

UPLC法同时测定连参通淋片中5种黄连生物碱类成分的含量

周亚楠*,白 洁,袁 浩,刘永利*(河北省药品检验研究院,石家庄 050011)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4725-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.32

摘要 目的:建立同时测定连参通淋片中表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Scientific Synchronis C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(加三乙胺调pH至3.0)(30:70, V/V),流速为0.3 mL/min,检测波长为345 nm,柱温为25℃,进样量为2 μL。结果:表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱检测进样量线性范围分别为4.08~163 ng($r=0.999\ 9$),5.72~229 ng($r=0.999\ 8$),5.67~227 ng($r=0.999\ 9$),6.78~271 ng($r=0.999\ 6$),13.2~526 ng($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为96.83%~103.92%(RSD=2.2%, $n=9$),97.62%~104.85%(RSD=2.9%, $n=9$),99.44%~104.18%(RSD=1.8%, $n=9$),98.64%~104.42%(RSD=1.8%, $n=9$),98.24%~102.40%(RSD=1.5%, $n=9$)。结论:该方法简便、灵敏、快速、准确,适用于连参通淋片中5种黄连生物碱类成分含量的同时测定。

关键词 超高效液相色谱法;黄连生物碱;连参通淋片;含量

Simultaneous Determination of 5 Coptis Alkaloid in Lianshen Tonglin Tablets by UPLC

ZHOU Yanan, BAI Jie, YUAN Hao, LIU Yongli(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of epiberberine, jateorhizine hydrochloride, coptisine, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in Lianshen tonglin tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo Scientific Synchronis C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(pH adjusted to 3.0 with triethylamine)(30:70, V/V) at the flow rate of 0.3 mL/min. The detection wavelength was set at 345 nm, and column temperature was 25℃. The sample size was 2 μL. RESULTS: The linear ranges were 4.08-163 ng for epiberberine($r=0.999\ 9$), 5.72-229 ng for jateorhizine hydrochloride ($r=0.999\ 8$), 5.67-227 ng for coptisine($r=0.999\ 9$), 6.78-271 ng for palmatine hydrochloride($r=0.999\ 6$), 13.2-526 ng for berberine hydrochloride($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%. The recoveries were 96.83%-103.92% (RSD=2.2%, $n=9$), 97.62%-104.85% (RSD=2.9%, $n=9$), 99.44%-104.18% (RSD=1.8%, $n=9$), 98.64%-104.42% (RSD=1.8%, $n=9$), 98.24%-102.40% (RSD=1.5%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The developed method is simple, sensitive, rapid and accurate. It is suitable for simultaneous determination of 5 coptis alkaloids in Lianshen tonglin tablets.

KEYWORDS UPLC; Coptis alkaloid; Lianshen tonglin tablets; Content

连参通淋片由黄连、苦参、瞿麦、川木通、篇蓄、梔子、大黄、丹参、绵萆薢、茯苓、白术、石菖蒲、甘草等13味中药组成,具有清热祛湿、利水通淋的功效^[1]。该制剂现收载于国家食品药品监督管理局标准YBZ00622009,该标准中仅收载了黄连中盐酸小檗碱的含量测定项;且现有文献多采用薄层扫描法^[2]、紫外分光光度法^[3]、高效液相色谱法^[4-6]测定黄连生物碱的含量,但分离度和灵敏度均不好。鉴于此,笔者采用超高效液相色谱法(UPLC)建立了同时测定连参通淋片中表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱5种黄连生物碱含量的方法,以期完善该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型UPLC仪,包括光电二极管矩阵检测器、自

*主管药师,硕士研究生。研究方向:中药质量控制。电话:0311-85212007-8042。E-mail:172774170@qq.com

#通信作者:主任药师,硕士。研究方向:中药质量控制。电话:0311-85212007-8041。E-mail:Liuyongli2008@126.com

动进样器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);KQ-500KDE型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

连参通淋片(A厂,1511272、1503081、1503102、1503101、1503091、1511091、1511101、140305、130820、140304、140806,规格:0.8 g/片);表小檗碱对照品[批号:YS-(usp)-0049,纯度:98%]、黄连碱对照品(批号:BR-09205,纯度:98%)均购自日本Sigma公司;盐酸药根碱对照品(批号:110733-201108,纯度:90.3%)、盐酸巴马汀对照品(批号:110732-200506,纯度:100%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200911,纯度:86.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Scientific Synchronis C₁₈(100 mm×

2.1 mm,1.7 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(加三乙胺调pH至3.0)(30:70,V/V);流速:0.3 mL/min;检测波长:345 nm;柱温:25 ℃;进样量:2 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取待测成分对照品适量,精密称定,加甲醇适量,超声(功率:400 W,频率:40 kHz,下同)处理30 min,制成表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱质量浓度分别为0.102 1、0.142 8、0.141 7、0.328 8、0.328 8 mg/mL的单一对照品贮备液。取上述表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱和盐酸巴马汀单一对照品贮备液各5.0 mL,盐酸小檗碱对照品贮备液10.0 mL,置于同一50 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,研细,取约0.5 g,精密称定,置于150 mL具塞锥形瓶中,精密加盐酸-甲醇溶液(1:100,V/V)50 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷;再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液2 mL,置于10 mL量瓶中,加盐酸-甲醇溶液(1:100,V/V)定容,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和配方比例,制备缺黄连的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各待测成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以盐酸小檗碱峰计>10 000,保留时间约为10.2 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

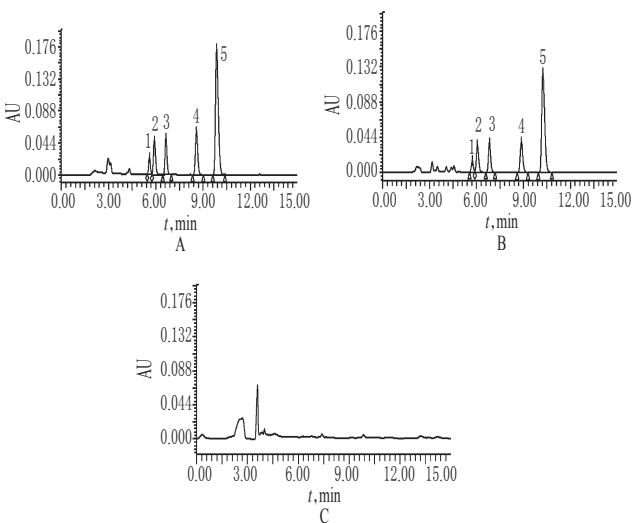
分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.4、0.6、1、2、6、10、16 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x,ng)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性范围见表1。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液2 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为0.2%、0.1%、0.6%、0.1%、0.2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:140806)适量,分别于室温下放置0、1、3、6、15、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为0.5%、0.9%、1.7%、0.5%、0.2%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.表小檗碱;2.盐酸药根碱;3.黄连碱;4.盐酸巴马汀;5.盐酸小檗碱
A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1.epiberberine; 2. jateorhizine hydrochloride; 3.coptisine; 4.palmatine hydrochloride; 5.berberine hydrochloride

图1 超高效液相色谱图
Fig 1 UPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围,ng
表小檗碱	$y=2.8\times10^5x+1\ 078$	0.999 9	4.08~163
盐酸药根碱	$y=1.7\times10^5x+1\ 246$	0.999 8	5.72~229
黄连碱	$y=3.0\times10^5x+2\ 188$	0.999 9	5.67~227
盐酸巴马汀	$y=1.6\times10^5x-4\ 858$	0.999 6	6.78~271
盐酸小檗碱	$y=2.1\times10^5x+17\ 144$	0.999 9	13.2~526

2.7 重复性试验

取样品(批号:140806)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的平均值分别为3.01、4.25、4.75、7.11、22.93 mg/g,RSD分别为0.8%、0.7%、1.0%、1.1%、0.7%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取样品(批号:140806)适量,共9份,每份约0.25 g,分别置于50 mL量瓶中,各加入低、中、高质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.9 样品含量测定结果

取11批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者采用光电二极管矩阵检测器在200~800 nm波长范围内进行光谱扫描,结果表明表小檗碱、盐酸药根

表2 加样回收率试验结果($n=9$)Tab 2 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	取样量, mg	样品含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %
表小檗碱	0.255 1	0.767 9	0.375 1	1.131 1	96.83	99.7	2.2
	0.250 5	0.754 0	0.375 1	1.121 1	97.87		
	0.250 3	0.753 4	0.375 1	1.143 2	103.92		
	0.258 7	0.778 7	0.751 3	1.516 5	98.20		
	0.257 6	0.775 4	0.751 3	1.511 4	97.97		
	0.258 5	0.778 1	0.751 3	1.529 2	99.98		
	0.256 4	0.771 8	1.501 4	2.289 4	101.08		
	0.257 6	0.775 4	1.501 4	2.277 1	100.02		
	0.255 6	0.769 4	1.501 4	2.289 2	101.22		
	0.251 0	1.066 8	0.480 8	1.544 0	99.26		
	0.251 5	1.068 9	0.480 8	1.541 6	98.32		
	0.250 3	1.063 8	0.480 8	1.537 1	98.44		
盐酸药根碱	0.257 7	1.095 2	0.901 4	2.040 3	104.85	100.4	2.9
	0.257 6	1.094 8	0.901 4	1.974 8	97.62		
	0.258 5	1.098 6	0.901 4	1.984 1	98.23		
	0.256 4	1.089 7	1.502 4	2.657 7	104.37		
	0.258 6	1.099 1	1.502 4	2.650 5	103.26		
	0.256 6	1.090 6	1.502 4	2.581 4	99.24		
黄连碱	0.255 1	1.211 7	0.661 0	1.896 0	103.52	102.3	1.8
	0.250 5	1.189 9	0.661 0	1.869 4	102.80		
	0.250 3	1.188 9	0.661 0	1.852 0	100.32		
	0.258 7	1.228 8	1.376 5	2.643 4	102.77		
	0.257 6	1.223 6	1.376 5	2.600 3	100.01		
	0.258 5	1.227 9	1.376 5	2.653 3	103.55		
	0.256 4	1.217 9	2.753 4	4.069 5	103.57		
	0.257 6	1.223 6	2.753 4	4.091 1	104.18		
	0.255 6	1.214 1	2.753 4	3.952 2	99.44		
	0.258 6	1.838 6	0.834 4	2.661 7	98.64		
	0.253 8	1.804 5	0.834 4	2.640 7	100.22		
	0.252 4	1.794 6	0.834 4	2.633 0	100.49		
盐酸巴马汀	0.255 4	1.815 9	1.668 8	3.537 5	103.16	101.7	1.8
	0.251 6	1.788 9	1.668 8	3.492 6	102.10		
	0.252 9	1.798 1	1.668 8	3.519 0	103.12		
	0.256 7	1.825 1	3.322 5	5.172 9	100.76		
	0.255 7	1.818 0	3.322 5	5.287 2	104.42		
	0.257 1	1.828 0	3.322 5	5.218 5	102.05		
盐酸小檗碱	0.258 6	5.929 7	2.473 1	8.413 9	100.44	100.8	1.5
	0.253 8	5.819 6	2.473 1	8.352 2	102.40		
	0.252 4	5.787 5	2.473 1	8.312 4	102.09		
	0.255 4	5.856 3	4.632 9	10.567 1	101.68		
	0.251 6	5.769 2	4.632 9	10.404 1	100.04		
	0.252 9	5.799 0	4.632 9	10.483 4	101.11		
	0.256 7	5.886 1	7.584 2	13.336 5	98.24		
	0.255 7	5.863 2	7.584 2	13.625 4	102.35		
	0.257 1	5.895 3	7.584 2	13.382 1	98.72		

碱、黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱在 228、265、345 nm 波长附近均有较大吸收,考虑到样品中药味较多,低波长处杂质峰可能会增多,故选择较大波长 345 nm 作为本试验的检测波长。

3.2 流动相的选择

笔者在参考相关文献^[7-9]的基础上,分别考察了不同比例的乙腈-磷酸二氢钾、乙腈-庚烷磺酸钠-磷酸二氢钾、乙腈-0.1%磷酸溶液-庚烷磺酸钠以及乙腈-0.1%磷酸溶液(加三乙胺)等作为流动相系统时的情况,结果乙腈-0.1%磷酸溶液-庚烷磺酸钠系统和乙腈-0.1%磷酸溶

表3 样品含量测定结果($n=3$,mg/g)Tab 3 Results of content determination of samples($n=3$,mg/g)

样品批号	表小 檗碱	盐酸药 根碱	黄连 碱	盐酸巴 马汀	盐酸小 檗碱	总量	每片总量, mg/片
1511272	3.01	4.54	4.27	5.62	22.13	39.57	31.656
1503081	3.10	4.43	4.19	5.56	22.07	39.35	31.480
1503102	2.97	3.87	3.75	4.91	19.38	34.88	27.904
1503101	2.89	3.67	3.72	4.66	18.45	33.39	26.712
1503091	2.88	3.69	3.68	4.78	18.81	33.84	27.072
1511091	2.93	4.04	3.88	4.95	19.53	35.33	28.264
1511101	3.06	4.27	4.11	5.23	20.68	37.35	29.880
140305	3.21	4.72	4.32	6.42	24.52	43.19	34.552
130820	2.72	3.24	3.01	3.97	16.47	29.41	23.528
140304	5.09	4.01	3.92	5.30	20.72	39.04	31.232
140806	3.01	4.25	4.75	7.11	22.93	45.35	36.280

液(加三乙胺)系统分离较好,基线平稳。但是,考虑到乙腈-0.1%磷酸-庚烷磺酸钠系统配置烦琐,且长期使用会对色谱柱造成堵塞,因此本试验最终选择乙腈-0.1%磷酸溶液(加三乙胺)系统,经过预试验最终确定流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(加三乙胺调pH至3.0)(30:70,V/V)。

综上所述,本方法简便、灵敏、快速、准确,适用于连参通淋片中5种黄连生物碱类成分含量的同时测定。

参考文献

- [1] 孔德宪,姜海,刘育强,等.HPLC测定连参通淋片中盐酸小檗碱的含量[J].中国现代中药,2011,13(5):29-31.
- [2] 刘法锦,孙东梅,鲁佳慧,等.薄层色谱扫描法测定黄连吴茱萸药对中黄连生物碱的含量[J].中成药,2010,32(1):75-79.
- [3] 朱强,王有为,齐海涛,等.不同品系黄连产量和质量的研究[J].中草药,2006,37(12):1866-1869.
- [4] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等.一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J].中国药杂志,2009,44(5):390-394.
- [5] 袁久荣,魏英勤,袁浩,等.RP-HPLC法同时测定黄连中4种原小檗碱型生物碱的含量[J].世界科学技术,2006,8(6):36-39.
- [6] 苏静华,张超,孙磊,等.HPLC法同时测定黄连上清片的黄芩-黄连-黄柏药对中9个指标性成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(11):1940-1945.
- [7] 张晓静,刘德福,丁菲菲,等.HPLC法测定癯清片中表小檗碱、黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和丹皮酚[J].现代药物与临床,2015,30(5):527-530.
- [8] 邓六勤,钟鸣.RP-HPLC法测定黄连上清片中盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀的含量[J].中国药房,2011,22(16):1514-1516.
- [9] 孙建彬,王欣,阳勇,等.黄连须中5种生物碱含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2015,26(7):1607-1609.

(收稿日期:2017-04-21 修回日期:2017-07-06)

(编辑:刘 柳)