

· 研究报告 ·

HPLC法测定冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱的含量

侯晓丽, 谭朝丹, 时扣荣, 顾伟鹰, 陈伟成 (上海中医药大学附属第七人民医院, 上海 200137)

[摘要] 目的 建立 HPLC 法测定冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱的含量。方法 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(用磷酸调节 pH=3)(28:72); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 室温(25 ℃); 检测波长: 345 nm。结果 盐酸小檗碱在 1.00~50.00 μg/ml 范围内线性关系良好($r=0.9996$), 平均回收率为 104.70%, RSD 为 1.60% ($n=5$)。结论 该方法准确、灵敏度高、专属性强、重现性好, 对提高冬柏通淋合剂的质量控制标准具有参考意义。

[关键词] 冬柏通淋合剂; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0353-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.016

Berberine hydrochloride assay in Dongbai Tonglin Heji by HPLC method

HOU Xiaoli, TAN Zhaodan, SHI Kourong, GU Weiyong, CHEN Weicheng (Department of Pharmacy, Seventh People's Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, 200137, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for determination of berberine hydrochloride in Dongbai Tonglin Heji. **Methods** The separation column of Kromasil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile and 0.05 mol/L NaH₂PO₄ solution (pH was adjusted to about 3 with phosphoric acid). The flow rate was 1.0 ml/min with the column at room temperature and the detection wavelengths at 345 nm for berberine hydrochloride. **Results** The linear range of berberine hydrochloride was 1.00~50.00 μg/ml ($r=0.9996$). The average recoveries of berberine hydrochloride were 104.70% (RSD 1.60%, $n=5$). **Conclusion** This method is accurate, sensitive, selective and reproducible. It provides an alternative method to improve the quality control of Dongbai Tonglin Heji.

[Key words] Dongbai Tonglin Heji; berberine hydrochloride; HPLC

慢性尿路感染^[1]是临床较为常见的一种疾病,常于急性尿路感染经初步治疗后未能完全治愈,伴有尿频、尿急、尿痛等下尿路刺激症状,常反复发作,多属中医淋证中“劳淋”的范畴。由于是细菌直接引起的泌尿系统感染,西医需长期用药治疗,但效果不佳,且易引起细菌耐药和不良反应。

冬柏通淋合剂是根据全国著名肾病专家、上海市第七人民医院叶景华教授的经验方开发的院内制剂,早在 20 世纪 60 年代就开始用于临床治疗急慢性肾盂肾炎、泌尿系统感染,因疗效显著深受患者欢迎^[2]。黄柏作为方中的主要有效成分之一,因具有

清热燥湿,泻火除蒸,解毒疗疮等功效^[3],用于湿热泻痢、黄疸、带下、热淋、阴虚火旺、盗汗骨蒸等,而被《本草纲目》等多种中药典籍所记载。

黄柏作为本方中主要药味成分,目前尚无其含量测定方法和限度要求的研究报道。盐酸小檗碱是中药黄柏中的主要活性成分之一,也是《中华人民共和国药典》2015 年版(一部,简称《中国药典》)黄柏含量测定的指标。为了提高中药制剂的质量,本研究采用 HPLC 法建立了冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱的含量测定方法,并根据测定结果制订了相关的含量限度,为其质量标准提高以及处方工艺进一步优化提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AD 高效液相色谱系统(日本岛津公司);pH 测试仪(瑞士梅乐特-托利多仪器有限公司);DL-720A 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);XS205DU 型电子天平(瑞士梅乐特-

[基金项目] 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目(ZY3-JSFC-2-1011);上海中医药大学附属第七人民医院“七院新星”人才培养计划(XX2016-10)

[作者简介] 侯晓丽,硕士研究生,药师。Email: houxiaoli1225@163.com

[通讯作者] 陈伟成,本科,主任药师。研究方向:医院制剂、中药成分分析。Email: wisechr@126.com

托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂和药品 冬柏通淋合剂(上海市第七人民医院委托上海杏灵科技药业股份有限公司生产,批号:1605001),盐酸小檗碱对照品(四川协力制药有限公司,批号:20110830);阴性对照品(医院自制);乙腈、甲醇均为色谱纯;水为娃哈哈高纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钠(用磷酸调节 pH=3)(28:72), 流速:1.0 ml/min; 柱温:室温(25 °C); 检测波长:345 nm; 进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取在 120 °C 干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品,精密称定,置棕色量瓶中,加 50%

甲醇适量,超声使之溶解,放冷,定容至刻度,摇匀,分别配制成每 1 ml 中含盐酸小檗碱 100 μg 的标准溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 精密量取冬柏通淋合剂 5 ml,置 50 ml 量瓶中,加流动相 35 ml,超声处理 15 min,放冷,流动相溶液定容至 50 ml,摇匀。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,精密量取续滤液 0.5 ml,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除黄柏以外的各种药材适量,依照处方工艺及供试品溶液制备方法,制得阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 按照上述色谱条件,分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 20 μl,进样测定。结果表明,供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相同的保留时间上有相同的色谱峰,而阴性对照品在此处无吸收峰,表明专属性良好,结果见图 1。

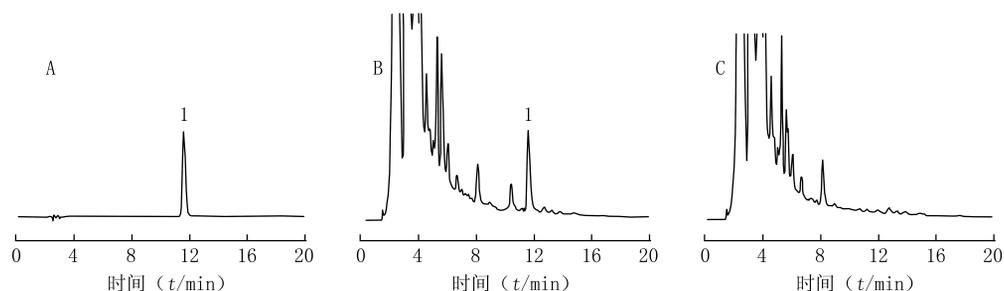


图 1 冬柏通淋合剂的 HPLC 图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 盐酸小檗碱

2.4 线性关系考察 分别精密量取“2.2.1”项下的盐酸小檗碱对照品溶液适量,置 10 ml 棕色量瓶中,加流动相稀释,定容至刻度,混匀,使盐酸小檗碱含量为 1.00、5.00、10.00、25.00、50.00 μg/ml。按“2.1”项下色谱条件,进样 20 μl,测定峰面积。以样品浓度为横坐标(X, μg/ml),峰面积为纵坐标(Y),计算回归方程:Y=516 45X-44 736, r=0.999 6。结果表明盐酸小檗碱在 1.00~50.00 μg/ml 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

2.5.1 日内精密度 精密吸取同一份对照品溶液 20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次,记录峰面积。结果 RSD 为 1.31% (n=5),表明精密度较好。

2.5.2 日间精密度 精密吸取同一份对照品溶液 20 μl,按“2.1”项下色谱条件每天测定 1 次,连续测定 5 d,记录峰面积。结果 RSD 为 1.52% (n=5),

表明精密度较好。

2.6 稳定性试验 依“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备冬柏通淋合剂供试品溶液(批号:1605001),分别在 0、2、4、6、8 h 各进样 1 次,记录峰面积,计算得到盐酸小檗碱的 RSD 为 0.93% (n=5),表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批冬柏通淋合剂样品(批号:1605001) 5 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 20 μl 进样,记录峰面积,计算盐酸小檗碱的含量,含量平均值为 0.025 2 mg/ml, RSD 为 1.74% (n=5),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密量取同一批已知盐酸小檗碱含量的冬柏通淋合剂(批号:1605001,盐酸小檗碱含量约 0.025 mg/ml, 5 ml) 5 份,每份 5 ml,各加入盐酸小檗碱(0.253 mg/ml)、对照品溶液 5 ml,

(下转第 378 页)

- [8] 吴玉洲, 韦冠, 陈永法. 儿科领域的药物经济学研究现状初探——基于美国《药物经济学》杂志[J]. 中国药物经济学, 2013, 8(2): 12-15.
- [9] 胡春阳, 韩晟, 陈路佳, 等. 他氟前列素与拉坦前列素治疗原

发性开角型青光眼的成本效果分析[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(23): 2831-2836.

[收稿日期] 2016-11-21 [修回日期] 2017-03-20
[本文编辑] 李睿曼

(上接第354页)

分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液并测定含量, 计算样品的加样回收率。结果见表1。

表1 盐酸小檗碱加样回收率试验结果(n=5)

| 取样量 (v/ml) | 原有量 (m/mg) | 加入量 (m/mg) | 实测量 (m/mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|--------------|------------|
| 5.00 | 1.29 | 1.265 | 2.71 | 106.07 | 104.70 | 1.60 |
| 5.00 | 1.29 | 1.265 | 2.68 | 104.89 | | |
| 5.00 | 1.29 | 1.265 | 2.61 | 102.15 | | |
| 5.00 | 1.29 | 1.265 | 2.66 | 104.11 | | |
| 5.00 | 1.29 | 1.265 | 2.72 | 106.26 | | |

2.9 样品含量测定 取3个批次的冬柏通淋合剂, 按“2.2.2”项下处理方法制备供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各20 μl, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算含量, 测定3批冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱的含量, 结果见表2。

表2 冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱的含量测定结果(n=3)

| 批号 | 样品量 (v/ml) | 盐酸小檗碱含量 (ρ _B /μg·ml ⁻¹) | 平均含量 (ρ _B /μg·ml ⁻¹) |
|---------|---------------|---|--|
| 1605001 | 5.00 | 28.39 | 27.89±0.58 |
| | 5.00 | 27.25 | |
| | 5.00 | 28.02 | |
| 1701001 | 5.00 | 29.04 | 29.07±0.12 |
| | 5.00 | 29.21 | |
| | 5.00 | 28.97 | |
| 1701003 | 5.00 | 26.98 | 26.95±0.09 |
| | 5.00 | 26.85 | |
| | 5.00 | 27.01 | |

3批样品中盐酸小檗碱的平均含量分别为27.89、29.07、26.95 μg/ml, 因目前检测的样品均为小批量生产, 考虑到后续中试放大乃至实际生产的损失, 故暂定冬柏通淋样品中盐酸小檗碱的含量不得少于20 μg/ml。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 参考相关文献[4,5]及《中国药典》, 均选择345 nm作为盐酸小檗碱的检测波长。故本研究沿用此波长, 结果显示在345 nm波长

处测定冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱可以实现基线分离, 检测灵敏度和准确性均较好。

3.2 HPLC条件的选择 由于盐酸小檗碱属于季胺型生物碱, 该成分极性较大, 为了达到良好的分离效果, 本研究采用反相色谱柱进行分离。文献报道^[6-9]曾用乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(24:76)、(25:75); 乙腈-0.1% 磷酸(45:55)和乙腈-水(29:71)作为流动相, 《中国药典》中, 盐酸小檗碱以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(38:62)为流动相, 综合考虑分离度、出峰时间等因素, 最终选择流动相比比例为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(28:72)。结果显示该条件下样品分离效果好, 且出峰时间适中。

3.3 结果分析 采用HPLC法测定盐酸小檗碱含量, 操作简便、快捷、重复性好、结果准确可靠, 可用于冬柏通淋合剂中盐酸小檗碱的含量测定, 为冬柏通淋合剂的质量标准制定奠定了良好基础, 为研究开发该药及其质量标准方法的建立提供了可靠依据, 也可为含黄柏制剂的定量分析提供参考。

【参考文献】

- [1] 沈丽萍, 李珺, 张玮, 等. 温肾清利法治疗慢性尿路感染疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(4): 55-56.
- [2] 石伟, 叶玉妹, 唐英, 等. 多指标综合加权评分法考察冬柏通淋合剂提取工艺[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(3): 530-532.
- [3] 吴嘉瑞, 张冰, 张光敏. 黄柏药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(11): 160-162.
- [4] 杨志欣, 李晓阳, 王祺茹, 等. 半夏泻心汤胃内滞留片质量标准的研究[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(5): 93-96.
- [5] 杨协清, 朱月琴. HPLC法测定三黄胶囊中盐酸小檗碱含量[J]. 中药材, 2010, 33(6): 1001-1002.
- [6] 任焯, 徐辉, 葛争艳, 等. HPLC法测定降糖消脂片中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(18): 2530-2532.
- [7] 王美丽, 董晖, 戴丽丽, 等. HPLC法测定蒙药保肾散中盐酸小檗碱的含量[J]. 内蒙古民族大学学报(自然汉文版), 2016, 31(3): 68-73.
- [8] 李文霞, 宋平顺. HPLC法同时测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 药学进展, 2011, 35(4): 178-181.
- [9] 谭生建, 魏萍, 刘刚, 等. HPLC测定黄柏石膏散中盐酸巴马丁和盐酸小檗碱含量[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(7): 546-547.

[收稿日期] 2017-03-02 [修回日期] 2017-05-31
[本文编辑] 李睿曼