

毛细管电泳法同时测定清肺抑火丸中 盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱含量

谢梦婷, 王晓可, 毋福海*
(广东药学院, 广州 510224)

[摘要] 目的: 建立同时测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱含量的毛细管电泳法。方法: 以盐酸伪麻黄碱为内标, 采用未涂层弹性融硅石英毛细管柱(75 $\mu\text{m} \times 55 \text{ cm}$, 有效长度 47 cm), 运行缓冲液 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液 + 40% 乙醇 (pH 5.75), 分离电压 23 kV, 重力进样 15 s (高度 15 cm), 检测波长 208 nm。结果: 盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱分别在 40.5 ~ 81.0, 0.896 ~ 3.584, 6.0 ~ 36.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 回收率分别为 96.0%, 100.5%, 97.8%, RSD 均 < 1.85%。结论: 该方法专属性强、结果准确可靠、重复性好, 可用于清肺抑火丸的质量控制。

[关键词] 毛细管电泳法; 清肺抑火丸; 盐酸小檗碱; 盐酸黄柏碱; 苦参碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0113-04

[doi] 10.11653/syfy2013130113

Simultaneous Determination of Berberine Hydrochloride, Phellodendrine Hydrochloride and Matrine in Qingfei Yihuo Pills by Capillary Electrophoresis Method

XIE Meng-ting, WANG Xiao-ke, WU Fu-hai*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determining of berberine hydrochloride, phellodendrine hydrochloride and matrine in Qingfei Yihuo pills by capillary electrophoresis. **Method:** With pseudoephedrine hydrochloride as the internal standard, separation was performed on a uncoated fused silica capillary of 55 cm \times 75 μm (47 cm effective length). 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 + 40% ethanol solution (pH 5.75) was selected as the running buffer, separation voltage was 23 kV, samples was injected by gravity in 15 s (15 cm), detection wavelength was at 208 nm. **Result:** Calibration curves for berberine hydrochloride, phellodendrine hydrochloride and matrine were linear in the concentration range of 40.5-81.0, 0.896-3.584, 6.0-36.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recoveries were 96.0%, 100.5%, 97.8%, respectively, with RSD were not more than 1.85%. **Conclusion:** This method was accurate and reliable with good repeatability, it could be used for quantitative determination of Qingfei Yihuo pills.

[Key words] capillary electrophoresis; Qingfei Yihuo pills; berberine hydrochloride; phellodendrine hydrochloride; matrine

[收稿日期] 20121129(007)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(5002841)

[第一作者] 谢梦婷, 硕士, 从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究, Tel: 13564978947, E-mail: mengzhongyue1234@sina.cn

[通讯作者] * 毋福海, 博士, 教授, 从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究, Tel: 13610124722, E-mail: fuhaiwu@163.com

清肺抑火丸收载于《中国药典》2010年版一部, 由大黄、黄芩、黄柏、栀子、知母、浙贝母等 10 味中药组成, 具有清肺止咳、化痰通便之功效。临床用于治疗痰热阻肺所致的咳嗽、痰黄稠黏、口干咽痛、大便干燥。该产品现行标准^[1]采用 HPLC 测定黄芩苷含量, 现有文献报道采用薄层扫描法测定清肺抑火丸

中小檫碱和菝葜皂甙元的含量^[2], HPLC 测定白花前胡甲素^[3]及大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种蒽醌类成分含量^[4], 而毛细管电泳法进行含量测定的研究尚未见报道。黄柏为方中主药, 其主要化学成分包括生物碱类、柠檬苷素类、甾醇类等^[5]。黄柏及含黄柏复方制剂的质量, 多以小檫碱、巴马汀、药根碱含量为评价指标^[6-7], 但黄连及小檫属植物均富含上述成分, 所以上述方法缺乏专属性; 黄柏碱为黄柏中特有成分, 目前在黄连及小檫属植物中尚未发现。苦参为方中主药, 其主要成分为苦参碱、氧化苦参碱等生物碱类成分^[8], 药理研究证明苦参碱具有抗病原体、抑制变态反应、正性肌力作用^[9], 是苦参中含量较高的活性成分之一。本实验旨在建立同时测定清肺抑火丸中盐酸小檫碱、盐酸黄柏碱、苦参碱含量的毛细管电泳法, 为更好地控制清肺抑火丸质量提供实验依据。

1 材料

CL1030 型高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司), K-2501 性紫外-可见检测器(德国 KNAUER 公司), HW-2000 型色谱工作站 2.17 版(南京千谱软件有限公司), 未涂层弹性融硅石英毛细管柱(河北锐年永洋色谱器件有限公司)。

盐酸黄柏碱对照品(上海华壹生物科技有限公司, 纯度 99.1%^[11]), 盐酸小檫碱、苦参碱、盐酸伪麻黄碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110713-200911, 110805-200508, 171237-200304), 清肺抑火丸(甘肃佛仁制药科技有限公司, 批号 20090503, 20100702, 20100901, 规格 6 g/袋), 试剂均为分析纯, 水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 内标贮备液 精密称取盐酸伪麻黄碱对照品适量, 加甲醇溶解稀释制成 152 mg·L⁻¹的内标贮备液。

2.1.2 对照品溶液 精密称取盐酸小檫碱对照品 8.1 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密称取盐酸黄柏碱对照品 5.6 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液; 精密称取苦参碱对照品 15.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈-无水乙醇(8:2)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。

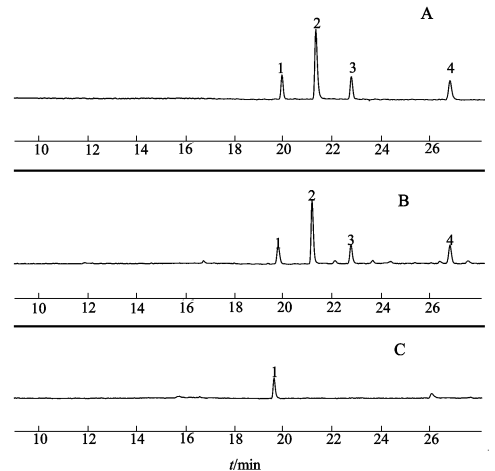
2.1.3 供试品溶液 取本品, 研碎, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加盐酸-甲醇(1:100)混合溶

液 20 mL, 密塞, 称定质量, 放置 1 h, 超声处理 60 min, 放冷, 再称定质量, 用盐酸-甲醇(1:100)补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加内标贮备液 1.0 mL, 加盐酸-甲醇(1:100)至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.1.4 阴性对照溶液 称取处方组成中除黄柏、苦参外的其他成分, 制成不含黄柏、苦参的阴性对照品, 按 2.1.3 项下方法制备, 即得。

2.1.5 运行缓冲液 精密称取磷酸二氢钠 3.9 g, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。精密移取该贮备液 20 mL 和乙醇 40 mL 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 电泳条件 毛细管柱未涂层弹性融硅石英毛细管柱(75 μm × 55 cm, 有效长度 47 cm), 运行缓冲液 100 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠 + 40% 乙醇(pH 5.75), 分离电压 23 kV, 重力进样 15 s(高度 15 cm), 检测波长 208 nm, 温度 25 °C, 湿度 < 70%。毛细管柱在使用前依次用 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液、水、运行缓冲液各冲洗约 5 min, 见图 1。



A. 对照品 + 内标; B. 供试品 + 内标;

C. 阴性溶液 + 内标; 1. 盐酸伪麻黄碱(内标物);

2. 盐酸小檫碱; 3. 苦参碱; 4. 盐酸黄柏碱

图 1 清肺抑火丸毛细管电泳色谱

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的制备 分别吸取一定量对照品贮备液, 加甲醇稀释成盐酸小檫碱质量浓度分别为 40.5, 48.6, 56.7, 64.8, 81.0 mg·L⁻¹; 盐酸黄柏碱质量浓度分别为 0.896, 1.334, 2.240, 3.136, 3.584 mg·L⁻¹; 苦参碱质量浓度分别为 6.0, 12.0, 18.0, 30.0, 36.0 mg·L⁻¹; 内标质量浓度 15.2 mg·L⁻¹的溶液; 进样,

以对照品与内标峰面积的比值为纵坐标,对照品溶液质量浓度为横坐标,分别得回归方程 $Y_{\text{盐酸小檗碱}} = 0.0554X - 0.2599$ ($r = 0.9984$), $Y_{\text{盐酸黄柏碱}} = 0.5535X - 0.067$ ($r = 0.9977$); $Y_{\text{苦参碱}} = 0.0579X - 0.0323$ ($r = 0.9990$), 线性范围依次为 $40.5 \sim 81.0, 0.896 \sim 3.584, 6.0 \sim 36.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.2 精密度试验 取质量浓度分别为 $56.7, 2.240, 18.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱对照品溶液,分别重力进样 15 s ,连续测定 5 次,记录峰面积。结果峰面积的 RSD 依次为 $0.71\%, 1.53\%, 2.62\%$,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取供试品溶液(批号 20100702)于 $0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 \text{ h}$ 分别重力进样 15 s ,记录峰面积。结果盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱峰面积的 RSD 分别为 $1.65\%, 2.54\%, 2.81\%$,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批号(批号 20100702)样品 6 份,按 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液。结果盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱平均质量分数分别为 $2.308, 0.0819, 0.725 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 依次为 $1.33\%, 1.83\%, 1.96\%$;表明本法重复性良好。

2.3.5 回收率试验 精密称取同一批号样品(批号 20100702) 6 份,每份约 0.5 g ,分别精密加入盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱对照品贮备液 $2.8, 1.8, 1.2 \text{ mL}$,按 **2.1.3** 项下方法处理,测定,计算回收率。结果盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱平均回收率分别为 $96.0\%, 100.5\%, 97.8\%$; RSD 依次为 $1.85\%, 1.50\%, 0.52\%$;表明该方法准确、可靠。

2.4 样品测定 取清肺抑火丸样品 3 批,按 **2.1.3** 项下方法处理,测定,记录峰面积,代入回归方程计算样品中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱的含量,结果见表 1。

表 1 清肺抑火丸样品测定 ($n = 3$)

批号	盐酸小檗碱		苦参碱		盐酸黄柏碱	
	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%
20090503	2.112	1.47	0.452	1.39	89.3	1.72
20100702	2.308	1.13	0.725	1.96	81.9	1.83
20100901	2.169	1.76	0.665	2.15	95.2	2.54

3 讨论

小檗碱和黄柏碱为季铵碱,苦参碱是含 N -氧化物的生物碱,两类生物碱均为极性生物碱,易溶于水、甲醇等溶剂。总生物碱的提取有酸水-有机溶剂提取法、碱化-有机溶剂提取法,常用的提取溶剂包

括盐酸-甲醇(1:100)、冰乙酸-甲醇(1:100)等。本实验考察了甲醇、盐酸-甲醇(1:100)、冰乙酸-甲醇(1:100)对提取率的影响,结果发现单独用甲醇溶剂时,小檗碱和黄柏碱提取不完全且有杂质峰干扰,而用冰乙酸-甲醇(1:100)溶剂提取,发现黄柏碱提取效率太低,用盐酸-甲醇(1:100)溶剂提取时,可兼顾 3 种生物碱提取率,故选其为提取溶剂。为使样品提取完全,超声提取前放置一定时间能使溶剂充分渗入到植物细胞内部。本实验考查了粉碎的样品在超声提取前分别放置 $0.5, 1, 1.5 \text{ h}$,结果表明放置 1 h 比放置 0.5 h 所测含量明显升高,但 1.5 h 与 1 h 比较,所测含量变化不大。另外,考察了超声不同时间($30, 40, 60, 70 \text{ min}$)对提取效率的影响,结果表明超声 60 min 内所测含量的溶出随时间的延长而增大,但 60 min 后峰面积值无明显变化,且峰形等参数不好。

对用甲醇配制的盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱溶液进行紫外扫描,测得最大吸收波长分别 $198, 205 \text{ nm}$,用乙腈-无水乙醇(8:2)配制的苦参碱对照品溶液进行紫外扫描,测得最大吸收波长 208 nm ,3 种生物碱在 $200 \sim 210 \text{ nm}$ 均有吸收,故分别考察在 $200, 202, 204, 206, 208, 210 \text{ nm}$ 处对 3 种生物碱进行同时测定,结果表明 3 种生物碱在 208 nm 波长处的峰值、峰形均较好。

本实验采用内标法定量,以克服毛细管电泳重复性差的缺点。所测物质为 3 种生物碱,根据内标物选择原则,选择与其性质相似的盐酸伪麻黄碱,结果发现其在 208 nm 处亦有吸收,并能与 3 种生物碱达到基线分离,对其他未知峰也无干扰,故选择盐酸伪麻黄碱为内标物。

根据毛细管电泳法分离原理和所测生物碱的特点,盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱在酸性溶液中可形成正离子,因此选择 $\text{pH} < 7$ 的缓冲液,经选择在磷酸盐-甲醇、磷酸盐-乙醇体系下,样品目标峰均能分离。但当使用甲醇时,峰展宽严重,柱效低,而使用乙醇时,电渗淌度小,保留时间较长,分离度高,且 3 种生物碱能达到基线分离。因此选择磷酸盐-乙醇溶液为缓冲液。在此缓冲体系基础上,考察了磷酸盐摩尔浓度在 $80 \sim 120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时样品出峰情况,同时考察了乙醇加入量($30\% \sim 60\%$)对分离的影响,最后发现当以 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液 + 40% 乙醇溶液为缓冲液,峰的各种参数达到最优。在缓冲体系确定后,考察电压在 $20 \sim 27 \text{ kV}$ 时样品分离情况,结果发现在 $20 \sim 23 \text{ kV}$,样品得到完全分

百咳静糖浆质量标准

孙小玲, 施法*

(辽宁省食品药品检验所, 沈阳 110023)

[摘要] 目的: 建立百咳静糖浆的质量控制标准。方法: 采用 TLC 对黄芩、黄柏、陈皮、麻黄进行定性分析, HPLC 测定百咳静糖浆中黄芩苷含量。结果: 百咳静糖浆供试品与对照品色谱的相应位置上, 显相同颜色斑点; Sinochrom ODS bp C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), ODS 预柱, 流动相甲醇-水-磷酸(45:55:0.04), 检测波长 315 nm, 黄芩苷在 0.08 ~ 0.4 μg 呈良好线性关系($r=0.9998$), 平均回收率 100.9% (RSD 1.7%)。结论: 该方法灵敏、准确可靠、重复性好, 可用于百咳静糖浆的质量控制。

[关键词] 百咳静糖浆; 黄芩苷; 薄层色谱法; 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)13-0116-03

[doi] 10.11653/syfyj2013130116

Quality Standard of Baikejing Syrup

SUN Xiao-ling, SHI Fa*

(Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish qualitative control standard of Baikejing syrup. **Method:** TLC was used for qualitative analysis of *Scutellaria baicalensis*, *Phellodendron chinense*, *Citrus reticulata*, *Ephedra sinica*, the content of baicalin was determined by HPLC. **Result:** Baikejing syrup for samples and reference substances showed the same color dot in corresponding chromatograph position; Sinochrom ODS bp C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and ODS pre-column were adopted with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (45:

[收稿日期] 20121224(009)

[第一作者] 孙小玲, 硕士, 从事中药质量标准研究, Tel: 024-25425645, E-mail: lynlyn88@163.com

[通讯作者] * 施法, 硕士, 主管药师, 从事中药质量标准研究, E-mail: shifa2008@163.com

离, 但出峰时间慢; 而在 24 ~ 27 kV 时, 待测样品受其他峰干扰, 无法分离。综合基线平滑度、峰展宽、分离度等考虑, 最后确定分离电压 23 kV。

[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: 1116, 286.
- [2] 卫恒巧, 李作平, 崔秀彦, 等. 薄层扫描法测定清肺抑火丸中小檗碱和菝葜皂甙元的含量[J]. 河北医科大学学报, 1992, 13(4): 199.
- [3] 黄瑞红, 杨慧文. RP-HPLC 法测定清肺抑火丸中白花前胡甲素的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2556.
- [4] 叶秀金, 宋粉云. HPLC 法测定清肺抑火丸中大黄的四种成分的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 646.

- [5] 都日娜, 乌日娜. 黄柏的研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 14(3): 75.
- [6] 徐蓉, 陈钧, 徐骅, 等. 响应面法优化黄连黄柏中总生物碱的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 26.
- [7] 柯雪红, 魏刚, 唐红梅, 等. 高效液相法测定双柏炎痛宁喷雾液及黄柏药材中盐酸小檗碱和巴马汀含量[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(3): 161.
- [8] 闵庆璐, 王巍, 鞠成国, 等. HPLC 测定丹黄祛瘀片中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 60.
- [9] 吴双, 史华, 夏时海. 氧化苦参碱药理作用的进展[J]. 武警医学院学报, 2009, 18(3): 238.

[责任编辑 全燕]