

清热养阴丸中盐酸小檗碱的含量测定

秦德松 龚 艳^(通讯作者) 刘琪雯 王春林 田 霞

重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 409000

摘要:目的: 建立清热养阴丸中黄连的盐酸小檗碱的含量检测方法。色谱柱为 Agilent ZQRBAX-SB-C18 (4.6 × 250mm, 5 μm), 柱温: 23℃; 流动相: 乙腈-0.1mol/L 磷酸二氢钾-25mmol/L 十二烷基硫酸钠 (52:24:24); 检测波长: 265nm; 流速: 1ml/min。结果: 盐酸小檗碱在 0.7~70ug/ml 范围内线性良好 ($r=0.99999$); 平均加样回收率为 99.58%, RSD=0.3%。结论: 经实验结果表明, 所选液相色谱条件合理, 方法简便易行, 专属性强, 分离度好, 可作为该制剂中盐酸小檗碱的含量测定。

关键词: HPLC; 清热养阴丸; 盐酸小檗碱; 含量测定

0 引言

清热养阴丸收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第二册, 通过对处方中十二味药进行粉碎成细粉, 混匀, 每 100g 加炼蜜 90~110g 制成大蜜丸, 既得。其中黄连作为处方中的重要组成成分, 黄连具有清热解毒的功效, 主要含表小檗碱、黄连碱、巴马汀、盐酸小檗碱等主要成分。由于清热养阴丸原质量标准中只有性状、检查及显微鉴别等项目, 没有含量测定, 所以本次研究建立了处方中黄连的含量测定方法, 以便更全面的控制药品的质量, 同时对药品的生产、检验等方面也有一定的实用价值。

1 实验材料

1.1 实验仪器

①岛津 SPD-M20A 液相色谱仪 (岛津企业管理 (中国) 有限公司);

②色谱柱 Agilent ZQRBAX-SB-C18 (4.6 × 250mm, 5 μm);

③超声波清洗机 SB-5200 DTDN (宁波新芝生物科技股份有限公司);

④万分之一天平 AL204 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司);

⑤十万分之一天平 XP205 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司);

1.2 实验样品与试剂

1.2.1 实验样品

盐酸小檗碱对照品 (批号 110713-202316, 由中检院提供)

样品来源见表 1:

表 1 样品来源统计

编号	生产厂家	批号
1	北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂	0013071
2	北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂	0013566
3	北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂	0012103

1.2.2 实验试剂

①甲醇、盐酸、硫酸 (均为分析纯 重庆川东化工有限公司);

②乙腈 (色谱纯 德国默克公司);

③十二烷基硫酸钠 (化学纯 成都市科龙化工试剂厂);

④磷酸二氢钾 (分析纯 重庆博龙科技有限公司);

⑤0.1mol/L 磷酸二氢钾 (称 13.6g 磷酸二氢钾用超纯水定容至 1000ml);

⑥0.025mol/L 十二烷基硫酸钠 (称 7.2095g 十二烷基硫酸钠用超纯水定容至 1000ml)。

2 实验方法与结果

2.1 黄连的定量研究

2.1.1 色谱条件考察

色谱柱: 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱; 柱温: 26℃; 流动相: 乙腈-0.1mol/L 磷酸二氢钾-0.025mmol/L 十二烷基硫酸钠 (52:24:24); 检测波长: 265nm; 体积流量: 1ml/min; 进样量: 10ul。

2.1.2 供试品溶液的制备

取本品十丸, 剪碎, 取 1.2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇: 盐酸 (100:1) 100mL, 密塞, 称定质量, 摇匀, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz)

50min，取出，放冷，再称定质量，用甲醇:盐酸（100:1）补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 对照品溶液的制备

小檗碱对照品 10mg，精密称定，置 100ml 的量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制得对照品贮备液（盐酸小檗碱对照品溶液质量浓度为 0.0941mg/mL）；精密量取上述对照品贮备液 5ml 置 25ml 的量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，取续滤液，即得。

2.1.4 阴性对照溶液制备

按照处方配比称取缺黄连的药材粉末 1.2g，精密称定，同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.1.5 系统适用性考察

在上述色谱条件下，精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液（盐酸小檗碱对照品溶液质量浓度为 0.0941mg/mL），连续进样 6 针，每次 10 μ l 注入液相色谱仪中，统计峰面积、保留时间。结果见表 2：

表 2 系统适用性试验结果

试验号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD(%)
盐酸小檗碱 A	776736	776823	772397	774854	775079	776700	775431.5	0.3%
盐酸小檗碱保留时间 (min)	16.022	16.099	15.954	16.033	16.023	16.116	16.041	

上述试验结果表明，盐酸小檗碱保留时间均符合有关规定的要求。

2.1.6 专属性考察

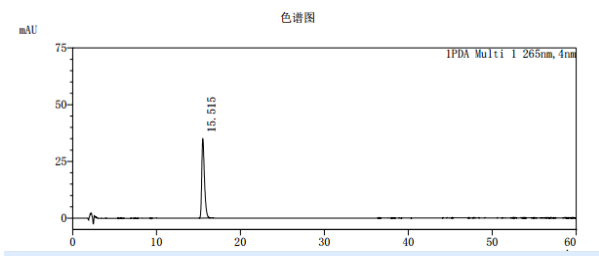


图 1 盐酸小檗碱对照高效液相色谱图

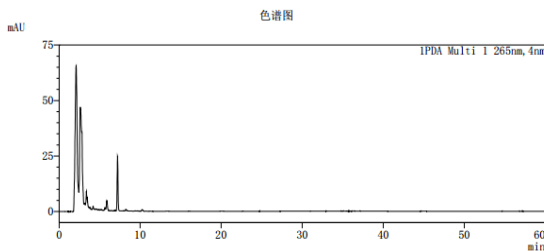


图 2 阴性对照高效液相色谱图

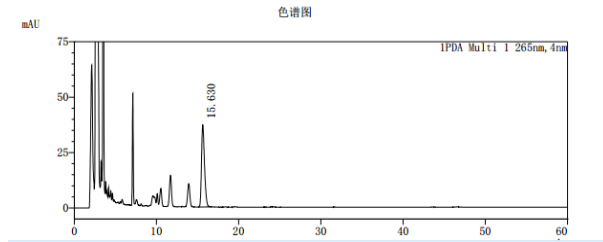


图 3 清热养阴丸高效液相色谱图

精密吸取对照品贮备液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μ l，在上述色谱条件下，注入液相色谱仪，测定，以对照品的峰型、保留时间为对照，结果供试品溶液中盐酸小檗碱与对照品的峰型、保留时间一致，阴性对照溶液与对照品出峰时间无对应色谱峰出现，表明阴性对照无干扰，专属性强。结果见图 1.2.3：

2.1.7 线性范围考察

精密量取盐酸小檗碱对照品（盐酸小檗碱对照品溶液浓度为 0.0708mg/ml）2ml、3ml、5ml、10ml、20ml 置 20mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，制成标准曲线溶液，在上述色谱条件下，分别进样 10 μ L，测定峰面积值。结果盐酸小檗碱峰面积值 A（见表 3）：

表 3 盐酸小檗碱对照品线性测定结果表

进样量 C(μ g)	7.08	10.62	17.7	35.4	70.08
峰面积值 A	308365	467050	779493	1545696	3115968

以盐酸小檗碱对照品进样量 C 为横坐标，盐酸小檗碱对照品峰面积（A）为纵坐标绘制标准曲线见图 4：

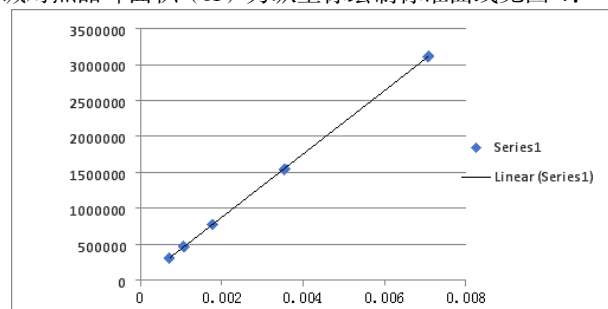


图 4 盐酸小檗碱对照品线性测定图

以上结果表明，盐酸小檗碱对照品进样量在 0.708mg-70.8mg 的范围内，与峰面积呈良好的线性关系（ $r=0.99999$ ）。

2.1.8 仪器精密度考察

取对照品贮备液进样 6 次，每次 10 μ l，测定峰面积。结果见表 4：

表 4 精密度试验结果

进样次数	1	2	3	4	5	6	平均值	RS D
盐酸小檗碱峰面积 A	776736	776823	772397	774854	775079	776700	775431.5	0.3%

上述试验结果表明, 仪器精密度良好。

2.1.9 溶液稳定性考察

(1) 对照品溶液稳定性考察

取同一盐酸小檗碱对照品贮备液分别于常温条件放置 0 小时、2 小时、4 小时、12 小时、24 小时进样, 分别 10 μ l, 记录峰面积, 并计算 RSD。结果见表 5:

表 5 对照品溶液稳定性试验结果

放置时间(h)	0	2	4	12	24	平均值	RSD
盐酸小檗碱峰面积值 A	776736	776823	772397	774854	775079	775177.8	0.3

上述试验结果表明, 对照品溶液在 24 小时内稳定。

(2) 样品溶液稳定性考察

取同一批样品溶液分别于在常温条件放置 0 小时、2 小时、4 小时、12 小时、24 小时进样, 每次 10 μ l, 记录盐酸小檗碱的峰面积, 并计算相对保留偏差。结果见表 6:

表 6 供试品溶液稳定性试验结果

放置时间(h)	0	2	4	12	24	平均值	RSD
盐酸小檗碱峰面积 A	898589	900801	905278	899913	902373	901390.8	0.3

上述试验结果表明, 供试品溶液至少在 24 小时内稳定。

2.1.10 方法重复性考察

表 7 方法重复性试验结果

试验号	1	2	3	4	5	6	平均值	RS D
盐酸小檗碱含量 (mg/g)	1.6349	1.6344	1.6352	1.6340	1.6352	1.6329	1.6344	0.1%

依照上述样品溶液制备方法, 取同一批样品 (批号: 001307) 测定盐酸小檗碱的含量, 并计算其 RSD 值。结果见表 7。

上述试验方法表明, 方法重复性良好。

2.1.11 样品回收率试验

精密称取样品 6 份(批号: 0013071) 取约 1.2g,精密称定,分别置 6 个具塞锥形瓶中,精密加入甲醇:盐酸(100:1) 溶液 50ml,各精密加入盐酸小檗碱对照品溶液 (盐酸小檗碱对照品溶液浓度为 0.867mg/ml) 50ml 同样品溶液的方法制备, 并按拟订的色谱条件测定盐酸小檗碱含量。按下面公式计算回收率, 结果见表 8:

$$\text{回收率} = \frac{\text{测得量 (mg)} - \text{样品中含里 (mg)}}{\text{添加量 (mg)}} \times 100\%$$

表 8 盐酸小檗碱回收率试验结果

编号	取样量 (g)	样品中盐酸小檗碱 (mg)	加入盐酸小檗碱量 (mg)	盐酸小檗碱测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.6002	0.9940	0.867	1.8589	99.8%	99.58%	0.3%
2	0.6010	0.9894	0.867	1.8558	99.9%		
3	0.6058	0.9921	0.867	1.8565	99.7%		
4	0.6048	1.0051	0.867	1.8676	99.5%		
5	0.6045	0.9975	0.867	1.8570	99.1%		
6	0.6000	0.9886	0.867	1.8514	99.5%		

2.1.12 样品含量测定

取三批样品各 2 份, 每份 6g, 精密称定, 依照供试品溶液制备方法制备, 分别测定三批样品中盐酸小檗碱的含量。结果见表 9:

表 9 含量测定结果

批号	盐酸小檗碱含量 (mg/g)
0013071	1.6512
0013566	1.6435
0012103	1.6490

3 小结与讨论

药品质量是保障临床疗效与患者安全的科学基石,也是药学领域学术研究的核心议题。通过对药品有效成分的含量测定,不仅能有效控制药品的质量,也能让企业的品牌不容易被仿制和假冒,更有利于药品生产企业的健康发展。此次在清热养阴丸原有标准的基础上,增加了对黄连的含量测定。采用高效液相测定此方中盐酸小檗碱的含量时,采用甲醇:盐酸(100:1)超声处理 50min,以乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钠(用磷酸调节 PH 值 3.0)(30:70)为流动相时,阴性样品有干扰,且峰型不佳,最后采用乙腈-0.1mol/L 的磷酸二氢钾-25mmol/L 的十二烷基硫酸钠(52:24:24);检测波长为 345nm 时,阴性样品有干扰,把检测波长调整为 265nm 时,峰型表现良好。综上,在采用高效液相测定黄连中盐酸小檗碱含量时,采用乙腈-0.1mol/L 的磷酸二氢钾-25mmol/L 的十二烷基硫酸钠(52:24:24)为流动相,检测波长为 265nm 时试验结果比较理想,此方法简便、专属性强,可作为清热养阴丸丸中盐酸小檗碱的含量测定方法。

参考文献:

- [1]卫生部药典委员会.卫生部药品标准中药成方制剂(第二册)[M].北京:人民卫生出版社,1995.
 - [2]国家药典委员会编.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
 - [3]曹素萍,陈芳.黄连中盐酸小檗碱提取方法研究进展[J].海峡药学,2016(02).
 - [4]熊云珍.HPLC 法测定胃痛舒胶囊中盐酸小檗碱的含量[C]//中国药学会.中国药学会第十三届青年药学科科研成果交流会论文集.孝感市中医院,2016:625-627.
 - [5]王炜辰,严国鸿,李煌,等.HPLC 法测定蛇伤胶囊中盐酸小檗碱含量[J].山西中医学院学报,2016,17(05):26-28.
 - [6]吕本强,范积平,张贞良,林东贤.HPLC 法测定复方石栗喷雾剂中盐酸小檗碱含量[J].中国药业,2017,3.
- 作者简介:**秦德松,男,汉,重庆,本科,重庆市食品药品检验检测研究院,中级职称,研究方向药品检验检测方向。通讯作者:龚艳,女,重庆,本科,土家族,重庆市食品药品检验检测研究院,初级职称,研究方向为药品质量检验检测。