid) as mobile phases for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 270 nm. The column temperature was 25 °C with injection volume of 20 μL. **Results** Epiberberine, coptisine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, and paeonol had good linearity in the ranges of 1.856 — 18.56, 14.230 — 142.30, 1.070 — 10.79, 2.485 — 24.85, 38.915 — 389.15, and 9.824 — 98.24 μg/mL, respectively. The correlation coefficients of all curves were above 0.999 0. The average recoveries were 98.66%, 99.49%, 99.59%, 98.66%, 100.40%, and 99.95% with RSD 2.91%, 2.67%, 2.65%, 1.91%, 3.42%, and 2.28% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is specific, sensitive, repeatable, and simple for simultaneous determination of epiberberine, coptisine, jatrorrhizine, palmatine, berberine and paeonol, which can be available for the quality control of Longqing Tablets.

Key words: Longqing Tablet; epiberberine; coptisine; jatrorrhizine; palmatine; berberine; paeonol; HPLC

收稿日期: 2014-12-31

作者简介: 张晓静 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药有效成分研究。E-mail: xiaojing5639@163.com

*通信作者 邓雁如 (1963—), 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药化学。Tel: (022)59596221 E-mail: dyanru@sina.com

郭利平 (1965—), 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脑血管疾病治疗。

癃清片是由泽泻、车前子、败酱草、金银花、牡丹皮、白花蛇舌草、赤芍、仙鹤草、黄连、黄柏10味中药组成的复方制剂,临床用于热淋所致的尿频、尿急、尿痛、尿短、腰痛等症^[1]。癃清片具有抑制大鼠前列腺炎作用^[2],目前的研究大多数仅限于临床研究^[3-6]。《中国药典》2010年版一部仅对癃清片中盐酸小檗碱进行了测定,对其他成分的定量研究未见报道。本实验建立了HPLC梯度洗脱法同时测定癃清片中表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚6种成分,为进一步完善癃清片的质量控制方法提供依据。

1 仪器与试药

Aglient 1200 高效液相色谱仪(四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器,美国 Aglient 公司);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Sartorius LE225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

表小檗碱(批号 B-064-130422)、黄连碱(批号 Y-024-131109)、盐酸药根碱(批号 Y-083-130713)、盐酸巴马汀(批号 H-015-130626)、盐酸小檗碱(批号 Y-035-130430)、丹皮酚(批号 D-002-130813)对照品均购自于成都瑞芬思生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。癃清片(批号 CI15144、CI15145、CI15146、CI15147、CI15148、CI15149、CI15150、CI15151、CI15152、CI15153、CI15154、CI15157)由天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂提供。乙腈为色谱纯(美国 Sigma-aldrich 公司);水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[7-9]

Waters SymmetryShield RP18 色谱柱(250 mm×

4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(0.3%甲酸和 0.3%三乙胺)(A)-水(0.3%甲酸和 0.3%三乙胺)(B),梯度洗脱程序 0~10 min, 7%~9%; 10~19 min, 9%~19%; 19~30 min, 19%~19%; 30~54 min, 19%~42%; 54~65 min, 42%~70%;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 270 nm;柱温 25 ℃;进样体积 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)溶解并稀释至刻度,其质量浓度分别为 18.56、142.30、10.79、24.85、389.15、98.24 μg/mL,作为对照品的储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取癃清片适量,除去包衣,粉碎,过 60 目筛,称取 0.5 g,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)约 9 mL,超声提取 1 h,冷却至室温,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 0.25、0.5、1、2、3、4、5、8、10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液,进样测定峰面积。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,分别得到 6 种成分的标准曲线,见表 1。

2.5 精密度试验

精密称取批号 CI15144 癃清片粉末 0.5 g,制备供试品溶液,连续重复进样 5 次,记录表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚色谱峰面积,计算得其 RSD 值分别为 1.45%、1.49%、1.79%、1.09%、1.63%、1.29%。

表 1 回归方程和线性范围

Table 1 Regression equation and linear ranges

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
表小檗碱	$Y=2.179 \times 10^5 X+127.6$	0.999 1	1.856~18.56
黄连碱	$Y=5.605 \times 10^4 X+119.1$	0.999 3	14.230~142.30
盐酸药根碱	$Y=1.980 \times 10^5 X+201.3$	0.999 2	1.070~10.79
盐酸巴马汀	$Y=2.997 \times 10^5 X+102.6$	0.999 1	2.485~24.85
盐酸小檗碱	$Y=1.231 \times 10^5 X+75.53$	0.999 7	38.915~389.15
丹皮酚	$Y=1.095 \times 10^5 X+155.4$	0.999 1	9.824~98.24

2.6 稳定性试验

取批号 CI15144 癉清片样品制备的供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进样测定, 记录表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚色谱峰面积, 计算得其 RSD 值分别为 1.22%、0.78%、2.03%、1.69%、1.58%、1.60%, 表明供试品溶液中各成分在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号 CI15144 癉清片样品 6 份, 各 0.5 g, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚色谱峰面积, 计算质量分数, 结果其 RSD 值分别为 1.96%、2.05%、0.88%、1.46%、2.13%、1.14%。

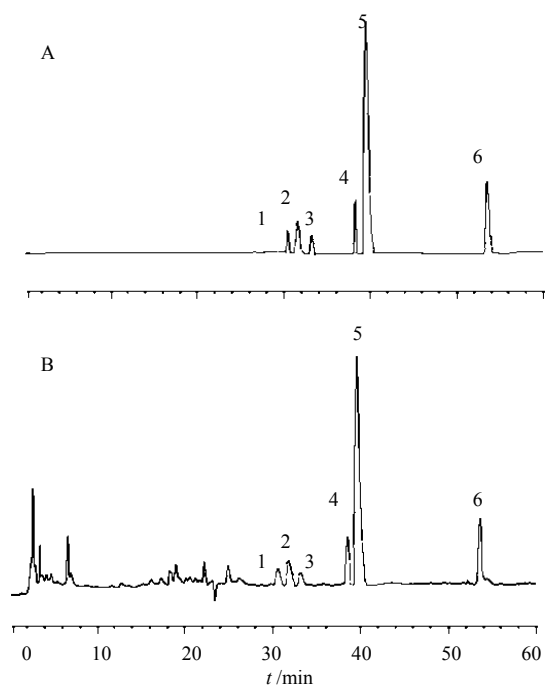
2.8 加样回收率试验

精密称取批号 CI15144 癉清片样品 9 份, 每份 0.25 g, 加入各对照品的量相当于癉清片中各成分量的 80%、100%、120%, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚平均回收率分别为 98.66%、99.49%、99.59%、98.66%、100.40%、99.95%, RSD 值分别为 2.91%、2.67%、2.65%、1.91%、3.42%、2.28% ($n=9$)。

2.9 样品测定

取各批次癉清片样品各 3 份, 每份 0.5 g, 制备供试品溶液, 进样测定, 以外标法计算各成分的质量分数, 色谱图见图 1, 结果见表 2。结果表明, 所

测定 12 批癉清片中同一成分在不同批次中差异不大, 且成分较稳定; 同一批次各成分比较, 盐酸小檗碱相对于其他 5 种成分量较高。



1-表小檗碱 2-黄连碱 3-盐酸药根碱 4-盐酸巴马汀 5-盐酸小檗碱 6-丹皮酚
1-epiberberine 2-coptisine 3-jatrorrhizine 4-palmatine 5-berberine 6-paeonol

图 1 混合对照品 (A) 和癉清片 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Longqing Tablets (B)

表 2 癉清片中表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚测定结果 ($n=3$)
Table 2 Determination of epiberberine, coptisine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, and paeonol in Longqing Tablets ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·片 ⁻¹)					
	表小檗碱	黄连碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	丹皮酚
CI15144	0.084	0.664	0.056	0.141	2.961	0.407
CI15145	0.253	0.641	0.054	0.125	2.473	0.542
CI15146	0.119	0.784	0.066	0.125	2.494	0.536
CI15147	0.077	0.647	0.054	0.125	2.494	0.547
CI15148	0.066	0.586	0.056	0.127	2.351	0.604
CI15149	0.071	0.637	0.073	0.133	2.443	0.632
CI15150	0.074	0.661	0.078	0.144	2.574	0.610
CI15151	0.065	0.593	0.053	0.125	2.300	0.579
CI15152	0.067	0.626	0.060	0.136	2.562	0.579
CI15153	0.069	0.630	0.063	0.141	2.535	0.528
CI15154	0.066	0.601	0.061	0.133	2.453	0.511
CI15157	0.071	0.653	0.061	0.140	2.645	0.590

3 讨论

3.1 检测波长的选择

考察了表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、丹皮酚6种成分在210~300 nm处的吸收,对所得色谱图进行分析比较,以色谱峰所代表的化学成分的信息多少为指标,综合考虑6种成分的最大吸收波长,最终确定270 nm为测定的检测波长。

3.2 流动相选择

由于癉清片中药味较多,成分复杂,单一流动相不能达到较好的分离效果,本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液,均不能达到很好的分离效果。综合考虑被测成分的分离度、峰型,最终确定乙腈(0.3%甲酸和0.3%三乙胺)-水(0.3%甲酸和0.3%三乙胺)梯度洗脱,各色谱峰分离度及峰形均较好。

供试品溶液中含大量复杂成分,连续2次重复进样若平衡时间较短,会影响化合物的分离。用甲醇-水梯度冲洗色谱柱1 h后可明显改善。

本实验采用HPLC同时测定癉清片中6种成分,方法简便易行,结果可靠,为癉清片中同时控制表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、

盐酸小檗碱、丹皮酚6种成分质量提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 1227.
- [2] 韩双红, 王玉芬, 陈卫平, 等. 癉清片对大鼠前列腺炎的抑制作用 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 789-791.
- [3] 高筱松, 高文喜, 贺菊乔, 等. 癉清片治疗慢性前列腺炎多中心双盲安慰剂对照试验研究 [J]. 中国男科学杂志, 2010, 24(9): 21-25.
- [4] 安海燕, 郭颖博, 谢璇, 等. 癉清片配合抗生素治疗复发性尿路感染68例临床观察 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 5(10): 782-783.
- [5] 房东亚, 孙文强. 左氧氟沙星胶囊联合癉清片治疗2型糖尿病合并尿路感染的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1): 68-70.
- [6] 隆电熙. 癉清片治疗女性尿道综合征的疗效观察 [J]. 中国临床研究, 2010, 23(4): 70.
- [7] 刘江亭, 李慧芬, 崔伟亮. 川黄柏、关黄柏饮片和水煎液中3种生物碱含量的比较研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(5): 437-441.
- [8] 熊巨良. 高效液相色谱法测定五味黄连丸中表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量 [J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(9): 152-154.
- [9] 陈芳, 邓雁如, 许妍妍, 等. 双波长HPLC法同时测定黄连及金芪降糖片中6种生物碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 60-65.