

黄白止痢颗粒质量标准

丁兆朋, 郝智慧*, 杨芬芳, 逢丽萍

(青岛农业大学化学与药学院农用生物制药实验室, 山东 青岛 266109)

[摘要] **目的:**建立黄白止痢颗粒的质量标准。**方法:**采用薄层色谱法对黄白止痢颗粒中黄连、大黄炭、白头翁进行定性鉴别,并采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱含量。Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.3% 磷酸水溶液(32:68),检测波长 348 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。**结果:**在薄层鉴别中黄连、大黄炭、白头翁有良好的鉴别特征有效成分盐酸小檗碱含量在 0.008 8~0.11 g·L⁻¹具有良好的线性关系($r=0.999 1$),平均加样回收率为 98.58%,RSD 1.05%。**结论:**使用薄层色谱法对黄连、大黄炭、白头翁进行定性鉴别,操作简便、重复性好,且阴性对照无干扰;盐酸小檗碱的含量测定方法简便、快速、准确,具有良好的重复性和回收率,可作为黄白止痢颗粒的质量控制方法。

[关键词] 黄白止痢颗粒; 质量标准; 盐酸小檗碱; 大黄; 白头翁皂苷 B₄; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0117-04

[doi] 10.11653/syjf2013170117

Quality Standard of Huangbaizhili Granules

DING Zhao-peng, HAO Zhi-hui*, YANG Fen-fang, PANG Li-ping

(College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Huangbaizhili Granules. **Method:** The *Coptis chinensis*, *Rhubarb charcoal* and *Pulsatilla chinensis* were identified by TLC and the content of berberine hydrochloride was detected by HPLC. The separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric acid (32:68). The detective wavelength was set at 348 nm. The column temperature was kept at 25 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the injection volume was 10 μL. **Result:** The *C. chinensis*, *R. charcoal* and *P. chinensis* could be identified by TLC and the calibration curve of berberine hydrochloride showed a good linearity in the range of 0.008 8-0.11 g·L⁻¹ ($r=0.999 1$). The average recovery was 98.58% with RSD 1.05%. **Conclusion:** This method to identify three main ingredients in Huangbaizhili Granules by TLC is simple and has a great repeatability. The negative control sample has no interference. The method to determine the content of berberine hydrochlorid in

[收稿日期] 20120917(003)

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303040-X)

[第一作者] 丁兆朋, 硕士研究生, 从事药学、质量标准、方法学研究, Tel:15194274115, E-mail: dzp1989211@163.com

[通讯作者] * 郝智慧, 博士研究生, 副教授, 从事药学、质量标准、方法学研究, Tel:0532-86080346, E-mail: haotiger@126.com

[9] Ni Y N, Lai Y H, Brandesc S, et al. Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the Cassia seed example [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 647(2):149.

[10] Yan S K, Xin W F, Luo G A, et al. An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *J*

Chromatogr A, 2005, 1090(1/2):90.

[11] Lohnes M T, Guy R D, Wentzell P D. Window target-testing factor analysis: Theory and application to the chromatographic analysis complex mixtures with multiwavelength fluorescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 389(1/3):95.

[责任编辑 顾雪竹]

Huangbaizhili Granules is rapid, accurate and the results have a good repeatability and recovery. The methods can be used for the quality of the Huangbaizhili Granules.

[Key words] Huangbaizhili Granules; quality standard; berberine hydrochloride; rhubarb; pulsatilla saponin B₄; TLC; HPLC

黄白止痢颗粒是根据临床验方开发研制而成的一种中药复方颗粒,由黄连、白头翁、老鹳草和大黄炭 4 味中药组成。其中黄连清热燥湿、泻火解毒为君药^[1-2];白头翁清热解毒、凉血止痢^[3]为臣,助黄连止痢;大黄炭为佐,使黄连、白头翁解毒止痢倍增^[4];老鹳草为使,既可协君药黄连解毒,又能取其炒炭之收敛功效以助君臣止泻^[5];四味相配,互相协同,优势互补,共收清热燥湿、解毒止痢之功,专用于治疗仔猪白痢^[6-7]。为有效控制制剂的质量,确保其临床疗效,本研究对制剂中黄连、大黄炭、白头翁皂进行了定性鉴别,对君药黄连中有效成分盐酸小檗碱进行了含量测定研究,为该制剂的质量控制提供参考依据。

1 材料

黄白止痢颗粒剂(批号 2007101201, 2007101502, 2007101703, 2008011504, 2008011805, 2008012106, 2008012307, 2008012508, 2008012709, 2008012910)由青岛康地恩药业股份有限公司提供;黄连对照药材(批号 120913-201109),盐酸小檗碱(批号 110713-200911),白头翁皂苷 B₄(批号 111766-200601),均购自中国药品生物制品检定所;大黄对照药材(批号 Z0040809),购自中国兽药药品监察所。

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配备 G1379A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样仪, G1316A 柱温箱, G1315B DAD 二极管阵列检测器, HPLC 化学工作站; FA1004 型 1/万电子天平(上海精科天平厂); AL204 型电子天平(梅特勒-托利多公司); ZF7B 型三用紫外分析仪(上海康华生化仪器制造厂);微量进样器(上海安亭微量进样器厂); KQ-600E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

G 薄层预制板, H 薄层预制板(青岛海洋化工厂),磷酸(天津市光复精细化工研究所),盐酸(汕头市西陇化工厂有限公司),乙腈为色谱纯(Dikma 公司),水为纯化水,其余所有试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄白止痢颗粒中黄连、大黄炭和白头翁的薄层定性鉴别

2.1.1 黄连的薄层色谱

取本品 0.5 g,加甲醇 30 mL,加热回流 15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 10 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取黄连对照药材 0.05 g,同法制成对照药材溶液。取盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。取缺失黄连的阴性样品 0.3 g,同法制成阴性样品溶液。吸取上述溶液各 1 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-冰醋酸-水(7:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,分别置日光及紫外光灯(365 nm)下检视。

2.1.2 大黄炭的薄层鉴别

取本品粉末(过 3 号筛)0.5 g,加甲醇 20 mL,超声 15 min,滤过,取滤液 10 mL,蒸干,残渣加 10 mL 水和 1 mL 盐酸,加热回流 30 min,放冷,用乙醚分 3 次萃取,每次 20 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加三氯甲烷 2 mL 溶解,作为供试品溶液。取大黄对照药材 0.1 g,同法制成对照药材溶液。另取缺失大黄炭的阴性样品粉末(过 3 号筛)0.4 g,同法制成阴性样品溶液。吸取上述各种溶液 4 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,分别置日光及紫外光灯(365 nm)下检视。

2.1.3 白头翁的薄层鉴别

取本品粉末(过 3 号筛)3.5 g,加甲醇 20 mL,超声处理 10 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取白头翁皂苷 B₄ 对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。取缺失白头翁的阴性样品粉末(过 3 号筛)3 g,同法制成阴性样品溶液。吸取上述各溶液 1 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:2)的上层溶液为展开剂,展开,展距 5 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,日光下检视。

2.1.4 薄层定性鉴别结果

在薄层色谱中,供试品溶液与相对应的对照药材溶液或对照品溶液,显现相同颜色相同位置的主斑点。阴性样品溶液无相应的主斑点。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 348 nm, 流动相乙腈-0.3% 磷酸水溶液(32:68), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 理论塔板数按盐酸小檗碱色谱峰计算不低于 4 000, 进样量 10 μL。

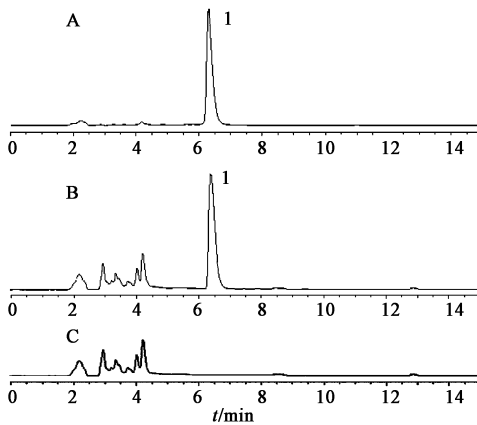
2.2.2 溶液的制备

2.2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定盐酸小檗碱适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.4 mg 的溶液, 即得。

2.2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 3 号筛)约 0.15 g, 精密称定, 加 50 mL 甲醇-盐酸(100:1)溶液, 回流(71 °C)提取 30 min, 放冷, 精密称定, 以提取溶剂补足减失的质量, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2.3 缺失黄连阴性对照品溶液制备 按处方比例及制备工艺制备缺黄连药材的黄白止痢颗粒, 按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

2.2.3 专属性考察 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 检测。结果显示在上述色谱条件下, 盐酸小檗碱峰与其他峰较好的分离, 阴性样品溶液在盐酸小檗碱峰相应的位置上无其他色谱峰的干扰, 结果见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性; 1. 盐酸小檗碱

图 1 黄白止痢颗粒 HPLC

2.2.4 标准曲线制备 精密称定 11 mg 盐酸小檗碱, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声溶解后稀释定容至刻度, 摇匀, 配制成含盐酸小檗碱 0.22 g · L⁻¹ 的对照品储备液。用甲醇稀释制成 0.11, 0.055, 0.044, 0.002 2, 0.008 8 g · L⁻¹ 一系列对照品溶液。上述各浓度对照品溶液按 2.2.1 项下色谱条件, 分别进样 10 μL, 记录色谱图, 测定其峰面积。结果以对照品相应的浓度为横坐标 (X, g · L⁻¹), 对照品峰面积值为纵坐标 (Y,

mAU), 进行回归计算, 得标准曲线方程 $Y = 29\ 019X + 283.45$ ($r = 0.999\ 1$)。表明盐酸小檗碱在 0.008 8 ~ 0.11 g · L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取供试品(批号 2008012106)溶液 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件, 重复进样 6 次, 盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.61%, 表明仪器精密度符合要求。

2.2.6 重复性试验 取同一批号(批号 2008012106)样品, 按 2.2.2.2 项下平行制备 6 份供试液品溶液, 分别精密吸取 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件, 测定, 盐酸小檗碱质量分数的 RSD 0.93%, 表明方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品(批号 2008012106)溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h, 分别精密吸取 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件, 测定, 盐酸小檗碱峰面积的 RSD 1.00%, 表明供试品溶液在 8 h 稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批号(批号 2008012106)的样品粉末 0.15 g, 共 6 份, 每 3 份为一组, 分别精密加盐酸小檗碱对照品 1.5, 2.0 mg, 按 2.2.2.2 项下配液, 精密吸取 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件, 测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 黄白止痢颗粒中盐酸小檗碱加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.148 9	2.011 6	1.506 1	3.490 8	98.21	98.58	1.05
2	0.149 7	2.022 4	1.487 6	3.509 2	99.94		
3	0.150 2	2.029 2	1.495 4	3.500 1	98.36		
4	0.148 5	2.006 2	2.013 9	3.977 0	97.85		
5	0.149 0	2.013 0	2.120 6	4.127 8	99.72		
6	0.151 1	2.041 3	1.920 5	3.911 6	97.38		

2.2.9 样品测定 对 10 批样品, 按 2.2.2.2 项下制成供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。根据峰面积计算盐酸小檗碱的含量, 结果见表 2。

3 讨论

“黄白止痢颗粒”是由黄连、白头翁、老鹳草 3 味药物提取、浓缩、加大黄炭粉干燥制得的颗粒状制剂。为保证药品质量, 在质量研究工作中设计了颗粒剂单味药材的检出及主药有效成分含量测定等研究内容。

在文献报道^[8-11]基础上, 黄连、大黄炭、白头

表 2 供试品中盐酸小檗碱含量测定

No.	含量	平均含量/mg · g ⁻¹	RSD/%
2007101201	13.89		
2007101502	13.69		
2007101703	13.76		
2008011504	13.90		
2008011805	13.40		
2008012106	13.51	13.71	1.61
2008012307	13.96		
2008012508	13.38		
2008012709	13.95		
2008012910	13.68		

翁的薄层鉴别通过改变展开剂、点样量、薄层板、预饱和时间等使其达到良好的展开效果。结果表明此操作简单，色谱特征斑点清晰，重复性良好，专属性强，可用于该制剂定性鉴别标准。本研究还对老鹳草进行了薄层鉴别，但是采用不同展开体系、不同显色剂和不同检视条件，效果都不是很理想，因此老鹳草药材暂不作为该制剂的质量标准。

实验在文献报道^[12-15]色谱条件基础上，对影响指标成分盐酸小檗碱分离度和响应值的主要因素包括流动相、色谱柱、柱温、流速、检测波长进行了考察和优化。最终确定的色谱条件下，盐酸小檗碱峰面积与进样量呈良好的线性关系，显示该方法对处方中盐酸小檗碱的含量测定适用，分离度高、峰型好，阴性无干扰。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 22, 285.

[2] 于天禹, 张振秋, 李伟铭, 等. 黄连、连翘抗炎作用的最佳配伍比例研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (21): 113.

[3] 陈静, 朴钟云, 刘显军, 等. 白头翁的生物学功能及应用现状 [J]. 江苏农业科学, 2011, 39 (3): 4.

[4] 霍志鹏, 王玉, 张兰兰, 等. 黄连-大黄合煎蒽醌类成分溶出变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (3): 1.

[5] 何文涛, 金哲雄, 王宝庆. 老鹳草的研究进展 [J]. 航空航天医学杂志, 2011, 22 (10): 1200.

[6] 其其格, 巴根那. 仔猪白痢的防治 [J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32 (5): 87.

[7] 赵晓宁, 来德强. 仔猪白痢防治探讨 [J]. 畜牧兽医杂志, 2012, 31 (1): 125.

[8] 袁晓芳. 黄连上清片中大黄的薄层色谱鉴别法 [J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12 (3): 37.

[9] 张玉华, 黄云先, 木书林. 开胸消食片中大黄、厚朴 TLC 鉴别和大黄素、大黄酚 HPLC 含量测定方法的研究 [J]. 中国药品标准, 2006, 17 (6): 33.

[10] 许立颖, 黄颖雅. 白头翁与习用白头翁的薄层色谱鉴别比较 [J]. 临床医学工程, 2011, 18 (5): 731.

[11] 郑友兰, 郭庆峰, 鲍建才, 等. 肠泰合剂的薄层鉴别方法研究 [J]. 中成药, 2007, 29 (11): 附 2.

[12] 杨允辉. HPLC 法测定复方仙鹤草肠炎片中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (12): 24.

[13] 肖慧, 钟瑜. HPLC 法测定五味香连丸中盐酸小檗碱的含量 [J]. 广东药学院学报, 2004, 20 (6): 597.

[14] 李小燕. HPLC 法测定三黄片中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中成药, 2002, 24 (9): 679.

[15] 胡芳, 陆兔林, 毛春芹, 等. HPLC 测定黄连生物总碱中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (7): 69.

[责任编辑 顾雪竹]