

反相高效液相法测定二黄消炎片中 5 种异喹啉类生物碱的含量\*

谭燕萍<sup>1</sup>,李彩兰<sup>2</sup>,谈丽华<sup>2</sup>,苏子仁<sup>2△</sup>

(1. 广东省佛山市禅城区朝阳医院药剂科 528000;2. 广州中医药大学中医药数理工程研究院,广东广州 510006)

**[摘要]** **目的** 建立同时测定二黄消炎片中 5 种原小檗碱类生物碱(小檗碱、药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀)含量的测定方法。**方法** 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定。色谱柱:YMC-Pack ODS-AM (4.6 mm×250.0 mm,5 μm);流动相:以 0.1%(v/v)甲酸水溶液-乙腈流动相梯度洗脱;流速:0.4 mL/min;进样量:10 μL;检测波长:345 nm;柱温:27 ℃。**结果** 二黄消炎片中 5 种生物碱成分的色谱分离行为良好,小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的线性范围分别为 1.526 4~5.342 4( $r=0.999\ 9$ )、0.403 2~1.411 2 ( $r=0.999\ 6$ )、0.309 7~1.083 9( $r=0.999\ 8$ )、0.111 2~0.389 2( $r=0.999\ 8$ )、0.162 2~0.567 7( $r=0.999\ 6$ ) μg,平均回收率分别为 98.69%、98.66%、98.67%、98.67%、98.67%。**结论** 反相高效液相色谱法可行性高,专属性强,准确性高,重现性好,可作为二黄消炎片质量控制的参考依据之一。

**[关键词]** 色谱法,高压液相;二黄消炎片;小檗碱;巴马汀;黄连碱;药根碱;表小檗碱;含量测定

**[中图分类号]** R927 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)17-2323-04

RP-HPLC simultaneous determination of five isoquinoline alkaloid in Erhuang Xiaoyan tablets\*

TAN Yanping<sup>1</sup>,LI Cailan<sup>2</sup>,TAN Lihua<sup>2</sup>,Su Ziren<sup>2,3△</sup>

(1. Department of Pharmacy,Chaoyang Hospital of Foshan District,Foshan,Guangdong 528000,China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Development and

Research of Chinese Medicine, Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine,

Guangzhou University of Chinese Medicine,Guangzhou,Guangdong 510006, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for determining five isoquinoline alkaloids (including berberine,jatrorrhizine,jatrorrhizind,coptisine and palmatine) in Erhuang Xiaoyan tablets simultaneously. **Methods** Determination by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Column:YMC-Pack ODS-AM (4.6 mm×250.0 mm,5 μm);mobile phase:elution with 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution-acetonitrile mobile phase gradient;flow rate:0.4 mL/min;injection volume:10 μL; detection wavelength:345 nm;column temperature:27 ℃. **Results** Five of isoquinoline alkaloids in Erhuang Xiaoyan tablets were separated perfectly. The good linear relationships were obtained in the following ranges,1.526 4—5.342 4 μg ( $r=0.999\ 9$ ) for berberine,0.403 2—1.411 2 μg ( $r=0.999\ 6$ ) for palmatine,0.309 7—1.083 9 μg ( $r=0.999\ 8$ ) for coptisine,0.111 2—0.389 2 μg ( $r=0.999\ 8$ ) for jatrorrhizine and 0.162 2—0.567 7 μg ( $r=0.999\ 6$ ) for epiberberine. The recoveries were 98.69%,98.66%,98.67%,98.67% and 98.67%, respectively. **Conclusion** The method possesses high feasibility,strong specificity,high accuracy and good reproducibility, which can be used for the quality control of Erhuang Xiaoyan tablets.

**[Key words]** chromatography,high pressure liquid;Erhuang Xiaoyan tablets;bererine;epiberberine;coptisine;jateorrhizine;palmatine;content determination

黄连为毛茛科植物黄连、三角叶黄连和云连的干燥根茎,黄柏为芸香科植物黄皮树或黄檗的干燥树皮。黄连、黄柏不仅在中国传统中医治疗中具有很高的药用价值,而且在国际中医药市场上占据重要地位,含有黄连、黄柏成分的药物也不断被研制。二黄消炎片是佛山市禅城区朝阳医院药剂科研发的中药片剂,由黄连、黄柏、白花蛇舌草、蒲公英、白术、丹参、炙甘草七味药组成,具有清热燥湿、健脾和胃的功效,

临床上用于慢性胃炎的治疗。方中黄连、黄柏苦寒清热燥湿<sup>[1]</sup>,现代药理研究表明,黄连、黄柏具有抗幽门螺杆菌、治疗慢性胃炎的作用,是该方的主要药物<sup>[2-4]</sup>。但是,由于该制剂含七味中药,且每种中药所含成分众多,干扰大,目前对其质量标准的相关研究暂无文献报道。研究显示,黄连、黄柏的药理活性主要与其所含的多种季胺型异喹啉类生物碱有关<sup>[5-6]</sup>,包括小檗碱、黄连碱、表小檗碱、巴马汀、药根碱等,其

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81503202)。 作者简介:谭燕萍(1980—),副主任中药师,硕士,主要从事中药药学及临床研究。  
△ 通信作者,E-mail:suziren@126.com。

中以小檗碱的含量最高。因此,本研究拟建立同一色谱条件下分离测定二黄消炎片中小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱这 5 种异喹啉类生物碱的方法,并进行方法学的考察<sup>[7-15]</sup>,为二黄消炎片的质量控制提供定量指标依据,从而保证该制剂的质量。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器** 岛津 LC solution-20A 高效液相色谱仪;舒美 KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,效率:40 kHz,功率:500 W);SHIMADZU AU120 万分之一天平(广州湘仪机电设备有限公司);Sartorius BP211D 十万分之一天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

**1.2 试剂与试药** 小檗碱对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号为 110713-200910;巴马汀,黄连碱及表小檗碱对照品均由成都纯化标准生物公司提供,批号分别为 140910、140305、150106;药根碱由成都普菲德生物公司提供,批号为 140507;二黄消炎片(批号 20161102、20161104、20161106、20161108、20161110、20161112)由佛山市禅城区朝阳医院提供;乙腈为色谱纯试剂(Honey-well 公司)、水为超纯水、其他试剂均为分析纯。

## 1.3 方法

**1.3.1 色谱条件** YMC-Pack ODS-AM 色谱柱(4.6 mm×250.0 mm,5 μm);以 0.1%(v/v)甲酸水溶液(A)-乙腈(B)流动相梯度洗脱[0~20 min (20% B),20~25 min (20%~30% B),25~40 min (30%~33% B),40~45 min (33%~20% B)];流速为 0.4 mL/min;进样量为 10 μL;检测波长为 345 nm;柱温为 27℃。理论板数按小檗碱峰计算应不低于 4 000。

### 1.3.2 溶液的配制

**1.3.2.1 对照品溶液制备** 分别取小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱,精密称定,加甲醇溶解,制成每毫升含与供试品溶液质量浓度相当的对照品混合溶液(小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的质量浓度分别为 0.381 6、0.100 8、0.077 4、0.027 8、0.040 6 mg/mL),用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**1.3.2.2 供试品溶液制备** 取质量差异下的二黄消炎片数片,除去薄膜衣,研磨,取细粉约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称质量,超声处理 30 min (功率:500 W,频率:40 kHz),放冷,密塞,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**1.3.2.3 阴性样品溶液制备** 按二黄消炎片的制备工艺制得不含黄连的阴性样品,按“1.3.2.2”方法制得阴性样品溶液。

### 1.3.3 方法学考察

**1.3.3.1 专属性考察** 分别取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL,在“1.3.1”项色谱条件下进行测定,记录色谱图。

**1.3.3.2 线性关系考察** 精密吸取“1.3.2.1”项制备的对照品溶液 4、6、8、10、12、14 μL,注入高效液相色谱仪,按“1.3.1”项色谱条件测得峰面积,并以峰面积(Y)与进样量(X)绘制标准曲线并进行线性回归。

**1.3.3.3 精密度试验** 精密吸取“1.3.2.1”制备的小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱对照品混合溶液 10 μL,按“1.3.1”项色谱条件重复进样 6 次,测定峰面积并计算其相对标准偏差(RSD)值。

**1.3.3.4 重复性试验** 取同一批号的二黄消炎片(批号:20161102),按“1.3.2.2”方法平行制备 6 份供试品溶液,按“1.3.1”项色谱条件测定各成分的质量分数并计算其 RSD 值。

**1.3.3.5 稳定性试验** 取同一份供试品溶液(批号:20161102),在相同的条件下分别于 0、2、4、8、12 h 进样测定,记录各化合物的峰面积并计算其 RSD 值。

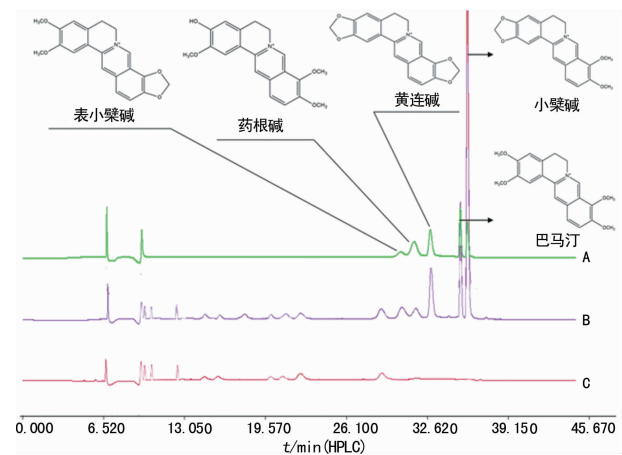
**1.3.3.6 加样回收率试验** 取同一批号(批号:20161102)已知质量分数的二黄消炎片约 0.25 g,精密称定,共 6 份,精密加入“1.3.2.1”标准品混合溶液 12.5 mL,挥干,按“1.3.2.2”方法制备供试品溶液,并根据“1.3.1”项色谱条件进行测定,计算回收率及其 RSD 值。

**1.3.3.7 样品测定** 取 6 个不同批次的二黄消炎片,按“1.3.2.2”方法制备供试品溶液,并根据“1.3.1”项色谱条件对 6 批样品进行含量测定,计算其 RSD 值。

## 2 结果

**2.1 专属性考察** 小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱峰型基本对称,各色谱峰之间均较好分离,出峰时间分别为 35.899、35.297、32.978、31.469 及 30.305 min。而阴性样品溶液在对照品相同的保留时间位置上未见色谱峰,说明二黄消炎片中其他成分对测定的成分无干扰,见图 1。

**2.2 线性关系考察** 以峰面积(Y)与进样量(X)绘制标准曲线并进行线性回归分析,得回归方程如下。小檗碱:  $Y = 238\ 831.536\ 4X + 578.640\ 0$ ,  $r = 0.999\ 9$ ,线性范围为 1.526 4~5.342 4 μg;巴马汀:  $Y = 306\ 532.029\ 5X - 61\ 887.000\ 0$ ,  $r = 0.999\ 6$ ,线性范围为 0.403 2~1.411 2 μg;黄连碱:  $Y = 229\ 732.627\ 2X + 1\ 264.400\ 0$ ,  $r = 0.999\ 8$ ,线性范围为 0.309 7~1.083 9 μg;药根碱:  $Y = 300\ 527.749\ 2X + 479.460\ 0$ ,  $r = 0.999\ 8$ ,线性范围为 0.111 2~0.389 2 μg;表小檗碱:  $Y = 214\ 131.407\ 4X - 619.260\ 0$ ,  $r = 0.999\ 6$ ,线性范围为 0.162 2~0.567 7 μg。结果表明小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱分别在 1.526 4~5.342 4 μg, 0.403 2~1.411 2 μg, 0.309 7~1.083 9 μg, 0.111 2~0.389 2 μg, 0.162 2~0.567 7 μg 的范围内与峰面积线性关系良好。



A:对照品溶液;B:供试品溶液;C:阴性样品溶液

图 1 对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液的 HPLC 图谱

**2.3 精密度试验** 精密度试验结果表明小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的平均峰面积分别为 951 214. 17(RSD 为 1. 1%),249 328. 33(RSD 为 1. 9%)、183 544. 17(RSD 为 1. 1%)、85 685. 17(RSD 为 1. 6%)、88 861. 17(RSD 为 1. 7%),表明该仪器精密度良好。

**2.4 重复性试验** 重复性试验测得同一批号的二黄

消炎片中小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的平均质量分数分别为 19. 970 0 mg/g(RSD 为 1. 1%)、5. 060 0 mg/g(RSD 为 1. 1%)、3. 930 0 mg/g(RSD 为 1. 5%)、1. 400 0 mg/g(RSD 为 1. 5%)、2. 050 0 mg/g(RSD 为 1. 9%),表明该方法的重复性良好。

**2.5 稳定性试验** 结果测得小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的平均峰面积分别为 961 432. 60(RSD 为 1. 5%)、249 370. 40(RSD 为 2. 0%)、179 799. 20(RSD 为 0. 9%)、83 966. 20(RSD 为 1. 7%)、85 918. 00(RSD 为 1. 9%),表明该供试品溶液在 12 h 内能够保持稳定。

**2.6 加样回收率试验** 小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的平均回收率分别为 98. 69%(RSD 为 1. 1%)、98. 66%(RSD 为 1. 1%)、98. 67%(RSD 为 1. 1%)、98. 67%(RSD 为 1. 1%)、98. 67%(RSD 为 1. 1%),见表 1。

**2.7 样品测定** 取 6 个不同批次的二黄消炎片,按“1. 3. 2. 2”方法制备供试品溶液,按“1. 3. 1”项色谱条件对 6 批样品进行测定,结果见表 2。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

成分	样品原有量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
小檗碱	5. 014 1	4. 770 0	9. 560 0	97. 71	98. 69	1. 1
	4. 994 1	4. 770 0	9. 560 0	97. 95		
	4. 990 1	4. 770 0	9. 820 0	100. 59		
	4. 998 1	4. 770 0	9. 590 0	98. 14		
	4. 984 1	4. 770 0	9. 650 0	98. 92		
	4. 982 1	4. 770 0	9. 640 0	98. 83		
巴马汀	1. 270 7	1. 260 0	2. 470 0	97. 66	98. 66	1. 1
	1. 265 6	1. 260 0	2. 470 0	97. 90		
	1. 264 6	1. 260 0	2. 540 0	100. 60		
	1. 266 7	1. 260 0	2. 480 0	98. 10		
	1. 263 1	1. 260 0	2. 500 0	98. 90		
	1. 262 6	1. 260 0	2. 490 0	98. 80		
黄连碱	0. 986 6	0. 970 0	1. 910 0	97. 67	98. 67	1. 1
	0. 982 6	0. 970 0	1. 910 0	97. 92		
	0. 981 8	0. 970 0	1. 960 0	100. 60		
	0. 983 4	0. 970 0	1. 920 0	98. 12		
	0. 980 7	0. 970 0	1. 930 0	98. 91		
	0. 980 3	0. 970 0	1. 920 0	98. 81		
药根碱	0. 352 3	0. 350 0	0. 680 0	97. 67	98. 67	1. 1
	0. 350 9	0. 350 0	0. 680 0	97. 91		
	0. 350 6	0. 350 0	0. 700 0	100. 60		
	0. 351 2	0. 350 0	0. 690 0	98. 11		
	0. 350 2	0. 350 0	0. 690 0	98. 91		
	0. 350 0	0. 350 0	0. 690 0	98. 80		
表小檗碱	0. 514 7	0. 510 0	1. 000 0	97. 67	98. 67	1. 1
	0. 512 6	0. 510 0	1. 000 0	97. 91		
	0. 512 2	0. 510 0	1. 030 0	100. 60		
	0. 513 0	0. 510 0	1. 000 0	98. 11		
	0. 511 6	0. 510 0	1. 010 0	98. 91		
	0. 511 4	0. 510 0	1. 010 0	98. 80		

表 2 样品含量测定结果(n=6)

批号	二黄消炎片 取样量(g)	小檗碱 (mg)	巴马汀 (mg)	黄连碱 (mg)	药根碱 (mg)	表小檗碱 (mg)	RSD(%)	(mg)	RSD(%)
20161102	0.501 4	9.920 0	2.570 0	1.990 0	0.710 0	1.020 0	16.200 0	16.210 0	0.5
	0.500 7	9.920 0	2.500 0	2.000 0	0.720 0	1.010 0	16.150 0		
	0.501 1	10.070 0	2.500 0	1.990 0	0.700 0	1.010 0	16.280 0		
20161104	0.500 0	10.100 0	2.550 0	1.940 0	0.690 0	1.040 0	16.330 0	16.230 0	0.6
	0.500 9	9.900 0	2.550 0	1.970 0	0.710 0	1.040 0	16.160 0		
	0.500 4	10.000 0	2.500 0	1.990 0	0.710 0	1.010 0	16.210 0		
20161106	0.500 0	9.990 0	2.530 0	1.930 0	0.690 0	1.030 0	16.180 0	16.180 0	0.1
	0.501 1	9.930 0	2.540 0	1.980 0	0.710 0	1.020 0	16.180 0		
	0.500 3	9.990 0	2.530 0	1.960 0	0.700 0	1.000 0	16.190 0		
20161108	0.500 5	10.040 0	2.530 0	1.960 0	0.700 0	1.020 0	16.260 0	16.300 0	0.3
	0.500 0	10.080 0	2.510 0	1.980 0	0.700 0	1.030 0	16.300 0		
	0.500 6	10.090 0	2.560 0	1.970 0	0.710 0	1.020 0	16.340 0		
20161110	0.500 9	10.030 0	2.560 0	1.980 0	0.710 0	1.030 0	16.310 0	16.240 0	0.4
	0.501 0	9.980 0	2.560 0	1.960 0	0.710 0	1.030 0	16.230 0		
	0.500 8	9.950 0	2.530 0	1.970 0	0.700 0	1.030 0	16.180 0		
20161112	0.500 2	9.890 0	2.540 0	1.980 0	0.700 0	1.020 0	16.130 0	16.210 0	0.6
	0.500 7	9.970 0	2.530 0	1.960 0	0.710 0	1.030 0	16.200 0		
	0.500 1	10.060 0	2.540 0	1.970 0	0.700 0	1.030 0	16.290 0		

3 讨 论

3.1 提取溶剂的选择 由 2015 版《中华人民共和国药典》<sup>[1]</sup>得知提取黄连中生物碱的溶剂为用甲醇-盐酸(100 : 1),故本研究选用甲醇、不同配比甲醇-盐酸溶液作为提取溶剂比较提取的效果,发现甲醇及甲醇-盐酸溶液的提取效果相差不大,因此本研究从提取方法的简便性考虑,选择甲醇作为提取溶剂。

3.2 超声时间的选择 考虑到制剂检验时的简便性及 2015 版《中华人民共和国药典》<sup>[1]</sup>中检测方法的记载,本研究采用超声(功率 500 W,频率 40 kHz)提取方法进行试验,对提取时间进行考察(10、20、30、40、50、60 min),结果显示随着超声时间增加提取效率逐渐提高,但 30 min 以后提取结果相差不大,因此本研究提取样品的超声时间为 30 min。

3.3 波长的选择 分别取小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱对照品溶液在 200~400 nm 波长内进行紫外扫描比较。扫描显示物种异喹啉类生物碱在 345 nm 波长处均有较大吸收,因此选择 345 nm 的波长作为测定这 5 种成分的吸收波长。

3.4 流动相的选择 本研究中流动相体系是在查阅文献<sup>[8-10]</sup>及试验基础上建立的,可对二黄消炎片中 5 种异喹啉类生物碱进行同时测定,分离度均大于 1.5,以小檗碱计理论塔板数大于 5 000。

本研究所建立的同时测定二黄消炎片中小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱及表小檗碱的含量测定方法可行性高,专属性强,准确性高,重现性好,可作为该制剂质量的控制标准之一。

参考文献

[1] 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,2015.

[2] 吴静,王克霞,胡联华. 黄连对幽门螺杆菌的体外抗菌活性研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(12):2486-2487.

[3] 姚希贤,王丙信. 对幽门螺杆菌有效中西药物筛选的实验研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,1995,4(4):267-270.

[4] 宋江林,程督剑,罗敏. 黄连为主治疗慢性胃炎 59 例[J]. 湖南中医杂志,2003,30(4):32.

[5] 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.

[6] 李小玲. 黄连及其有效组分小檗碱的生物活性研究[D]. 武汉:湖北师范学院,2013.

[7] 陈剑平,李一圣,卢小凤,等. 反相高效液相色谱法同时测定黄术健胃片中野黄芩苷、盐酸小檗碱及丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(11):2157-2159.

[8] 侯建忠,喻利坚,杨铨. HPLC 测定舒通安泰胶囊中小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(7):61-63.

[9] 张华,刘敏,李忠东. HPLC 法测定芩连平胃汤中小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(12):56-57.

[10] 胡远艳,田建平. 清胃黄连片中盐酸小檗碱、药根碱、巴马汀的含量测定[J]. 广州化工,2012,40(16):122-124.

[11] 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.

[12] 赖先荣,周邦华,杜明胜,等. 6 种黄连饮片中 6 种生物碱的 RP-HPLC 含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析[J]. 中国中药杂志,2016,41(24):4579-4586.

[13] 荆婧,李明玉,陈桂荣,等. HPLC 法测定黄连解毒汤及其有效组分群中 5 种化学成分含量[J]. 亚太传统医药,2016,12(9):20-23.

[14] 袁学刚,王战国,胡慧玲,等. HPLC 测定连翘甙溶液中表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J]. 中药与临床,2016,7(1):31-33.

[15] 阳勇,罗维早,孙建彬,等. HPLC 法测定黄连药材及其炮制品中六种生物碱的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2015,17(3):596-602.