

肠炎清合剂的质量控制方法研究^{*}温金莲¹, 唐睿¹, 周清¹, 甘伟发¹, 黄晓文¹, 董宇静¹, 梁基智^{2**}

(1. 广东药学院药科学院, 广州 510006; 2. 广州市中医医院, 广州 510130)

摘要 目的: 建立肠炎清合剂中君药黄连的鉴别及盐酸小檗碱、盐酸巴马汀含量测定方法。方法: 采用薄层色谱法对合剂中黄连进行定性鉴别; 采用 HPLC 进行含量测定。结果: 薄层色谱均能明显的检出黄连的特征有效成分盐酸小檗碱和盐酸巴马汀; HPLC 法中, 盐酸小檗碱在 $1.34 \sim 42.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率 99.3%, $\text{RSD}=0.92\%$ ($n=9$); 盐酸巴马汀在 $1.24 \sim 39.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率 98.6%, $\text{RSD}=0.82\%$ ($n=9$)。结论: 本法简便、快速、灵敏、准确、重现性好, 可以作为该合剂的质量控制方法。

关键词: 肠炎清合剂; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)07-1397-05

Study on the quality control of Changyanqing mixture

WEN Jin-lian¹, TANG Rui¹, ZHOU Qing¹, GAN Wei-fa¹, HUANG Xiao-wen¹,
DONG Yu-jing¹, LIANG Ji-zhi^{2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China)

Abstract Objective: To establish a method for identification of *Rhizoma Coptidis* in Changyanqing mixture by thin-layer chromatography (TLC) and determination of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods:** Identification of palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride as the effective constituent of *Rhizoma Coptidis* in preparation by TLC and determination these two components by RP-HPLC. **Results:** Both characteristics of the active ingredient of *Rhizoma Coptidis* could be identified by TLC. The linear range of berberine hydrochloride was within $1.34 \sim 42.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$), the mean recovery was 99.3% with $\text{RSD}=0.92\%$ ($n=9$). The linear range of palmatine hydrochloride was within $1.24 \sim 39.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$), the mean recovery was 98.6% with $\text{RSD}=0.82\%$ ($n=9$). **Conclusion:** The method is simple, rapid, sensitive and accurate with good repeatability, it can be used as the quality control method for Changyanqing mixture.

Key words: Changyanqing mixture; berberine hydrochloride; palmatine hydrochloride; TLC; HPLC

肠炎清合剂是广州市中医医院研制的纯中药院内制剂, 为广东省科技九五重点攻关项目, 临床使用十余年, 主治溃疡性结肠炎、泄泻、慢性结肠炎, 疗效明确, 近年开始用于结肠癌的辅助治疗, 取得了良好的效果。合剂由黄连、黄芪、延胡索等中药组成, 具有益气清热、理气止痛、收敛生肌等功效。方中君药黄连具有清热、燥湿、泻火、解毒的作用, 盐酸小檗碱和盐酸巴马汀为黄连主要有效成分, 目前已有薄层扫描^[1,2]、反相高效液相色谱或反相离子对色

谱^[3-6]、毛细管电泳^[7]等多类方法测定这两种生物碱的报道。考虑到该合剂目前尚无质量控制标准, 为了进一步提高合剂质量、保证疗效, 本实验选用操作简便、仪器较为常见、方法通用性强的 TLC 和 RP-HPLC 方法分别定性鉴别合剂中的黄连, 定量测定盐酸小檗碱和盐酸巴马汀, 结果表明所建立的方法简单、快速、灵敏、准确, 可以作为合剂中黄连的质量控制标准, 同时也为后继对该合剂进行的谱学研究奠定基础。

* 广东省科技计划项目(2009198)和国家自然科学基金项目(81073045)

** 通讯作者 Tel: (020) 39352135, 18928842938, Email: jinlianwen@126.com。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪由 SCL-10Avp 控制器、LC-10ATvp 泵、SPD-10Avp 紫外检测器、CTO-10ASvp 柱箱、LC Solution 色谱工作站组成(均为 SHIMADZU), AUW120D 电子天平(SHIMADZU), WD-P403 B 型三用紫外分析仪(北京市六一仪器厂), 定量毛细管(5 μ L), 层析缸。

肠炎清合剂(批号: 20091127、20091210、20091223)、黄连阴性合剂, 广州市中医医院; 盐酸巴马汀对照品(批号: 110732-200907)、盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-200208)、黄连对照药材(批号: 120913-200407), 中国药品生物制品检定所; 薄层层析硅胶 G(分析纯, 青岛海洋化工厂); 甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯), Merck; 水为二次蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 肠炎清合剂中黄连的薄层鉴别

2.1.1 供试品溶液制备 取合剂上清液 20 mL 于分液漏斗中, 以浓氨水调 pH 至 10, 加正丁醇 20 mL, 振摇 10 min, 静置分层后取出正丁醇相, 剩余水相再以正丁醇萃取 2 次, 每次 20 mL。合并正丁醇萃取液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 2 mL 容量瓶定容。

2.1.2 对照品溶液制备 取适量盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品, 以甲醇溶解定容, 制成 1 mL 各含 0.5 μ g 的溶液。

2.1.3 黄连对照药材溶液制备 取黄连对照药材 5 g 于具塞锥形瓶中, 加正丁醇 20 mL, 以浓氨水调 pH 至 10, 密塞, 振摇 10 min, 放置过夜, 滤过后水浴蒸干正丁醇提取液, 残渣加甲醇溶解, 转移至 2 mL 量瓶定容。

2.1.4 黄连阴性对照溶液制备 取缺黄连的合剂上清液 20 mL, 按“2.1.1”项下操作制得阴性对照溶液。

2.1.5 肠炎清合剂中黄连的薄层色谱鉴定 定量毛细管吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于 1% NaOH 0.4% CNC-Na 硅胶 G 板上, 以苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-浓氨水(6:3:1.5:1.5:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(365 nm)下检视。

3 个批号供试品色谱中在与盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品及黄连对照药材色谱相应的位置上, 均显现相同的黄绿色荧光斑点。阴性对照无干扰。见图 1。

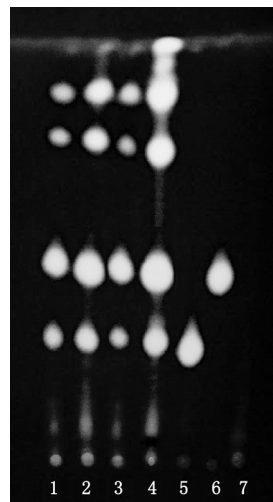


图1 黄连的 TLC

Fig 1 TLC of *Coptidis Rhizoma*

1~3. 供试品(samples) 4. 黄连对照药材(control medicines of *Coptidis Rhizoma*) 5. 盐酸巴马汀对照品(palmatine hydrochloride reference substance) 6. 盐酸小檗碱对照品(berberine hydrochloride reference substance) 7. 黄连阴性样品(negative sample)

2.2 盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的含量测定

2.2.1 溶液的制备

对照品溶液: 精密称取盐酸巴马汀对照品 12.43 mg、盐酸小檗碱对照品 10.70 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 纯甲醇溶解定容并摇匀, 制得盐酸巴马汀对照品储备液溶液浓度为 $0.4972 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 盐酸小檗碱对照品储备液溶液浓度为 $0.4280 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别精密移取 10 mL 盐酸巴马汀对照品溶液、12.5 mL 盐酸小檗碱对照品溶液混合, 以流动相稀释定容于 50 mL 量瓶中, 得到盐酸巴马汀和盐酸小檗碱浓度分别为 $99.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $107.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

供试品溶液: 精密吸取肠炎清合剂上清液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 以纯甲醇稀释至刻度, 摇匀后静置, 取上清液以 0.45 μm 过滤器滤过, 取续滤液为供试品溶液。

阴性溶液: 取黄连阴性合剂, 按“供试品溶液”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.2 色谱条件与系统适应性 色谱柱: Welch Materials XB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μm); 流动相: 90% 乙腈-0.2% 磷酸(30:70); 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 紫外检测波长: 345 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

在上述色谱条件下分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液进样分析, 结果表明理论塔板

数按盐酸巴马汀计算应不低于 12000,按盐酸小檗碱计算应不低于 13000。供试品溶液中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰形对称性好且分离良好,与相邻色谱峰的分度度均大于 1.5。缺黄连的阴性对照溶液在盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品出峰的时间范围内未见任何杂质。对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液色谱图见图 2。

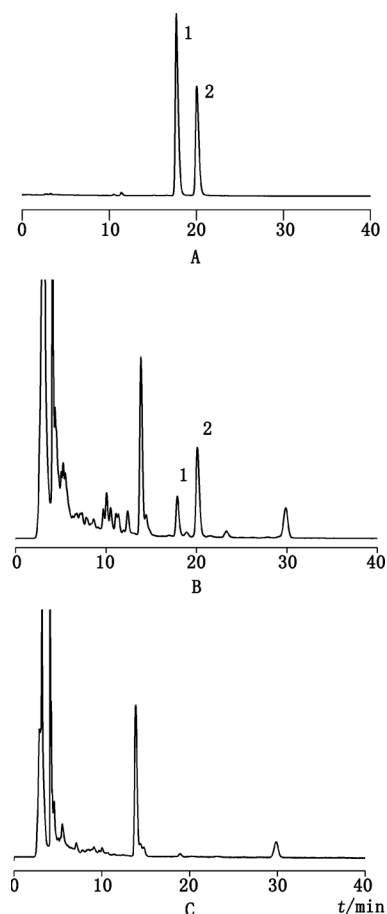


图 2 对照品(A)、样品(B)和缺黄连的阴性对照溶液(C)高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample(B) and negative sample(C)

1. 盐酸巴马汀(palmatine hydrochloride) 2. 盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取混合储备液 0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 10.0, 20.0 mL, 用流动相稀释定容至 50 mL 量瓶, 制成系列浓度的溶液。按“2.2.2”项下色谱条件进行测定, 以色谱峰面积 A 为纵坐标, 质量浓度 C 为横坐标拟合标准曲线, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的回归方程分别为:

$$A = 66603C + 7418 \quad r = 0.9999$$

$$A = 44706C + 3642 \quad r = 0.9999$$

结果盐酸巴马汀浓度在 $1.24 \sim 39.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 盐酸小檗碱浓度在 $1.34 \sim 42.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积具有良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验 取同一供试品溶液, 重复进样 6 次, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积 RSD 分别是 1.1% 和 1.4%。表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样 6 次, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积 RSD 分别为 1.6% 和 1.7%; 分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5 d 进样 5 次, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.6%, 表明供试品溶液在 5 d 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一批号肠炎清合剂(20091127), 按供试品溶液制作项下操作, 平行制备 6 份溶液, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量平均值分别为 $72.39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $270.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 1.3% 和 1.8%, 表明该方法重复性好。

2.2.7 加样回收率试验 精密吸取已测定含量的肠炎清合剂上清液(批号: 20091127) 共 3 组, 每组 3 份, 每份 0.50 mL, 3 组分别精密加入浓度为 89.50, 71.60, 57.28 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸巴马汀及浓度为 342.4, 273.9, 219.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸小檗碱混合对照品溶液 0.50 mL, 按供试品溶液制作项下操作, 配成低、中、高 3 种对照品加入的供试品溶液。进样测定, 计算盐酸巴马汀和盐酸小檗碱回收率, 结果见表 1。

2.2.8 方法定量限与检测限 样品溶液稀释至色谱峰信噪比为 10 时, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的检出浓度分别为 $0.201 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.330 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。样品溶液稀释至信噪比为 3 时, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的检测限分别为 $0.035 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.048 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。方法灵敏度较高。

2.2.9 耐用性试验 取批号为 20091127 的肠炎清合剂样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在不同流动相比比例、不同温度、不同仪器等不同条件下进行测定, 结果盐酸巴马汀平均含量为 $72.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.83%; 盐酸小檗碱平均含量为 $270.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.90%。表明耐用性良好, 见表 2。

2.2.10 样品含量测定 精密吸取肠炎清合剂样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下对 3 批样品中的盐酸巴马汀和盐酸小檗碱进行测定, 外标法计算含量, 结果见表 3。

表1 加样回收率试验结果(μg)

Tab 1 The recovery test results

No.	盐酸巴马汀(palmatine hydrochloride)						盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)					
	样品含量 (original)	加入量 (add)	检出量 (found)	回收率/% (recovery)	平均回收率/% (average Recovery)	RSD /%	样品含量 (original)	加入量 (add)	检出量 (found)	回收率/% (recovery)	平均回收率/% (average Recovery)	RSD /%
1	36.19	44.75	79.72	97.3			134.6	171.2	307.3	100.9		
2	36.19	44.75	80.27	98.5			134.6	171.2	305.3	99.7		
3	36.19	44.75	79.96	97.8			134.6	171.2	305.5	99.8		
4	36.19	35.80	71.74	99.3			134.6	137.0	271.6	100.0		
5	36.19	35.80	71.35	98.2	98.6	0.82	134.6	137.0	270.5	99.2	99.3	0.92
6	36.19	35.80	71.52	98.7			134.6	137.0	270.6	99.3		
7	36.19	28.64	64.63	99.3			134.6	109.6	241.8	97.8		
8	36.19	28.64	64.31	98.2			134.6	109.6	242.4	98.4		
9	36.19	28.64	64.77	99.8			134.6	109.6	243.1	99.0		

表2 耐用性试验结果

Tab 2 Results of value tests($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

实验(test)	盐酸小檗碱含量 (palmatine hydrochloride)	RSD/%	盐酸巴马汀含量 (berberine hydrochloride)	RSD/%
正文实验条件(text of the conditions)	269.1		72.38	
流动相(mobil phase) 25:75	272.4		72.23	
流速(flow rate)	268.2		73.34	
0.8 mL $\cdot$ min ⁻¹		0.90		0.83
柱温(column temperature) 25 $^{\circ}\text{C}$	272.9		73.01	
Phenomenex Luna C ₁₈ 250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μm	266.8		72.48	
Agilent 1200	270.7		71.65	

表3 肠炎清合剂中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量测定结果($n=6$)Tab 3 Determination results of samples $\bar{X} \pm S$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

批号(lot No.)	盐酸巴马汀(palmatine hydrochloride)	RSD/%	盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)	RSD/%
20091127	72.38 $\pm$ 1.15	1.6	269.1 $\pm$ 0.67	0.67
20091210	73.57 $\pm$ 0.34	0.46	272.2 $\pm$ 0.90	0.33
20091223	73.16 $\pm$ 0.52	0.71	271.1 $\pm$ 2.43	0.90

3 讨论

3.1 本合剂目前尚无质量控制标准。处方中的君药为黄连,其主要化学成分有小檗碱、巴马汀、黄连碱等^[8],研究表明盐酸小檗碱具有抗消化道溃疡、抗炎及免疫调节、抗肿瘤等作用^[9],巴马汀也表现出抗溃疡作用^[10],这两种生物碱均为黄连中的特征有效成分。为全面控制肠炎清合剂的质量,应对合剂中的黄连定性鉴别,也应测定并控制黄连的两种生物碱。实验结果表明,不同批次的肠炎清合剂中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀含量较为稳定。

3.2 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱 TLC 鉴别时斑点易

拖尾,且两者极性相近,不易分离。实验中曾尝试展开剂甲苯-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(2:3:4:2.5:2)^[11],但斑点拖尾严重,分离度低,实验结果不稳定,重现性差。本实验最终选择的展开剂苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-浓氨水(6:3:1.5:1.5:0.5),效果理想,组分 R_f 值合适,重现性好。

3.3 盐酸小檗碱和盐酸巴马汀均在 340 ~ 345 nm 之间有最大吸收^[3],对合剂的紫外可见光谱分析表明,其中大多数组分在 345 nm 波长处无吸收,因此 HPLC 定量测定时选择此波长能有效避免其他组分

的干扰。

3.4 试验中曾尝试乙腈-磷酸二氢钾水溶液^[4]以及乙腈-水(三乙胺调pH)^[5]等流动相体系,但色谱峰拖尾影响准确定量。通过实验最终选择了效果最好的乙腈-0.2%磷酸(30:70),流动相配制方便快捷,无盐类组分,且两待测组分保留时间适当、峰型好、分离度高,阴性无干扰。

3.5 肠炎清合剂中含多种中药,成分复杂,若通过萃取方法能有效地去除其他成分的干扰,但同时也将造成待测组分损失,并且处理麻烦耗时。本实验使用甲醇稀释样品制备供试品溶液,可避免所测组分因样品的前处理而损失,操作快捷方便,结果理想。

本实验对肠炎清合剂中君药黄连的特征有效成分盐酸巴马汀和盐酸小檗碱进行了定性鉴别和含量测定,结果表明鉴别方法简便快速,定量方法的供试品溶液制备简便,方法灵敏快速,结果重现性好,准确度高,可以作为合剂中黄连的质量标准控制方法。

参考文献

- 1 XIE Ji-zhen(谢纪珍), LIANG Rui-xue(梁瑞雪). Determination of berberine hydrochloride in Naotongling Granules by TLCs(薄层扫描法测定脑通灵颗粒中盐酸小檗碱的含量). *Qilu Pharm Aff*(齐鲁药事) 2008 27(7):407
- 2 CHEN Yu-hua(陈玉花). Quantitative determination of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride in Mongolia Medicine ShaRiGa-4 By TLCS(荧光扫描法同时测定蒙成药沙日嘎-4汤中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的含量). *Chin J Spectrosc Lab*(光谱实验室) 2006 23(6):1147
- 3 GAO Ye(高颢), WANG Dong-mei(王冬梅), LUAN Shuang(栾爽), *et al.* Determination of palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in traditional chinese patent medicine Qinlian tablets by HPLC(HPLC法同时测定芩连片中盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报) 2008 25(6):480
- 4 FAN Xiao-xia(樊晓霞), WAN Li-yan(万里燕), YUAN Li-ping(袁丽萍), *et al.* Determination of jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in compound Kushen lotion by HPLC(高效液相色谱法测定复方苦参洗剂中盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志) 2005 40(23):1820
- 5 CHEN Ri-lai(陈日来), LI Yu-zhen(李玉珍). Determination of palmatine and berberine in the Jinji capsules by HPLC(高效液相色谱法测定金鸡胶囊中巴马汀和小檗碱的含量). *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志) 2004 24(1):21
- 6 GUO Qing(郭青), WU Dan(吴丹), SUN Shan(孙姗). Determination of three kinds of alkaloids in *Yiqi Zhixue* granules by ion pair RP-HPLC method(反相离子对高效液相色谱法测定益气止血颗粒中3种生物碱成分). *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理) 2009 20(1):41
- 7 LI Jun-song(李俊松), LIU Xun-hong(刘训红), CAI Bao-chang(蔡宝昌), *et al.* Simultaneous determination of the five alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by Nonaqueous capillary electrophoresis(非水毛细管电泳测定黄连饮片中5种生物碱). *Chin J Chromatogr*(色谱) 2010 28(4):402
- 8 LI Cai-hong(李彩虹), Zhou Ke-yuan(周克元). Study advances on the effects and mechanisms of active constituents of *Coptidis rhizoma*(黄连活性成分的作用及机制研究进展). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2010 21(2):466
- 9 YANG Jing(杨菁), LIN Jing(林菁). Advance on study in anti-tumormechanism of berberine(Ber)(小檗碱抗肿瘤作用机制的研究进展). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2007 32(10):881
- 10 ZHANG Zhong-miao(张仲苗), GENG Bao-qin(耿宝琴), YONG Ding-guo(雍定国), *et al.* Effect of dl-tetrahydropalmatine on rat gastric ulcer(dl-四氢巴马汀抗大鼠胃溃疡作用). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志) 2005 40(12):902

(本文于2010年9月18日收到)