

# 清肾颗粒中黄连的定性鉴别和定量分析

石金敏<sup>1,2</sup>, 魏良兵<sup>3</sup>, 李尧尧<sup>1\*</sup>, 贾陆<sup>2</sup>, 张志杰<sup>1</sup>, 顾雪竹<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450003;  
3. 安徽中医学院第一附属医院, 合肥 230031)

**[摘要]** 目的:制订清肾颗粒中黄连质量标准。方法:采用薄层色谱鉴别法对黄连进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定黄连中盐酸小檗碱的含量。色谱条件:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.033 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾(25:75)为流动相,检测波长 345 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃。结果:在实验条件下,薄层斑点清楚,阴性无干扰,分离效果较好,重复性良好。HPLC 方法学考察表明制剂中盐酸小檗碱在 0.028~0.892 μg( $r = 0.999 9$ )峰面积与其进样量线性关系良好,平均回收率为 100.16%,RSD 1.87%( $n = 6$ )。结论:该方法准确、快速,可重复性好,可用于清肾颗粒中黄连的质量控制。

**[关键词]** 清肾颗粒; 黄连; 盐酸小檗碱; 薄层色谱; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0091-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013160091

## Study on Qualitation and Quantitation of *Coptis chinensis* in the Qingshen Granule

SHI Jin-min<sup>1,2</sup>, WEI Liang-bin<sup>3</sup>, LI Rao-rao<sup>1\*</sup>, JIA Lu<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-jie<sup>1</sup>, GU Xue-zhu<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China;

3. First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study quality standard of *Coptis chinensis* in the Qingshen granule. **Method:**

**[收稿日期]** 20130214(003)

**[基金项目]** 中国中医科学院自选课题(ZZ2006096,2011xycz-12);北京自然科学基金面上项目(7112097)

**[第一作者]** 石金敏,硕士研究生,从事生药学研究,E-mail: weian510@163.com

**[通讯作者]** \*李尧尧,从事中药炮制研究,Tel:010-64014411-2975,E-mail:leeraoao@163.com

- [3] 侯小涛,戴航,周江煜. 黄柏的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2):498.
- [4] 李峰,贾彦竹. 黄柏的临床药理作用[J]. 中医药临床杂志, 2004, 16(2):191.
- [5] 万德光. 中药品种品质与药效[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2007:813.
- [6] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 黄柏总生物碱提取方法及工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):3.
- [7] 张倩,蔡丽芬,钟国跃,等. RP-HPLC 法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):2061.
- [8] 徐敏,万德光. 不同产地和生长年限川黄柏中小檗碱的含量测定[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(1):93.
- [9] 沈娟,尹莲,段金廛. HPLC 法测定黄柏生物碱成分含量及在二妙丸类方中的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):31.
- [10] 王瑾. RP-HPLC 法测定黄柏中小檗碱、巴马汀和药根碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4):610.
- [11] 赵君颖,汪坤,张振杰. 一测多评法比较不同黄连炮制品中 4 种生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):11.
- [12] 夏荃,李灿明. HPLC 测定黄柏生品与不同炮制品中 3 种生物碱的含量[J]. 中成药, 2008, 30(7):1018.

[责任编辑 顾雪竹]

Thin-layer chromatography was used to identify *C. chinensis*. The content of berberine hydrochloride was determined by HPLC. The HPLC separation was performed on kromasil-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.033 mol · L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25:75) as mobile phase; the detection wavelength was set at 345 nm; the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and the column temperature was set at 30 °C. **Result:** The spot in the TLC was clear, with no interference from negative control. In the HPLC experiments of precision, reproducibility and stability, the samples could be separated entirely. The linear range of berberine hydrochloride was 0.028-0.892 μg (r=0.999 9), the average recovery was 100.16% with RSD of 1.87% (n=6). **Conclusion:** The methods are accurate and quick in qualitative identification and quantitative assay of this preparation, which can be used for the quality control of Qingshen granule.

[Key words] Qingshen granule; *Coptis chinensis* Franch.; berberine hydrochloride; TLC; HPLC

清肾颗粒为安徽中医学院第一附属医院的院内制剂,由白花蛇舌草、丹参、大黄、黄连等 14 味药组成,黄连是其臣药。黄连来源于毛茛科植物黄连(味连)的干燥根茎,味苦性寒,入心、肝、胃、大肠经,是一种良好的清热解毒消炎药<sup>[1]</sup>。本文对清肾颗粒中的黄连进行了 TLC 薄层鉴别;采用 HPLC 测定清肾颗粒中盐酸小檗碱的含量,并对其进行了方法学验证,建立了清肾颗粒中黄连的质量标准。

### 1 仪器与试剂

KX-30DE 型数控超声波清洗器,岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪。

盐酸小檗碱(110713-200609)和黄连对照药材(120913-200609)均购自中国食品药品检定研究院。乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯),娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。清肾颗粒 3 批中试样品(批号 20120726,20120811,20120821)及黄连阴性对照,均由安徽中医学院第一附属医院制剂中心提供。

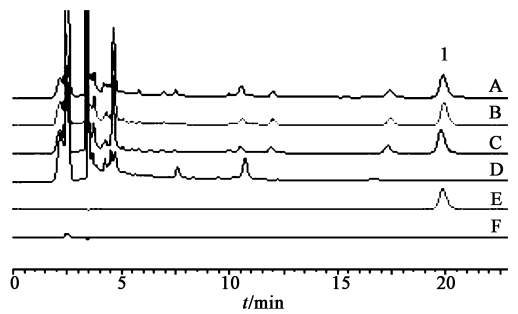
### 2 定性鉴别<sup>[2-6]</sup>

取本品 5 g,研细,加甲醇-盐酸(100:1)25 mL,超声处理(300 W,频率 24 kHz)30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 5 mL 溶解,作为供试品溶液。取黄连阴性对照样品,同法制成阴性对照溶液。另取黄连对照药材 0.26 g,同法制成对照药材溶液。取盐酸小檗碱 2 mg 用甲醇溶解制成 1 g · L<sup>-1</sup>的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上。以氨蒸汽饱和的甲苯-异丙醇-乙酸乙酯-甲醇-水(6:1.5:3:5:0.5)为展开剂(展开剂需新鲜配制,取上层。展开缸一侧放展开剂,另一侧放等体积的新鲜打开的氨水),展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点而黄连阴性对照样

品溶液无干扰。

### 3 含量测定<sup>[7-10]</sup>

**3.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈-0.033 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾(25:75),检测波长 345 nm,流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C。色谱图见图 1。



A. 批号 20120726; B. 批号 20120811; C. 批号 20120821; D. 阴性; E. 对照品; F. 空白; 1. 盐酸小檗碱

图 1 清肾颗粒中黄连的 HPLC

**3.2 对照品溶液的制备** 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 16 μg 的溶液,即得盐酸小檗碱对照品溶液。

**3.3 供试品溶液的制备** 取本品 5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(100:1)25 mL,称定质量,超声处理(300 W,频率 24 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 2 mL,用甲醇定容至 10 mL,即得。

**3.4 阴性对照溶液的制备** 取黄连阴性对照样品,照 3.3 项下的方法制备,即得阴性对照溶液。

**3.5 空白对照溶液的制备** 于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(100:1)的混合溶液 25 mL,照 3.3 项下方法制备,即得空白对照溶液。

**3.6 线性关系考察** 精密吸取质量浓度为 0.178 4 g · L<sup>-1</sup> 盐酸小檗碱对照品溶液,分别配制成 0.089 2, 0.044 6, 0.022 3, 0.011 2, 0.005 6, 0.002 8 g · L<sup>-1</sup>,

分别进样 10  $\mu\text{L}$ ,以进样质量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程为  $Y = 3.6 \times 10^6 X - 10\ 484$  ( $r = 0.999\ 9$ ),盐酸小檗碱的进样量在 0.028 ~ 0.892  $\mu\text{g}$  呈线性关系。

### 3.7 方法学考察

**3.7.1 精密度试验** 取批号 20120811 样品,同法制备供试品溶液,精密吸取 10  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,同法测定,计算 RSD 0.60%,表明仪器性能良好。

**3.7.2 稳定性试验** 取同一样品,同法制备供试品溶液,同法测定,分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 进样 10  $\mu\text{L}$  测定,测定峰面积,计算 RSD 0.68%,表明盐酸小檗碱在 24 h 内基本稳定。

**3.7.3 重复性试验** 取同一样品 6 份,制备供试品溶液,测定,结果显示盐酸小檗碱的平均含量为 0.043%,RSD 1.69%,表明样品制备方法重复性良好。

**3.7.4 回收率试验** 采用加样回收法,精密称取同一样品(已知盐酸小檗碱含量为 0.043%)6 份,每份 2.5 g,精密加入适量的盐酸小檗碱,同法制备供试品溶液,同法测定盐酸小檗碱的含量,结果表明方法回收率良好,见表 1。

表 1 盐酸小檗碱加样回收率测定

No.	样品中 含量/mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	1.080 8	2.674 6	98.38	100.16	1.87
2	1.081 1	2.754 6	103.30		
3	1.080 9	2.680 0	98.71		
4	1.080 8	2.717 3	101.02		
5	1.081 0	2.710 4	100.58		
6	1.080 9	2.684 3	98.97		

注:加入量均为 1.620 0 mg。

**3.8 样品测定** 取 3 批中试样品,按照供试品溶液制备方法进行处理,分别制备供试品溶液,分别进样测定盐酸小檗碱峰面积,计算盐酸小檗碱含量依次为 0.419,0.432,0.442  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。根据测定结果,拟定本品含盐酸小檗碱( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{CLNO}_4$ )计,不得少于 0.335  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

## 4 讨论

**4.1 TLC 制备供试品溶液的制备** 尝试用甲醇和甲醇-盐酸(100:1)25 mL,超声处理(300 W,频率

24 kHz)30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇使溶解,定容到 5 mL 量瓶,作为供试品溶液,发现用甲醇-盐酸(100:1)较好故选择用甲醇-盐酸(100:1)制备供试品溶液。

**4.2 TLC 展开剂的选择** 尝试用甲苯-异丙醇-乙酸乙酯-甲醇-水 6:1.5:3:1.5:0.3,6:1.5:3:3:0.3,6:1.5:3:2:0.4,6:1.5:3:5:0.5,结果显示比例为 6:1.5:3:5:0.5 时展开效果较好。另外也比较了氨水用量与氨水放置时间对薄层展开效果的影响,结果显示,氨水体积与展开剂体积为 1:1 且使用新鲜打开的氨水展开效果较好。故确定以甲苯-异丙醇-乙酸乙酯-甲醇-水(6:1.5:3:5:0.5)为展开剂,以等体积新鲜打开的氨水放于展缸一侧进行预饱和。

**4.3 含量测定流动相选择** 尝试乙腈-0.033  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾(25:75)、乙腈-0.033  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾(30:70),发现流动相为乙腈-0.033  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾(25:75)时基线分离较好,峰形较好,故选择其作为流动相。

## [参考文献]

- [1] 谢进,韩晋,张诗龙,等. 黄连不同部位中 5 种生物碱的含量比较[J]. 解放军药学报,2011,27(2):124.
- [2] 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,2010:285.
- [3] 文萍,王凤林,余良忠,等. 肝复康片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):74.
- [4] 马睿,代龙,孙明江,等. 白芨龙胶囊的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):52.
- [5] 余晶晶,黄一平,吴德康. 胃安宁颗粒质量标准研究[J]. 中国药房,2008,19(12):912.
- [6] 邓如伟,冉兰,李颖,等. 杞菊地黄颗粒中六味药材的薄层色谱鉴别[J]. 华西药理学杂志,2005,20(3):264.
- [7] 吴安国,曾宝,林乔,等. 黄连厚朴配伍在不同提取工艺中主要成分含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):19.
- [8] 夏从龙,周浓,种佳. HPLC 测定不同厂家牛黄消炎片中 5 种蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):83.
- [9] 彭娟,郭娜,范斌,等. 黄连解毒汤高效液相色谱指纹图谱研究及指标成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):67.
- [10] 李勇军,何迅,郑林,等. 蒲葶颗粒的定性定量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):24.

[责任编辑 顾雪竹]