

HPLC 法测定速效止泻胶囊中盐酸小檗碱和没食子酸的含量

熊灿琼, 王义飞, 吴娟 (贵州省毕节地区药品检验所, 毕节 551700)

摘要: 建立以高效液相色谱法测定速效止泻胶囊中盐酸小檗碱和没食子酸含量测定的方法。采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 柱温: 35℃。测定盐酸小檗碱的流动相为乙腈20% 0.33mol/L²¹ 磷酸二氢钾溶液 (30 B70), 检测波长: 265nm; 测定没食子酸的流动相为 0.2% 甲醇的乙腈溶液含 0.1% 三乙胺的 0.1% 磷酸水溶液 (4 B96), 检测波长: 270nm。盐酸小檗碱在 41.482~ 311.374Lg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$, 平均回收率为 100.44%, $RSD=11.1\%$ ($n=9$)。没食子酸在 21.966~ 141.830Lg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9998$, 平均回收率为 100.23%, $RSD=11.6\%$ ($n=9$)。该方法简单、快速、准确、重现性好, 能够较好地控制该产品的质量。

关键词: HPLC; 盐酸小檗碱; 没食子酸; 速效止泻胶囊

中图分类号: R9271.2 文献标识码: A 文章编号: 100227777 (2008) 1020899204

Determination of Berberine Hydrochloride and Gallic Acid in Suxiao Zhixie Capsules by HPLC
Xiong Canqiong, Wang Yifei and Wu Juan (Guizhou, Bijie Institute For Drug Control, Bijie 551700)
ABSTRACT The method for the determination of berberine hydrochloride and gallic acid in Suxiao Zhixie Capsules was established. The separation was performed on Diamonsil C₁₈ column. The column temperature was 35℃. The mobile phase of berberine hydrochloride was acetonitrile20% 0.33mol/L²¹ potassium dihydrogen phosphate (30 B70). The detection wavelength of berberine hydrochloride was at 265nm. The mobile phase of gallic acid was acetonitrile (with 0.2% methonal) 20% 0.1% phosphoric acid (with 0.1% triethylamine) (4 B96). The detection wavelength of gallic acid was at 270nm. The linear of berberine hydrochloride was in the range of 41.482~ 311.374Lg ($r=0.9999$). The average recovery was 100.44% and RSD was 11.1% ($n=9$). The linear of gallic acid was in the range of 21.966~ 141.830Lg ($r=0.9998$). The average recovery was 100.23% and RSD was 11.6% ($n=9$). The method is convenient, rapid, economical and accurate. It can be used for quality control of Suxiao Zhixie Capsules.
KEY WORDS berberine hydrochloride; gallic acid; HPLC; Suxiao Zhixie Capsules

速效止泻胶囊由盐酸小檗碱、拳参细粉组成, 具有清热利湿, 收敛止泻的作用。用于赤痢、热泻, 肠炎等。原标准为 5 卫生部药品标准中药成方制剂 6 第十三册, 对主成分只作鉴别, 对盐酸小檗碱、拳参二组分无定量分析, 拳参中的主要成分为没食子酸。为更好地控制其质量, 笔者研究采用 HPLC 法测定了本品中盐酸小檗碱^[1~7]、拳参中没食子酸的含量^[8~10], 为本品提供了可定量的依据。

1 仪器与试药
LC210ATvp 高效液相色谱仪 (岛津), SPD210Avp 检测器。
盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 200208), 没食子酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 200302), 速效止泻胶囊 (不同的生产厂家 4 个批号: 060902、070104、20070401、070303)。乙腈为色谱纯; 甲醇、三乙

胺、磷酸二氢钾和磷酸均为分析纯。

2 实验方法

2.1 盐酸小檗碱的含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm @200mm, 5μm), 流动相: 乙腈20:0.33mol/L²¹磷酸二氢钾溶液 (30:70), 流速: 1.0mL/min²¹, 检测波长: 265nm, 理论板数按盐酸小檗碱峰计算不低于 2200, 进样量: 20μL。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取 100.0mg 干燥 5 小时的盐酸小檗碱对照品 0.2241g 置 150mL 烧杯中, 加沸水约 40mL 使溶解, 稍冷后加入稀盐酸 11.5mL, 搅匀, 转移至 100mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 作为贮备液¹。

精密量取贮备液¹ 5mL 置 50mL 量瓶中, 用

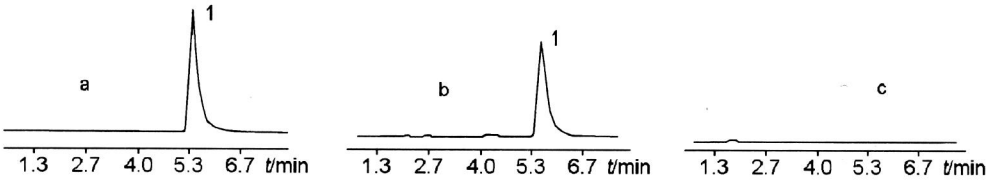
流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液⁰; 再精密量取⁰ 3mL 置 50mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

2.1.3 供试品溶液的制备

取本品 20 粒, 精密称定求得平均粒重后, 研匀, 精密称取约 0.15g 细粉, 加沸水约 100mL 使溶解, 稍冷后加入稀盐酸 3mL, 搅匀, 转移至 250mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 离心 (4000 转/分钟) 10 分钟, 精密量取上清液 3mL 置 50mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

2.1.4 空白溶液的制备

按速效止泻胶囊处方比例量取不含盐酸小檗碱的空白样品, 按上述方法制备。分别精密吸取对照品、供试品、空白溶液按上述色谱条件进样, 阴性空白溶液无干扰, 见图 1。



a 对照品; b 样品; c 阴性对照; 5.3 盐酸小檗碱。

图 1 盐酸小檗碱 HPLC 色谱图

2.1.5 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液⁰ (0.2241mg/mL²¹) 1, 2, 3, 5, 7mL, 分别置 50mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 20μL 注入液相色谱仪, 测定盐酸小檗碱峰面积, 以进样浓度 [X (μg/mL²¹)] 对峰面积 (Y) 线性回归, 得回归方程:

$Y = 1102515 \times 10^5 X - 216887 \times 10^4$ $r = 0.9999$
结果表明, 盐酸小檗碱在 41.482~311.374μg/mL²¹ 浓度范围内显示有良好的线性关系。

2.1.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 小时测定, 记录峰面积, $RSD = 1.1\%$ ($n = 5$)。结果表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

2.1.7 精密度试验

精密吸取对照品溶液, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 记录峰面积, $RSD = 0.13\%$ 。

2.1.8 重复性试验

取同一批号的样品 6 份, 按 2.1.3 制备及上述色谱条件测定, 结果盐酸小檗碱平均含量 88.02mg/g ²¹, $RSD = 11.28\%$ ($n = 6$), 表明本法

重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品 (批号: 060902, 含量 871.80mg/g ²¹) 9 份, 每份约 0.07g, 精密加入对照品贮备液¹ (2.241mg/mL^{21}) 8, 10, 12mL 各 3 份, 按供试品溶液的制备方法 & 上述色谱条件测定。计算回收率, 结果见表 1。

表 1 盐酸小檗碱回收率试验结果

样品中盐酸小檗碱含量(mg)	加入对照品(mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
22.1333	171.9280	39.9573	99.42		
22.0461	171.9280	39.7787	98.91		
22.0545	171.9280	39.8176	99.08		
21.9280	22.4100	44.3918	100.24		
21.9364	22.4100	44.5884	101.08	100.44	1.1
22.1923	22.4100	44.7637	100.72		
22.0208	261.8920	49.2328	101.19		
22.0573	261.8920	49.2102	100.97		
21.9814	261.8920	49.5027	102.34		

2.2 没食子酸的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4l 6mm @200mm, 5Lm)。流动相: 0l 2% 甲醇的乙腈溶液2含 0l 1% 三乙胺的 0l 1% 磷酸水溶液 (4 B 96); 流速: 1l 0mL# min²¹, 检测波长: 270nm; 进样量: 20LL。理论板数按没食子酸峰计算不低于 4500, 分离度为 2l 2。

2l 2l 2 对照品溶液的制备

精密称取减压干燥至恒重的没食子酸对照品 0l 0l 483g 置 100mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液适量, 超声 10 分钟使溶解, 加 50% 甲醇溶液至刻度, 摇匀, 作为贮备液。精密量取 2mL 置 25mL

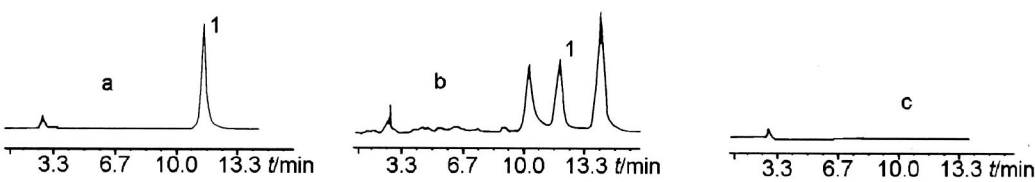
量瓶中, 用 50% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀。

2l 2l 3 供试品溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱项下的细粉 (约相当于 4 粒的细粉), 置 100mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液适量, 超声 10 分钟使溶解, 加 50% 甲醇溶液至刻度, 摇匀, 离心 (4000 转# min²¹) 10 分钟。

2l 2l 4 空白溶液的制备

按速效止泻胶囊处方比例量取不含没食子酸的空白样品, 按上述方法制备。分别精密吸取对照品、供试品、空白溶液按上述色谱条件进样, 见图 2, 阴性空白溶液无干扰。



a 对照品; bI 样品; d 阴性对照; II 没食子酸。

图 2 没食子酸 HPLC 色谱图

2l 2l 5 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液 (0l 1483mg # mL²¹) 1, 2, 3, 4, 5mL 分别置 50mL 量瓶中, 分别精密吸取 20LL 注入液相色谱仪, 测定没食子酸峰面积, 以进样浓度 [X (Lg # mL²¹)] 对峰面积 (Y) 线性回归, 得回归方程:

Y= 6l 7218 @10⁴ X- 1l 8830 @l0⁴ r= 0l 9998

结果表明, 没食子酸在 2l 966~ 14l 830Lg# mL²¹ 浓度范围内显示有良好的线性关系。

2l 2l 6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 3, 5 小时测定, 记录峰面积, RSD= 1l 9% (n= 5)。结果表明供试品溶液在 5 小时内稳定。

2l 2l 7 精密度试验

精密吸取对照品溶液, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 记录峰面积, RSD= 1l 1%。

2l 2l 8 重复性试验

取同一批号的样品 6 份, 按供试品溶液制备项制备及上述色谱条件测定, 结果没食子酸平均含量 0l 270mg # 粒²¹, RSD= 1l 86% (n= 6), 表明本法重复性良好。

2l 2l 9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品 (批号: 060902, 含量 0l 268mg # 粒²¹) 9 份, 每份约 0l 6g, 精密加入对照品贮备液 (0l 1483mg # mL²¹) 3、4、5mL 各

3 份, 按供试品溶液的制备方法及上述色谱条件测定。计算回收率, 结果见表 2。

表 2 没食子酸回收率试验结果

样品中没食子酸的含量(mg)	加入对照品(mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0l 5434	0l 4449	0l 9805	98 25		
0l 5362	0l 4449	0l 9801	99 78		
0l 5423	0l 4449	0l 9819	98 81		
0l 5426	0l 5932	1l 1495	102 31		
0l 5421	0l 5932	1l 1298	99 07	100 23	1l 6
0l 5410	0l 5932	1l 1394	100 88		
0l 5404	0l 7415	1l 2965	101 97		
0l 5419	0l 7415	1l 2742	98 76		
0l 5430	0l 7415	1l 3009	102 21		

2l 3 样品测定

取 4 批样品分别按上述方法制备及色谱条件测定, 以外标峰面积法计算含量, 结果见表 3。

表 3 速效止泻胶囊中盐酸小檗碱和没食子酸的含量

样品批号	盐酸小檗碱	没食子酸
060902	87 80	0l 268
070104	82 14	0l 265
20070401	102 67	0l 136
070303	94 40	0l 234

3 讨论

3l 1 流动相比比例的选择 (下转第 912 页)

$$(01\ 0002974^2 + 01\ 004659^2)^{1/2} = 01\ 004668$$

3l 5 合成相对不确定度

$$u_{rel}(R) = [u_{rel}^2(Y) + u_{rel}^2(a) + u_{rel}^2(b) + u_{rel}^2(d)]^{1/2}$$
$$= (01\ 008206^2 + 01\ 018911^2 + 01\ 010426^2 + 01\ 004668^2)^{1/2}$$
$$= 01\ 023568$$

由于 $u_{rel}(R) = u(R)/R$

所以 $u(R) = u_{rel}(R) @ R = 01\ 023568 @ 42\%$
 $(v/v) = 01\ 9898\% (v/v)$

3l 6 扩展不确定度

取 $K=2$, 置信水平为 95%
 $U(R) = u(R) @ k = 01\ 9898\% (v/v) @ 2 =$
 $11\ 9796\% (v/v) \ U 2\% (v/v)$

4 测量结果的报告

本次乙醇含量测定结果为 $[42\% (v/v) \pm 2\%$
 $(v/v)] (P=95\%, k=2)$

5 讨论

在测量结果的完整表述中，测量不确定度是不能缺少的。分析结果的可靠性和准确性直接关系到药品的质量，不确定度采用了统计学的方法给出了结果数据的分散性和置信水平。不确定度越小，测量结果的可信程度越高，使用的价值也越大。从上述各分量不确定度可以看出，标准曲线 a 与 b 带入

的不确定度最大，所以良好的线性是减少实验结果不确定度的主要因素。同时，具有良好的实验环境、实验人员具有熟练的操作技能、仪器设备和实验器具等都处于严格的管理、对照品的纯度保证也是减少不确定度的关键因素。

按照 5 中国药典6 2005 版一部气相色谱法测定冯了性风湿跌打药酒乙醇量，测定结果的扩展不确定度为 2% (v/v)，包含因子 $k=2$ ，测定结果表示为 $[42\% (v/v) \pm 2\% (v/v)]$ 。

参考文献:

[1] 中国药典 [S] 1 一部, 2005: 40l

[2] 潘振球1 气相色谱法测定结果不确定度有关问题的分析 [J] 1 中国卫生检验杂志, 2003, 13 (6): 77ll

[3] 中国合格评定国家认可委员会 1CNASGL06: 2006 5 化学分析中不确定度的评估指南6 [S]. 2006l

[4] 李慎安, 施昌彦, 刘凤 1 5 测量不确定度评定和表示6 [S] 1 JJF10521999, 1999l

[5] 施昌彦, 刘凤 1 测量不确定度评定与表示指南 [M] 1 北京: 中国计量出版社, 2003l

[6] 杨桂菊 1 气相色谱法测定食品中苯甲酸的不确定度评定 [J] 1 中国酿造, 2004, 2 (133): 34l

[7] 常用玻璃量器检定规程 [S] 1 JJG1921990, 1990l

[8] 王宇成 1 最新色谱分析检测方法及应用技术实用手册 [M]. 吉林: 吉林省出版发行集团, 2004l

(上接第 901 页)

经查阅相关资料及试验研究，速效止泻胶囊中盐酸小檗碱和5 中国药典6 2005 版一部复方黄连素片中盐酸小檗碱都直接投料，曾采用复方黄连素片中的色谱条件，出峰时间为 2l 1 分钟，经反复调整流动相比例，在乙腈20l 033mol# L²¹ 磷酸二氢钾溶液比例为 (30 B 70) 时，出峰时间为 5l 5 分钟，峰形较好，且该检测条件下无杂峰。

3l 2 检测波长的选择

将没食子酸对照品溶液进行 UV 光谱扫描，其最大吸收波长为 220nm 和 270nm，因 220nm 靠近 UV 末端吸收，干扰较 270nm 处大。所以采用 270nm 为没食子酸的测定波长。

经测定 4 个生产厂家不同批号的产品，结果个别厂家的产品，盐酸小檗碱含量较高而没食子酸的含量却较低；有的盐酸小檗碱含量只有标示量 86%，没有一个厂家的含量达标示量 90%。而现行标准只有定性鉴别，对盐酸小檗碱、拳参二组分无定量分析。本文增加两个主要成分的含量测定，大大提高了质量可控性。

参考文献:

[1] 中国药典 [S] 1 一部, 2005: 534l

[2] 于玲, 王晓飞 1 高效液相色谱法测定肾舒颗粒中盐酸小檗碱的含量 [J] 1 中国药师, 2007, 10 (10): 996l

[3] 贾越光, 柳燕 1 高效液相色谱法测定清热解毒颗粒中盐酸小檗碱的含量 [J] 1 中国药业, 2007, 16 (15): 27l

[4] 陈永红, 陈珊珊 1 反高效液相色谱法测定前列舒通片中盐酸小檗碱的含量 [J] 1 中国药业, 2007, 16 (11): 24l

[5] 邵家德, 周琴妹, 汤丽霞, 等 1 HPLC 法测定滋肾通关胶囊中小檗碱含量 [J] 1 中国药事, 2006, 20 (9): 557l

[6] 赵沈娟, 黄新兰, 刘婷 1 RP2HPLC 法测定华铃胃痛颗粒中盐酸小檗碱的含量 [J] 1 中国药事, 2006, 20 (11): 682l

[7] 赵吉平, 徐锋, 彭先庆 1 高效液相色谱法测定香连丸中盐酸小檗碱的含量 [J] 1 中国药事, 2006, 20 (11): 695l

[8] 黄毅, 康爱荣 1 高效液相色谱法测定妇康阴道泡腾片中没食子酸和盐酸小檗碱的含量 [J] 1 时珍国医国药, 2005, 122 (16): 1095l

[9] 霍文, 刘占军 1 反高效液相色谱法测定石榴皮中没食子酸的含量 [J] 1 西北药学杂志, 2007, 22 (5): 242l

[10] 曾彩芳, 肖佳尚 1 高效液相色谱法测地榆根中没食子酸的含量 [J] 1 中国药业, 2007, 16 (13): 15l