

HPLC 法测定腹达康微丸中盐酸小檗碱的含量

丘振文^{1,2}, 钟 瑜³ (1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 3. 广州固志医药科技有限公司, 广东 广州 510370)

摘要: **目的** 建立腹达康微丸中盐酸小檗碱的 HPLC 含量测定方法。**方法** 采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.03 mol/L 磷酸(三乙胺调 pH 至 3.5)(38 : 62), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 265 nm, 柱温为室温。**结果** 盐酸小檗碱线性范围为 5.04~60.44 μg·min⁻¹, 平均回收率为 100.8 %, RSD 为 2.0 %。**结论** 该法操作简单, 重现性好, 结果准确, 可作为腹达康微丸的质量控制方法。

关键词: 腹达康微丸; 盐酸小檗碱; HPLC

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0616-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.023

Determination of Berberine Hydrochloride in *Fudakang* Pellets by HPLC

QIU Zhenwen^{1,2}, ZHONG Yu³ (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 3. Guangzhou Guzhi Medicinal Science & Technology Co. Ltd, Guangzhou 510370 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the determination of berberine hydrochloride in *Fudakang* pellets by HPLC. **Methods** The chromatographic conditions were as follows: Hypersil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) at room temperature, C₂H₅N-0.03mol/LH₃PO₄ (adjusting the pH value to be 3.5 with triethylamine) in the volume fraction of 32 : 68 as mobile phase, the flow rate at 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength being 265 nm. **Results** The calibration curves showed good linearity in the range of 5.04~60.44 μg·mL⁻¹, the average recoveries was 100.8 %, and RSD was 2.0 %. **Conclusion** The established method is simple, with exact result and good reproducibility, and can be used for the quality control of *Fudakang* pellets.

Keywords: *Fudakang* pellets; Berberine hydrochloride; HPLC

腹达康微丸由救必应、功劳木、番石榴叶及葛根 4 味中药组成, 具有清热利湿、升清止泻的功效, 用于急性胃肠炎引起的腹痛腹泻。盐酸小檗碱是功劳木的主要有效成分, 为了有效控制腹达康微丸的质量, 保证疗效, 本实验选择盐酸小檗碱为含量测定指标, 建立腹达康微丸中盐酸小檗碱含量的 HPLC 测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-10AD VP 高效液相色谱仪, SPD-10A VP 紫外检测器, 日本岛津公司; Sartorius BT 25S 电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; KQ-100DE 型超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂 腹达康微丸, 广州固志医药科技有限公

收稿日期: 2013-07-19

作者简介: 丘振文, 男, 博士研究生, 副主任中药师, 主要从事医院药学及中药新药的开发研究。Email: qzhenwen@163.com。

基金项目: 广东省科技计划课题(2011B031700079)。

司,批号:120306,120503,120809;盐酸小檗碱对照品,中国药品生物制品检定所,批号:110713-200910,供含量测定用;乙腈(色谱纯),Tedia company;水为纯净水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

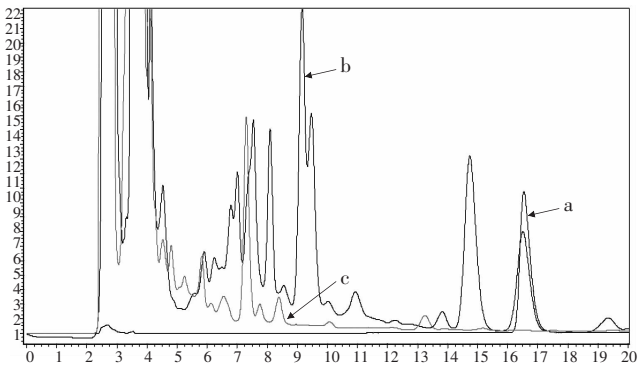
2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.03 mol/L 磷酸(三乙胺调 pH 至 3.5)(38:62);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:265 nm;灵敏度:0.1AUFS;柱温:室温;进样量:20 μL。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 3000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取在 105 ℃干燥 5 h 的盐酸小檗碱对照品适量,加入甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合溶液 100 mL,称定重量,冷浸 30 min,超声处理 45 min,放冷,用盐酸-甲醇(1:100)混合溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照品溶液的制备 取缺功劳木的阴性对照样品,按供试品溶液的制备方法同法操作,即得。

2.5 专属性试验 按照 2.1 项下的色谱条件分别测定对照品、供试品和阴性对照品溶液。结果表明,阴性溶液对盐酸小檗碱的测定无干扰,见图 1。



a. 对照品; b. 样品; c. 阴性对照品

图 1 盐酸小檗碱专属性试验 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of Fudakang pellets

2.6 线性关系考察 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加入甲醇制成每 1 mL 中含有 100.8 μg 的对照品溶液贮备液。精密吸取贮备液 0.5, 1.0, 2.0,

4.0, 6.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成浓度为 5.04, 10.08, 20.16, 40.32, 60.48 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。精密量取上述对照品溶液各 20 μL,按照 2.1 项下色谱条件进行测定。以浓度 X(μg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,盐酸小檗碱在 5.04~60.48 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好,回归方程为: Y=11061X+7788, r=0.9999。

2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液(20.16 μg·mL⁻¹) 20 μL。连续进样 6 次,记录峰面积,得盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 1.4 %(n=6),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性考察 取同一个供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样,按照上述色谱条件测定,结果盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 2.4 %(n=5),表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.9 重复性试验 取同一批号样品(批号:120306),按照供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按照上述色谱条件测定。结果样品中盐酸小檗碱的平均含量为 1.687 mg·g⁻¹, RSD 为 0.5 %(n=6)。

2.10 加样回收率试验 取已知含量的样品 0.5 g(批号:120306,含量 1.687 mg·g⁻¹),分取 6 份,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入浓度为 8.54 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液 100 mL,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算回收率,结果平均回收率为 100.8 %, RSD 为 1.95 %(n=6)。见表 1。

表 1 回收率试验结果

Table 1 Results of recovery test

编号	取样量 /g	样品含量 /mg	对照品加 入量/mg	测得总 量/mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.5002	0.8437	0.854	1.6758	97.4	100.8	1.95
2	0.5005	0.8442	0.854	1.7004	100.2		
3	0.5003	0.8439	0.854	1.7154	102		
4	0.5005	0.8441	0.854	1.7086	101.2		
5	0.5005	0.8442	0.854	1.7255	103.2		
6	0.5002	0.8437	0.854	1.7045	100.8		

2.11 样品测定 取腹达康微丸,共 3 批,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进行测定,结果见表 2。

3 讨论

有关盐酸小檗碱的含量测定方法有紫外分光光度

表 2 盐酸小檗碱含量的测定结果(mg·g⁻¹)

Table 2 Determination of berberine hydrochloride in samples

批号	样品 1	样品 2	平均值
01	1.751	1.719	1.735
02	1.751	1.719	1.735
03	1.705	1.673	1.689

法^[1]、薄层扫描法^[2]、高效毛细管电泳法^[3]、高效液相色谱法^[4-5]等。其中，高效液相色谱法最常用，《中国药典》2010 年版功劳木^[6]项下，亦采用高效液相色谱法测定其盐酸小檗碱的含量。

3.1 供试品制备方法的选择 试验中对比了水浴加热 45 min 和超声处理 45 min 两种不同的提取方法。结果表明，两种方法对盐酸小檗碱的提取效果无明显差异，但超声处理方法简便快捷，故选择了超声处理 45 min。对于提取溶剂，通过对比 80 %甲醇、甲醇、盐酸-甲醇(1 : 100)混合溶液 3 种不同溶剂对盐酸小檗碱提取效率的影响，表明选择盐酸-甲醇(1 : 100)混合溶液提取效率最佳。预试验亦考察了提取时间对提取效率的影响，结果表明，超声处理 45 min 已提取完全，故确定提取时间为 45 min。

3.2 流动相的选择 考察了甲醇-水，乙腈-水，乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液（用磷酸调 pH 至 3.0），乙腈-0.03 mol/L 磷酸(三乙胺调 pH 至 3.5)系统。结果表明，甲醇-水系统下可能由于甲醇洗脱能力较弱，使盐酸小檗碱保留时间较长且峰展宽；流动相为乙腈-水、乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液（用磷酸调 pH 至 3.0）时，盐酸小檗碱峰形差且拖尾；当流动相为乙腈-0.03 mol/L 磷酸(三乙胺调 pH 至 3.5)时，峰形对称且重现性好；经试验，pH 在 2.8~3.8 范围内波动对结果几乎无影响，考虑色谱柱的酸碱度最佳使用范围(pH 值为 2~8)及延长色谱柱使用寿命，选定 pH3.5。因此，本品盐酸小檗碱含量的测定采用乙腈-0.03 mol/L 磷酸（三乙胺调 pH 至 3.5)为色谱流动相。

3.3 色谱柱的选择 本品盐酸小檗碱含量测定的预试验选用了 3 种色谱柱：Hypersil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×

250 mm，5 μm）、Diamond C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Alltima C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）。3 种色谱柱分离均良好，以 Hypersil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）为最佳，综合考虑经济适用等因素，选用 Hypersil C₁₈（4.6 mm×250 mm，5 μm)为本品盐酸小檗碱含量测定的色谱柱。

3.4 检测波长的选择 使用 PERKIN -ELMER LAMBDA 紫外检测器，以流动相为溶剂对盐酸小檗碱对照品溶液在 200~400 nm 范围内进行全波长扫描，结果盐酸小檗碱在 228.8 nm、264.2 nm 和 347.4 nm 下均有最大吸收波长，其中，228.8 nm 和 264.2 nm 下吸光度较大，但考虑低波长下样品中大多化学成分均有紫外吸收易造成干扰，参考《中国药典》2010 年版功劳木^[6]项下检测波长的选择，最终确定 265 nm 为检测波长。

本试验参考相关标准及文献的方法，考察各个因素对盐酸小檗碱提取效率及 HPLC 色谱分离效果的影响，优化建立了腹达康微丸中盐酸小檗碱含量的 HPLC 测定方法，该法操作简单，重现性好，结果准确，可作为腹达康微丸的质量控制方法，为其质量标准的研究提供参考依据。

参考文献：

[1] 刘小艳，方炳虎，陈瑞爱，等. 紫外分光光度法测定盐酸环丙沙星、盐酸小檗碱预混剂中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国兽药杂志，2007，41(6)：17-18.

[2] 周仲华，余昶，文燕，等. 薄层扫描法测定烧伤搽剂中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国医院药学杂志，2008，28(2)：158-159.

[3] 胡慧冰，余为，柳克铃，等. 高效毛细管电泳法测定延黄烧伤膏中盐酸小檗碱的含量[J]. 中南药学，2008，6(3)：375-376.

[4] 赵陆华，范杰，徐继华，等. 高效液相色谱法测定口腔愈溃膜中盐酸小檗碱[J]. 中国现代应用药学，2003，20(3)：222-224.

[5] 张蓓蕾，夏醒醒，陈勤，等. HPLC 测定二妙丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中成药，2008，30(1)：152-154.

[6] 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，2010：79.

(编辑：宋威)