

# 高效液相色谱法测定白头翁散中盐酸小檗碱的含量

刘建华, 潘玉善, 陈玉霞, 张素梅, 莫娟

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

[收稿日期] 2009 - 02 - 22 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2010) 01 - 0043 - 03 [中图分类号] TQ460.72

**[摘要]** 建立中兽药散剂白头翁散中盐酸小檗碱的含量测定方法, 为其质量标准的制订提供实验依据。采用 HPLC 法测定, 色谱条件, Eclipse XDB - C<sub>18</sub> 柱 (5 μm, 4.6 mm × 150 mm); 流速, 1.0 mL/min; 流动相, 乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾 = 28 : 72; 柱温, 30 °C; 检测波长, 348 nm。盐酸小檗碱在进样量为 0.05 ~ 0.50 μg 之间范围内呈良好的线性关系,  $r = 0.9999$ ; 样品中盐酸小檗碱的平均含量为 0.781%, RSD 为 0.86%。该方法简便, 易行, 专属性强, 可以作为白头翁散中盐酸小檗碱的含量测定方法。

**[关键词]** 白头翁散; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法; 含量测定

## Determination of the Content of Berberine Hydrochloride in Baitouweng Powder by HPLC

LIU Jian - hua, PAN Yu - shan, CHEN Yu - xia, ZHANG Su - mei, MO Juan

(Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; China)

**Abstract:** To determine the content of berberine hydrochloride in Baitouweng powder and to provide evidence for its quality criteria, A HPLC method was established as follows: eclipse XDB - C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); acetonitrile, 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 28 : 72 as mobile phase, flow rate at 1.0 mL/min and detection wavelength was at 348 nm. The calibration curve of berberine hydrochloride was linear in the range of 0.05 ~ 0.50 μg with the correlation coefficient of 0.9999. The average content of berberine hydrochloride in Baitouweng powder was 0.781%, and RSD = 0.86%. This method is simple, accurate and repeatable, and can be used for the quality of Baitouweng powder

**Key words:** Baitouweng powder; berberine hydrochloride; HPLC; content determination

白头翁散由黄连、黄柏、白头翁、秦皮组成, 具有清热解毒, 凉血止痢的功效, 适用于畜禽大肠杆菌、绿脓杆菌、球虫、伤寒等引起的水样拉稀, 黄白赤痢以及多种顽固性肠炎和湿性泄泻, 为 2005 年版《中华人民共和国兽药典》收载品种。但该标准项下只规定了其中纤维束的显微鉴定方法, 黄连对照药材、秦皮对照药材、盐酸小檗碱的定性鉴别方

法, 而没有对其中的有效成分进行定量, 致使该制剂在使用的过程中存在诸多问题, 比如: 黄连药材添加量不足, 药材以次充好等问题。为了使该制剂更好地服务于兽医临床, 参考相关文献<sup>[1-3]</sup>, 本研究采用高效液相色谱法, 以盐酸小檗碱为指标, 对方中该成分建立专属性测定方法, 并规定了含量下限, 从而为白头翁散的质量标准的制订提供实验

作者简介: 刘建华 (1977 年 - ), 女, 河南浚县人, 在读博士, 讲师, 从事中兽药质量控制的教学和科研工作。E - mail: ljhdny@126.com

依据。

### 1 仪器与材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪, Agilent 1100; 色谱柱, eclipse XDB - C<sub>18</sub>柱 (5 μm, 4.6 mm ×150 mm); 紫外检测仪; 色谱工作站, Agilent - 1100; 电子天平, 型号 1702, 称量范围 200 g, 感量 0.1 mg, 德国 Sartorius公司; 数显恒温水浴锅, HH - 4, 国华电器有限公司。

1.2 材料 盐酸小檗碱对照品, 批号 110713 - 200208, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所; 白头翁散由本试验室自制, 方中药物黄连、黄柏、白头翁、秦皮购自郑州市南阳路国药本草大药房; 甲醇, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法

2.1 白头翁散的制备 按《中华人民共和国兽药典 (2005版)》白头翁散项下的比例, 分别称取黄连、黄柏、白头翁、秦皮, 粉碎, 混匀, 即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 5.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得每 100 μg/mL 的含盐酸小檗碱溶液, 精密吸取上述溶液 1 mL, 定容至 10 mL 的量瓶中, 定容至刻度, 即得浓度 10 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取 2.1 项下白头翁散 1.001 g, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 水浴回流提取 3 次, 以盐酸 甲醇 (1 : 100) 为溶剂, 溶剂用量分别为 20、15、15 mL, 时间分别为 1、0.5、0.5 h, 将 3 次滤液合并, 定容至 100 mL 容量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得供试品溶液。

2.4 阴性对照液的制备 取不含黄连、黄柏的其余药材, 按处方的比例混合, 粉碎, 精密称取该混合物 1.029 g, 按 2.3 项下方法制成阴性对照液。

2.5 测定 分别精密吸取上述各溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

### 3 结果

3.1 色谱条件与系统适用性试验结果 色谱柱, Eclipse XDB - C<sub>18</sub>柱 (5 μm, 4.6 mm ×150 mm); 流动相, 乙腈 0.05 mol/L 磷酸二氢钾 = 28 : 72; 检测波长, λ = 348 nm; 流速, 1.0 mL/min; 柱温, 30 °C; 进样量, 10 μL, 在此条件下, 盐酸小檗碱色谱峰出峰时间约为 6.6 min, 理论板数按盐酸小檗碱峰计为 6214, 分离度为 4.7, 色谱峰如图 1 所示。

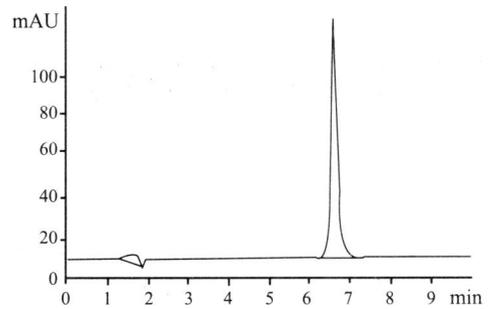


图 1 盐酸小檗碱对照品 (T = 6.609 min)

3.2 色谱分离及阴性对照试验 取供试品溶液、阴性对照液分别进样, 色谱图如下 (图 2、3), 不难看出, 供试品溶液中, 在与对照品色谱相同的保留时间, 有共同的色谱峰, 阴性对照液在此保留时间不出峰, 表明阴性无干扰。

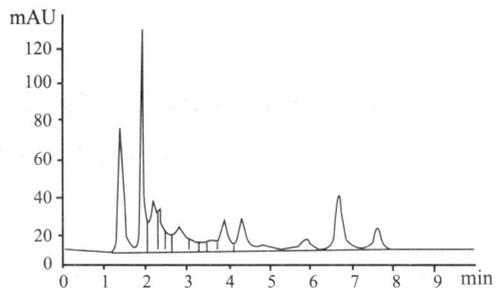


图 2 供试品液 (T = 6.683 min)

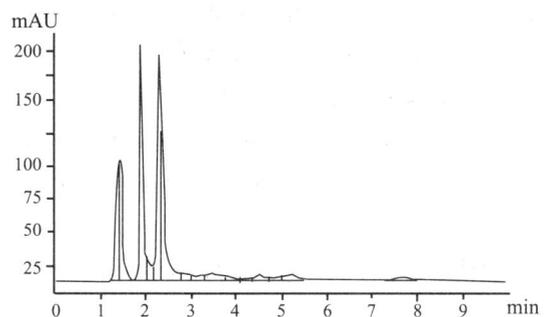


图 3 阴性对照液 (无干扰)

3.3 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下对照品溶液 (100 μg/mL) 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别进样 10 μL 进行测定, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 得回归方程为:  $Y = 15.686X - 0.638$ ,  $r = 0.9999$ , 表明盐酸小檗碱进样量在 0.05 ~ 0.50 μg 范围内有良好的线性关系。

3.4 稳定性考察 对同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 分别测定, 共测定 7 次, 结果 RSD

为 0.78%, 表明稳定性良好。

3.5 精密度试验 对同一供试品溶液, 连续测定 5 次, 结果其峰面积值的 *RSD* 为 0.42%, 表明精密度良好。

3.6 重复性试验 对同一批样品, 分别取 6 份, 按供试品溶液制备项下的方法提取, 依法测定, 结果含量平均为 0.780%, *RSD* 为 0.87%。

3.7 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的白头翁散样品 (已采用 3.7 项下方法测定含量), 精密称定, 精密加入对照品适量, 按供试品溶液制备项下方法制备供试样, 并按样品含量测定项下测定含量。结果见表 1, 平均回收率为 99.68%, *RSD* 为 0.62%, 符合要求。

表 1 盐酸小檗碱的回收率试验

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测结果 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	<i>RSD</i> /%
1	0.309	0.20	0.502	98.6		
2	0.314	0.20	0.515	100.2		
3	0.311	0.20	0.510	99.8	99.68	0.62
4	0.312	0.20	0.508	99.2		
5	0.307	0.20	0.510	100.6		

3.8 样品含量测定 精密吸取对照品溶液、供试品溶液 (共测定 5 批样品) 各 10  $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 依法测定, 结果见表 2。

## 4 讨论

4.1 据报道<sup>[4]</sup>, 用 HPLC 法测定盐酸小檗碱的检测波长为 229, 265, 348, 424 nm, 峰积分为 1.01 1.093 0.2, 其中可见光区专属性强, 阴性成分干扰少, 但灵敏度低; 紫外光区 3 个波长下灵敏度均较高, 但阴性对照在 348 nm 干扰最小, 故选用

348 nm 作为检测波长。

表 2 盐酸小檗碱含量测定结果

批号	含量 /%	平均值 /%	<i>RSD</i> /%
1	0.769		
2	0.786		
3	0.790	0.781	0.86
4	0.784		
5	0.775		

4.2 方中四种药物的比例为黄连 黄柏 白头翁 秦皮 = 30 45 60 60, 2005 版药典规定, 黄连中盐酸小檗碱的含量不能低于 3.6%, 黄柏的盐酸小檗碱不能低于 0.6%, 依药材比率计算本品中盐酸小檗碱的含量应不低于 0.69%, 本试验测得自制白头翁散中盐酸小檗碱的含量平均值为 0.781%, 说明本试验所建立的方法可以作为白头翁散的定量方法。

4.3 鉴于中药来源的广泛性和在实际生产中有效成分的损失, 认为含量下限应该不低于依药典规定所计算比率的 85%, 即应不低于 0.59%, 否则应判为不合格。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000: 99, 213 - 214.
- [2] 曹臣, 袁梦石, 黄开颜. HPLC 法测定抗感染片中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中医药导报, 2006, 12 (5): 72 - 73.
- [3] 李彦冰, 张强, 朱志珍, 等. 焦虑泰康饮中盐酸小檗碱的含量测定 [J]. 中医药学报, 2006, 34 (2): 15 - 16.
- [4] 罗懿妮, 赖宇红, 薛巧如, 等. 盐酸小檗碱 RP - HPLC 测定条件的比较 [J]. 中药材, 2004, 27 (9): 647 - 649.

(上接第 33 页)

用比较持久, 一次给药后, 其促渗作用可维持 35 h 以上<sup>[7]</sup>。据此可推测重复用药时, 药物可以较快进入犬的体内, 其结果将使时滞减短或消失, 分布半衰期下降, 达峰时间提前等, 而出现类似于肌注给药的药代特性。

## 参考文献:

- [1] 胡春容. 拟除虫菊酯农药的毒性研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19 (3): 239 - 241.
- [2] 夏世钧. 农药毒理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 317.
- [3] 朱永和, 王振荣, 李布青. 农药大典 [M]. 北京: 中国三峡出版

社农业科教出版中心, 2006: 204.

- [4] I Yamane, S Arai, Y Nakamura, et al. A Clinical Trial to Evaluate the Effects of Flumethrin or Ivermectin Treatment on Hemoparasites, Gastrointestinal Parasites, Conception and Daily Weight Gain in a Dairy farm in Japan [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2000, 43: 203 - 210.
- [5] O M E El - Azazy, Amel Tick (Acari: Ixodidae) Control with Pour - on, Application of Flumethrin [J]. Veterinary Parasitology, 1996, 67: 281 - 284.
- [6] 黄一帆, 俞道进, 姚金水. 洛美沙星透皮吸收搽剂在猪体内的药物动力学特征 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2003, 32 (2): 217 - 220.
- [7] Santus G C. Transdermal Enhancer Patent Literature [J]. Controlled Release, 1993, 83 (25): 1.