

## HPLC 法测定清胃黄连丸中小檗碱

闫晓楠<sup>1</sup>, 张平<sup>2\*</sup>

1. 天津中新药业研究中心, 天津 300457
2. 天津中新药业集团股份有限公司, 天津 300193

**摘要:** 目的 建立 HPLC 测定清胃黄连丸中小檗碱的方法。方法 色谱柱 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钾 (35:65); 检测波长 345 nm; 体积流量 1.0 mL/min。结果 线性范围为 25.5~510.0 ng ( $r=0.9999$ ), 平均回收率为 99.39%, RSD 为 0.87%。结论 该方法稳定、可靠, 可作为清胃黄连丸的质量控制方法。

**关键词:** 清胃黄连丸; 小檗碱; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)05-0364-03

## HPLC determination of berberine in Qingwei Huanglian Pills

YAN Xiao-nan<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>

1. Tianjin Zhongxin Pharmaceuticals R & D Center, Tianjin 300457, China
2. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method to determine berberine in Qingwei Huanglian Pills. **Methods** Berberine was assayed on a Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase composed of acetonitrile-0.03 mol/L potassium dihydrogen phosphate (35:65) at a flow rate of 1.0 mL/min; The determination wavelength was 345 nm. **Results** The calibration curves were linear in the range of 0.025 5—0.510 0 μg ( $r = 0.9999$ ) for berberine. The average recoveries ( $n = 6$ ) of berberine was 99.39% (RSD = 0.87%). **Conclusion** The method is proved to be simple and reliable and could be used for quality control of Qingwei Huanglian Pills.

**Key words:** Qingwei Huanglian Pills; berberine; HPLC

清胃黄连丸由黄连、黄柏、黄芩等十余味中药组成, 具有清胃泻火、解毒消肿的作用, 用于治疗口舌生疮、齿龈或咽喉肿痛。黄连、黄柏为清胃黄连丸处方中主要药味, 有清热燥湿、泻火解毒的功。小檗碱为黄连和黄柏中主要有效成分, 在抗糖尿病、抗肿瘤、抗菌、抗炎、神经保护等方面都可以发挥很好的药效<sup>[1-3]</sup>。对 HPLC 法测定清胃黄连丸(大蜜丸)中小檗碱进行研究, 该方法结果准确, 重复性好, 快速简便, 可作为清胃黄连丸的定量方法, 较目前《中国药典》2010 版一部“清胃黄连丸(大蜜丸)”测定项下所使用的薄层扫描法更加准确、简便。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 小檗碱对照品(批号 110731-200208, 中国食品药品检定研究院); 清胃黄连丸(大蜜丸)为自制

样品, 规格为 9 g/丸, 批号分别为 100920、100925、100930; 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为纯水, 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钾 (35:65); 检测波长 345 nm; 体积流量 1.0 mL/min, 理论塔板数按小檗碱计算应不低于 4 000。

#### 2.2 对照品和供试品的配制

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 10 μg/mL 溶液, 即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取清胃黄连丸, 剪碎, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入盐酸-甲醇 (1:100) 25 mL, 密塞, 称定质量, 置 50 °C 水浴中加热 15 min, 取出放冷, 超声处理(功

率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀、离心、滤过, 精密量取上清液 5 mL, 置碱性氧化铝柱 (10~200 目, 10 g, 内径 1 cm, 干法装柱) 上, 用甲醇 45 mL 洗脱, 收集洗脱液至 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀、滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 标准曲线的制备** 精密称取小檗碱对照品 5.10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得到 0.510 mg/mL 的对照品储备液。精密移取对照品储备液, 配制成 51.0、25.5、20.4、10.2、5.1、2.6  $\mu\text{g/mL}$  对照品溶液。对照品注入高效液相色谱仪, 以进样量为横坐标, 相应的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 并以最小二乘法计算标准曲线:  $Y = 385\ 898.513X - 829.426$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 结果显示小檗碱对照品在 25.5~510.0 ng 与峰面积呈良好的

线性关系。

**2.3.2 空白试验** 称取缺黄连、黄柏的清胃黄连丸样品, 按照“2.2.2”项下操作制备阴性对照溶液, 与清胃黄连丸供试品溶液比较, 阴性对照对清胃黄连丸的测定无干扰, 见图 1。

**2.3.3 精密度试验** 取同一批 (批号 100925) 供试品溶液, 按以上色谱条件重复进样 6 次, 测定小檗碱峰面积, 结果 RSD 为 0.97%。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一批 (批号 100925) 供试品溶液, 按以上色谱条件在 0、2、4、6、8、10、12 h 分别进样测定峰面积, 结果在 12 h 内测定, 供试品溶液小檗碱峰面积 RSD 为 0.64%。结果表明供试品溶液在 12 h 内基本无变化, 稳定性良好。

**2.3.5 重现性试验** 精密称取同一批 (批号 100925) 样品 6 份, 制备供试品溶液, 测定峰面积并计算小檗碱的量为 2.78 mg/g, RSD 为 1.05% ( $n = 6$ )。

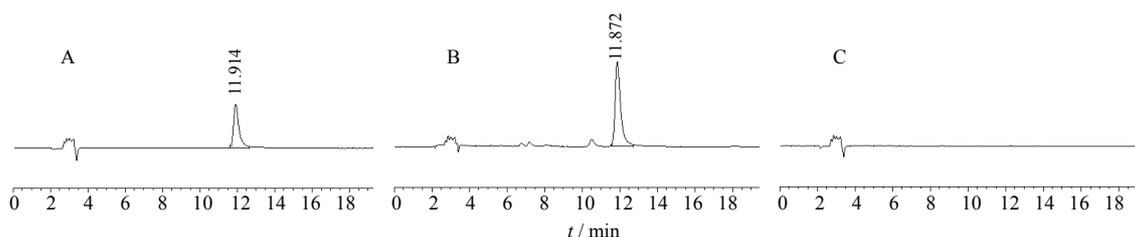


图 1 小檗碱对照品 (A)、清胃黄连丸 (B)、阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of berberine reference substance (A), Qingwei Huanglian Pills (B), and negative sample (C)

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取已测定样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密加入小檗碱对照品溶液适量, 制备供试品溶液, 测定峰面积并计算, 结果表明平均回收率为 99.39%, RSD 为 0.87%。

### 2.4 样品测定

取批号为 100920、100925、100930 的 3 批清胃黄连丸, 按“2.2.2”项下操作, 精密吸取上述供试品溶液与对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算, 得小檗碱分别为 2.89、2.75、3.02 mg/g。

## 3 讨论

采用乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钾 (35:65)、乙腈-0.1%磷酸 (36:64)、甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (40:60) 等不同流动相进行实验, 结果乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钾 (35:65) 的分离效果最佳, 保留时间适中, 故选用为流动相<sup>[4-7]</sup>。

清胃黄连丸使用盐酸甲醇提取后直接进样测定, 供试品溶液色谱中杂质峰较多, 分离不佳, 影

响测定结果。对萃取、过氧化铝柱等除杂方式进行考察, 试验结果表明, 使用碱性氧化铝柱进行处理, 可以去除大部分杂质<sup>[8]</sup>。

使用不同的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱进行测定, 如 Agilent 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm)、YMC 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm)、Phenomenex GEMINI C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm), 色谱峰峰型和分离度良好, 测定结果不受影响, 证明本方法耐用性良好。

通过方法学考察建立了 HPLC 法测定清胃黄连丸中小檗碱的方法。本方法简便易行, 结果准确, 重复性好, 可作为清胃黄连丸质量标准的定量方法。

### 参考文献

- [1] 李彩虹, 周克元. 黄连活性成分的作用及机制研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 466-468.
- [2] 章涛, 李苌清, 杨俊卿, 等. 小檗碱抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及其与过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  的关系 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 244-247.

- [3] 王 静, 张艳军, 常亮堂. 小檗碱对  $A\beta_{25-35}$  损伤大鼠皮层神经元的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 42(4): 728-733.
- [4] 谢晓燕, 张忠君, 于春英. 高效液相色谱法测定七味柏苓片中盐酸小檗碱和五味子乙素的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(09): 1636-1638.
- [5] 解 娟, 张 鹏, 李巧如, 等. 高效液相色谱法测定泌尿宁片中盐酸小檗碱的含量 [J]. 海峡药学, 2007, 19(09): 28-29.
- [6] 侯 峰, 田金苗. 高效液相色谱法测定香连胶囊中盐酸小檗碱的含量 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2756-2757.
- [7] 崔 哲. 高效液相色谱法测定消糖灵胶囊中盐酸小檗碱的含量 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1517-1518.
- [8] 王德甫, 许干丽, 左 鼎, 等. HPLC 法测定石斛夜光丸 (大蜜丸) 中盐酸小檗碱的含量 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10637-10638.

## 《中国药学杂志》2012 年征订启事

《中国药学杂志》是我国药学界创刊最早、发行量较大、反映我国药学各学科进展和动态的最具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者群为高、中级药学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药理学各学科, 辟有院士笔谈、专家笔谈、综述、论著 (内容包括: 重大新药创制、生物技术、中药及天然药物、药理、药剂、临床药学、药品质量及检验、药物化学)、药物与临床、新药述评、药学史、药学人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊 58 年来在医药卫生界享有很高声誉。连续三次荣获国家期刊奖, 三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖。2007 年获“百种杰出学术期刊”称号。2006-2011 年连续六年被评为“中国科协精品期刊工程项目资助期刊”。被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、《国际药学文摘》(IPA) 收录, 加入中国学术期刊光盘版, 进入北大中文科技期刊目录 (核心版, 排名第 2)。欢迎广大医药工作者积极订阅。

地址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室, 100022。半月刊。电话 010-58699280/75/76/78/79。传真: 010-58699295。网址: [www.zgyxzz.com.cn](http://www.zgyxzz.com.cn)。电子信箱 [zgyxzz@cpa.org.cn](mailto:zgyxzz@cpa.org.cn)。邮发代号: 2-232, 定价: 每期 30 元, 全年 720 元。