

## HPLC 法同时测定五味黄连丸中 3 种成分

热增才旦<sup>1,2</sup>, 刘 阳<sup>1</sup>, 元王涛<sup>2</sup>, 张娟玲<sup>2</sup>, 童 丽<sup>1\*</sup>

(1. 青海大学医学院药理学系, 青海 西宁 810001; 2. 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810001)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定藏药五味黄连丸(黄连、红花、诃子等)中盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱的含有量。方法 分析采用 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-磷酸(32:68, pH 3.2); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 346 nm。结果 盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱分别在 0.002 5 ~ 0.080 0、0.002 5 ~ 0.080 0、0.005 0 ~ 0.160 0 mg/mL 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率( $n = 6$ )分别为 98.84%、99.30%、98.22%, RSD 分别为 1.43%、0.93%、1.18%。结论 该方法简单、快速、准确, 可用于五味黄连丸的质量控制。

**关键词:** 五味黄连丸; 盐酸巴马汀; 药根碱; 盐酸小檗碱; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1513-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.016

## Simultaneous determination of three constituents in Wuwei Huanglian Pills by HPLC

Re-zeng-cai-dan<sup>1,2</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, YUAN Wang-tao<sup>2</sup>, ZHANG Juan-ling<sup>2</sup>, TONG Li<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China; 2. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810001, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish an HPLC method for simultaneously determining the contents of palmatine hydrochloride, jatrorrhizine and berberine hydrochloride in Tibet medicine Wuwei Huanglian Pills (*Coptidis Rhizoma*, *Carthami Flos*, *Chebulae Fructus*, etc.). **METHODS** The analysis was performed on an Agilent C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-phosphoric acid (32:68, pH 3.2), flow rate was 0.8 mL/min, column temperature was maintained at 25 °C, and detection wavelength was set at 346 nm. **RESULTS** Palmatine hydrochloride, jatrorrhizine and berberine hydrochloride displayed good linear relationships within the ranges of 0.002 5 - 0.080 0 mg/mL, 0.002 5 - 0.080 0 mg/mL and 0.005 0 - 0.160 0 mg/mL, whose average recoveries ( $n = 6$ ) were 98.84% (RSD = 1.43%), 99.30% (RSD = 0.93%) and 98.22% (RSD = 1.18%), respectively. **CONCLUSION** This simple and accurate method can be used for the rapid quality control of Wuwei Huanglian Pills.

**KEY WORDS:** Wuwei Huanglian Pills; palmatine hydrochloride; jatrorrhizine; berberine hydrochloride; HPLC

五味黄连丸系传统藏药,是由黄连、红花、诃子、渣驯膏、麝香 5 味药组成,具有消炎、止泻、止痛的功效,用于胃肠炎、久泻腹痛等疾病<sup>[1-3]</sup>,其中黄连作为君药,除含盐酸小檗碱外,盐酸巴马汀、药根碱等含有量也较高。目前,对盐酸小檗碱的报道较多,但其存在于多种植物,故仅以该成分

作为单一指标时,不能充分保证黄连及其相关复方药的质量。另外,对盐酸巴马汀、药根碱及盐酸小檗碱的同时测定尚未见报道<sup>[4-8]</sup>。为了进一步控制五味黄连丸质量,本实验建立了 HPLC 法同时测定这 3 种有效成分含有量的方法,该方法简单、快速、准确,能更好控制该药物的质量。

收稿日期: 2015-11-10

基金项目: 青海大学大学生科技创新基金项目(2014)

作者简介: 热增才旦(1979—),男,博士,副教授,从事中藏药研究与开发。E-mail: rezengcd@163.com

\* 通信作者: 童 丽(1972—),女,博士,教授,从事中藏药研究与开发。E-mail: qhtongli@126.com

## 1 仪器与试剂

Agilent1220 高效液相色谱系统, 包括 1200 系列 VWD 检测器、真空脱气机、自动进样器、1220 Infinity 柱温箱、Agilent LAB CDS 工作站 (美国 Agilent 公司); KQ-500B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); PHS 3C pH 计 (雷磁科学仪器有限公司)。

盐酸小檗碱 (批号 141128)、盐酸药根碱 (批号 141023)、盐酸巴马汀 (批号 140221) 对照品 (成都菲普德生物技术有限公司, 含有量均大于 98.5%)。五味黄连丸 (批号 20130140、20130421、20130423), 由青海金河藏药厂提供。甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法结果

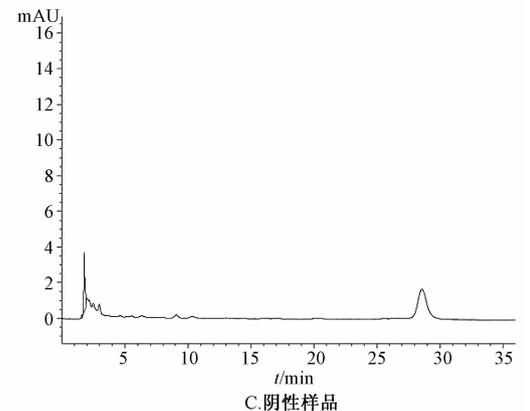
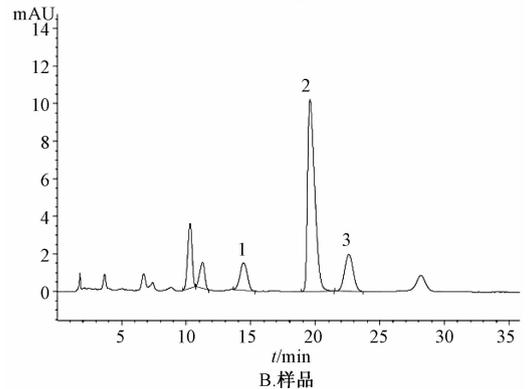
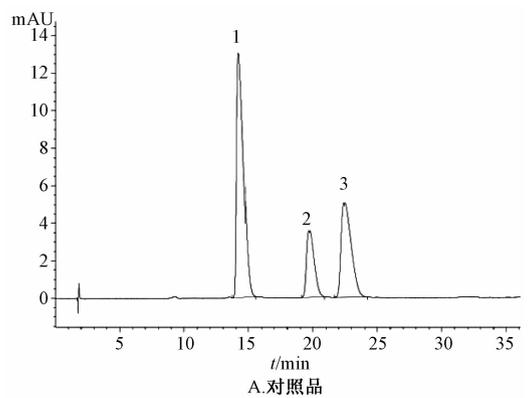
**2.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-磷酸缓冲液 (32 : 68, pH 3.2); 检测波长 346 nm; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 5 μL, 盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱均能达到基线分离, 见图 1。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱适量, 加甲醇制备成三者质量浓度分别为 0.10、0.10、0.20 mg/mL 的混合溶液, 即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取五味黄连丸适量, 研细, 精密称取 1.3 g, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 30 min, 取出, 放冷至室温, 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 空白溶液** 取阴性样品 (缺黄连), 按“2.3”项下方法制成阴性样品溶液, 在“2.1”项色谱条件下分别吸取供试品、对照品溶液、阴性样品溶液注入液相色谱仪, 进行测定, 结果见图 1。

**2.5 线性关系考察** 取“2.2”项下混合对照品溶液, 分别稀释成含盐酸巴马汀、药根碱 0.002 5、0.005 0、0.010 0、0.020 0、0.040 0、0.080 0 mg/mL, 盐酸小檗碱 0.005 0、0.010 0、0.020 0、0.040 0、0.080 0、0.160 0 mg/mL 的系列混合对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样 5 μL, 重复 3 次, 记录峰面积。以进样量 (mg/mL) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行回归计算。结果, 3 种成分线性关系良好, 具体见表 1。



1. 药根碱 2. 盐酸小檗碱 3. 盐酸巴马汀

1. jatrorrhizine 2. berberine hydrochloride 3. palmatine hydrochloride

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1 3 种成分的回归方程、相关系数及线性范围 (n=3)  
Tab.1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of three constituents (n=3)

成分	回归方程	r	线性范围/ (mg·mL <sup>-1</sup> )
盐酸巴马汀	$Y = 8\ 016.9X + 17.922$	0.999 8	0.002 5 ~ 0.080 0
药根碱	$Y = 13\ 479X + 22.788$	0.999 9	0.002 5 ~ 0.080 0
盐酸小檗碱	$Y = 1\ 632.6X + 4.834\ 3$	0.999 8	0.005 0 ~ 0.160 0

**2.6 精密度试验** 取同一供试品溶液, 连续进样 8 次, 测定峰面积, 测得盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱峰面积 RSD (n=8) 分别为 0.79%、0.79%、0.75%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取五味黄连丸(批号20130421)样品粉末6份,按“2.3”项下方法处理,测得盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱平均含有量( $n=6$ )分别为0.213 8、0.070 4、2.073 9 mg/g, RSD分别为0.94%、0.33%、1.16%,表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h 进样,测得盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱峰面积 RSD ( $n=6$ )分别为1.23%、0.78%、1.03%,表明供试品溶液在24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 精密称取含有量已知的五味黄连丸样品粉末6份,每份600 mg,置于具塞锥形瓶中,精密加入每1 mL含盐酸巴马汀0.10 mg、药根碱0.10 mg、盐酸小檗碱0.20 mg的混合对照品溶液2 mL,氮气吹干,再精密加入甲醇20 mL,按“2.3”项下方法处理,计算回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab. 2 Results of recovery tests ( $n=6$ )

成分	称样量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收	RSD/
	mg	mg	mg	%	率/%	%
盐酸巴马汀	600.1	0.200 0	0.326 9	98.66	98.84	1.43
	600.2	0.200 0	0.326 9	98.68		
	600.1	0.200 0	0.323 8	97.13		
	599.9	0.200 0	0.331 3	100.91		
	600.0	0.200 0	0.329 5	99.99		
	599.9	0.200 0	0.324 9	97.65		
药根碱	600.1	0.200 0	0.237 9	97.72	99.30	0.93
	600.2	0.200 0	0.242 1	99.85		
	600.1	0.200 0	0.241 8	99.68		
	599.9	0.200 0	0.241 1	99.34		
	600.0	0.200 0	0.243 2	100.37		
	599.9	0.200 0	0.240 2	98.86		
盐酸小檗碱	600.1	0.400 0	1.675 5	98.22	98.22	1.18
	600.2	0.400 0	1.675 5	98.15		
	600.1	0.400 0	1.676 0	98.34		
	599.9	0.400 0	1.666 6	96.10		
	600.0	0.400 0	1.679 1	99.17		
	599.9	0.400 0	1.680 1	99.35		

2.10 样品含有量测定 取3批五味黄连丸样品粉末,每批平行制备3份供试品溶液,注入液相色谱仪进行测定,外标法计算含有量,结果见表3。

### 3 讨论

3.1 检测波长的选择 采用VWD检测器在200~400 nm 波长处进行光谱扫描,发现盐酸巴马汀、药根碱、盐酸小檗碱均在346 nm 处有较强吸收,而且无杂质干扰,与文献[9]报道一致。

3.2 流动相的选择 当以甲醇-磷酸缓冲液(31:69, pH 3.8)为流动相时,分离效果较差<sup>[9-10]</sup>。由

表3 含有量测定结果( $n=3$ )

Tab. 3 Results of content determination ( $n=3$ )

批号	盐酸巴马汀/ (mg·g <sup>-1</sup> )	药根碱/ (mg·g <sup>-1</sup> )	盐酸小檗碱/ (mg·g <sup>-1</sup> )
20130140	0.215 9	0.070 7	2.137 4
20130421	0.214 8	0.070 6	2.107 2
20130423	0.214 7	0.070 3	2.102 3

于盐酸小檗碱具有酸性,故单独采用甲醇-水流动相时,拖尾严重,而加入磷酸缓冲液调节pH值至3.2后可得到明显改善。当流动相比例由31:69变为35:65时,盐酸小檗碱保留时间由25 min提前到14 min,大大提高了工作效率,既避免各成分色谱峰的拖尾现象,又达到基线分离要求。

### 4 结论

五味黄连丸是一味传统藏药,疗效可靠,使用广泛。但目前仅以黄连中的盐酸小檗碱作为单一指标,并不能充分保证黄连及其相关复方药的质量。本研究建立HPLC法同时测定其中盐酸巴马汀、药根碱及盐酸小檗碱含有量,该方法简单、快速、准确,可为更有效控制该药物的质量奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 胡燕芹. 藏药五味黄连丸治疗久泻疾病的疗效分析[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(6): 11-12.
- [2] 李先加. 藏药方剂学[M]. 北京: 民族出版社, 2007: 363.
- [3] 吴焕才, 王明善, 党合群, 等. 常用藏成药诠释[M]. 西宁: 青海人民出版社, 2002: 221.
- [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]. 中国药学杂志, 2009, 44(5): 390-394.
- [5] 陈庆辉, 唐元军. 知柏地黄丸中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2198-2202.
- [6] 阳勇, 李铁刚, 朱晶晶, 等. HPLC法测定黄连药材及其炮制品中主要生物碱的含量[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1540-1544.
- [7] 唐洪梅, 廖小红, 何嘉仑, 等. HPLC法测定肠激安剂剂中芍药苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中成药, 2012, 34(5): 853-857.
- [8] 文欣欣, 刘丹华, 余陈欢, 等. 薄层色谱-荧光分光光度法测定黄连及香连丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(10): 53-54.
- [9] 肖远灿, 胡凤祖, 师治贤. HPLC法测定藏药十八味诃子利尿丸中盐酸小檗碱含量[J]. 现代科学仪器, 2006(3): 61-62.
- [10] 傅黎春, 李桃英. RP-HPLC同时测定风痛安胶囊中防己碱、防己诺林碱及盐酸小檗碱含量[J]. 中成药, 2009, 31(6): 870-873.