

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.01.08

# 苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱含量测定研究

杨会鲜, 姚路路, 周冰, 张聪, 周德刚

(洛阳惠中兽药有限公司, 洛阳 471000)

[收稿日期] 2019-09-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)01-0041-05 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 建立并验证了苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱的含量测定方法。采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液; 检测波长为 265 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C。试验结果表明盐酸小檗碱在 4.9 ~ 78.6 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系 ( $r = 1$ ), 加样回收率在 101.38% ~ 103.74% 之间, 平均回收率为 102.7%,  $RSD = 0.8%$  ( $\leq 2.0%$ )。所建立的方法简便、准确度高、专属性强, 可用于苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱的含量测定。

**[关键词]** 苦参功劳颗粒; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法; 含量; 十大功劳

## Determination of Berberine Hydrochloride in Kushen Gonglao Granules

YANG Hui-xian, YAO Lu-lu, ZHOU Bing, ZHANG Cong, ZHOU De-gang

(Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd, Luoyang 471000, China)

**Abstract:** A method for determining the content of berberine hydrochloride in Kushen Gonglao Granules was established and verified. Using high performance liquid chromatography, the column was Agilent Zorbax SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase was acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer; the detection wavelength was 265 nm; the flow rate was 1.0 mL/min; column temperature is 30 °C. The results showed that the berberine hydrochloride injection concentration ranged from 4.9 to 78.6 μg · mL<sup>-1</sup>, and the peak area showed a good linear relationship ( $r = 1$ ). The recovery test was between 101.38% and 103.74%. The recovery test was 102.7%, and  $RSD$  was 0.8% ( $\leq 2.0%$ ). The established method is simple, accurate and specific, and can be used for the determination of berberine hydrochloride in Kushen Gonglao Granule.

**Key words:** Kushen Gonglao Granule; berberine hydrochloride; HPLC; content; mahoniae folium

苦参功劳颗粒为国家三类新兽药, 由十大功劳、苦参、木香组成, 具有清热燥湿、止痢、行气健脾之功效, 主治湿热泻痢, 鸡大肠杆菌病。

十大功劳为本方的君药, 属小檗科十大功劳植物。研究报道十大功劳叶含小檗碱、掌叶防己碱、药根碱、四氢药根碱和木兰碱等生物碱, 具有抗菌、

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划“中兽药现代化技术研究与开发”(2008BADB4B00)

作者简介: 杨会鲜, 从事新兽药质量标准研究工作。E-mail: yanghuijian001@126.com

抗病毒、抗炎、抗肿瘤以及杀虫之功效<sup>[1-5]</sup>。目前研究最多的是十大功劳的抗菌作用。Cernakova 等<sup>[6]</sup>发现从十大功劳中分离得到的小檗碱对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌等 17 种细菌也具有抑制作用。

盐酸小檗碱为十大功劳的特征性有效成分,十大功劳为本方的君药,故选择盐酸小檗碱作为本品质量控制的指标成分。本文对苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱含量测定方法进行了研究,建立了苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱含量的测定方法,用于苦参功劳颗粒质量控制。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 Waters e2695 高效液相色谱仪,配 2489 型紫外检测器,美国 Waters 公司;KQ-500 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司,AB135-S 型电子分析天平,瑞士梅特勒托利多公司;乙腈、甲醇、磷酸, HPLC 级,磷酸二氢钾为分析纯;水为超纯水。

1.2 试药 盐酸小檗碱对照品(中国兽医药品监察所,批号:Z0221206,含量:94.5%)、苦参功劳颗粒(洛阳惠中兽药有限公司,批号:20140401,20140402,20140403,规格:每 1 g 相当于原生药 3 g)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱:Agilent

Zorbax SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(30:70);柱温:30 ℃;检测波长:265 nm;进样量:10 μL。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 5000。

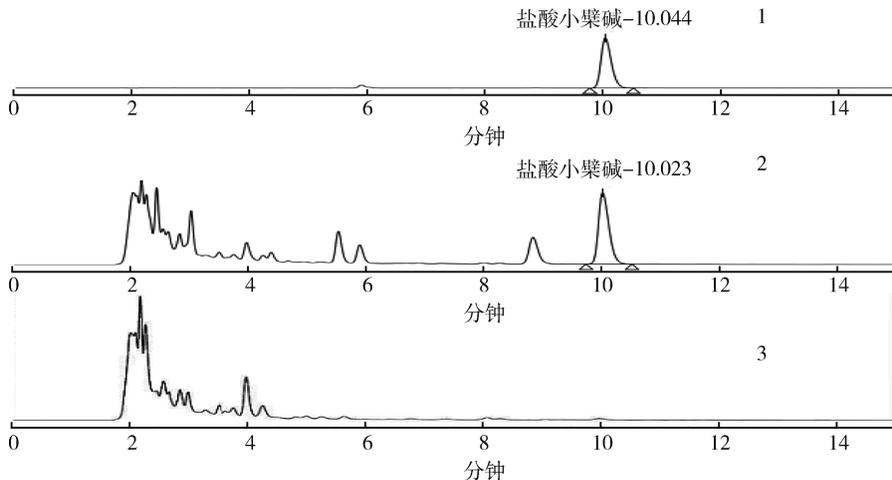
### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加乙腈-水(3:7)制成每 1 mL 含 0.02 mg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品研细后的细粉约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加乙腈-水(3:7) 35 mL,超声处理(功率 150 W,频率 25 kHz) 10 min,放冷,加乙腈-水(3:7)定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方制备缺十大功劳的阴性对照样品,按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 分别取 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图(图 1)。从图中可见,供试品与对照品色谱中,盐酸小檗碱峰保留时间一致,阴性对照在盐酸小檗碱相应保留时间处无干扰峰,含量测定方法专属性良好。



1. 盐酸小檗碱对照品 2. 供试品 3. 阴性对照

1. Reference Substance of Berberine Hydrochloride 2. Test sample 3. negative control

图 1 专属性考察色谱图

Fig 1 The chromatogram of Specific inspection

2.4 线性试验 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加乙腈-水(3:7)制成  $196.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液,依次稀释成浓度为  $78.6$ 、 $39.3$ 、 $19.7$ 、 $9.8$ 、 $4.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液,精密吸取  $10 \mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,记录色谱图峰面积,以峰面积  $Y$  为纵坐标,盐酸小檗碱浓度  $X$  为横坐标,绘制标准曲线。回归方程为:  $Y = 41037X - 1794.7 (r = 1)$ 。表明盐酸小檗碱在  $4.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 78.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的范围内,峰面积与浓度线性关系良好。结果见表 1 和图 2。

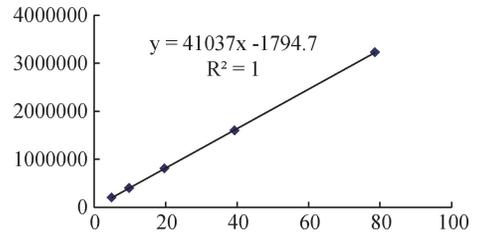


图 2 盐酸小檗碱含量测定标准曲线

Fig 2 Standard curve for determination of berberine hydrochloride

表 1 线性关系试验结果

Tab 1 Linear relationship test results					
编号	1	2	3	4	5
浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	4.9	9.8	19.7	39.3	78.6
峰面积	204230	399201	808522	1600939	3228128

2.5 精密度试验 取专属性考察项下对照品溶液,按上述色谱条件精密吸取  $10 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪,连续进样 6 针,记录色谱图峰面积,结果  $RSD = 0.4\%$ ,表明仪器精密度良好。结果见表 2。

表 2 进样精密度试验结果

Tab 2 Injection precision test results								
编号	1	2	3	4	5	6	均值	RSD/%
峰面积	820406	821898	825218	825892	824765	818525	822784	0.4

2.6 重复性试验 取苦参功劳颗粒(批号 20140401),按照“2.2.2”项制备供试品溶液,分别制备 6 份,精密吸取  $10 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪,记录

色谱峰面积,结果  $RSD$  为  $0.3\%$ ,表明本方法重复性良好。结果见表 3。

表 3 重复性试验结果

Tab 3 Repeatability test results								
编号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	2.84	2.83	2.82	2.82	2.84	2.83	2.8	0.3

2.7 溶液稳定性试验 取苦参功劳颗粒(批号 20140401),按照“2.2.2”项制备供试品溶液,分别

于 0、2、4、8、12、24 h 测定峰面积,结果  $RSD$  为  $1.1\%$ ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定,见表 4。

表 4 稳定性试验结果

Tab 4 Stability test results								
时间/h	0	2	4	8	12	24	均值	RSD/%
峰面积	1168338	1187530	1198652	1199368	1200534	1203050	1192912	1.1

2.8 加样回收率试验 取已知含量的苦参功劳颗粒(批号 20140401)6 份,每份约  $0.25 \text{g}$ ,精密称定,

置  $50 \text{mL}$  量瓶中,各精密加入  $0.1966 \text{mg/mL}$  的对照品溶液  $3 \text{mL}$ ,按照“2.2.2”项制备供试品溶液,

按拟定的含量测定方法,精密吸取 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,记录色谱图,测定样品含量并计算回收率,结果见表 5,加样回收率在 101.38% ~ 103.74% 之

间,平均值为 102.7%,*RSD* 为 0.8%,表明方法准确度良好。

表 5 回收率试验结果

Tab 5 The results of recovery test

编号	样品称量/g	盐酸小檗碱含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	均值/%	<i>RSD</i> /%
1	0.25413	0.7116	0.5898	1.3139	102.12	102.7	0.8
2	0.25104	0.7029	0.5898	1.3101	102.95		
3	0.25713	0.7200	0.5898	1.3179	101.38		
4	0.25478	0.7134	0.5898	1.3208	102.99		
5	0.25316	0.7088	0.5898	1.3158	102.91		
6	0.25372	0.7104	0.5898	1.3223	103.74		

2.9 耐用性试验 取苦参功劳颗粒(批号:20140401),按照“2.2.2”项制备供试品溶液,当柱温、流速发生微小变化以及使用不同型号的色谱柱,分别测定样品的峰面积,精密吸取 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见表 6。结果表明,当柱温、流速发生微小变化以及使用其他型号的色谱柱时,对含量测定结果基本无影响,表明方法耐用性良好。

表 6 耐用性试验结果

Tab 6 The results of durability test

变化项目	变化情况	保留时间 /min	分离度	含量 /( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
流动相比例	25:75	13.392	3.8	2.80
	30:70	9.021	3.7	2.82
	35:65	7.833	3.5	2.79
柱温/ $^{\circ}\text{C}$	25	9.059	3.7	2.84
	30	9.021	3.7	2.82
	35	8.570	3.0	2.83
流速 /( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0.8	11.256	3.8	2.80
	1.0	9.021	3.7	2.82
	1.2	7.560	3.5	2.82
色谱柱变化	Xbridge C18	5.460	1.7	2.73
	Zorbax SB-C18	9.021	3.7	2.82
	Kromasil C18	10.162	4.4	2.80
pH 值变化	2.8	8.855	3.6	2.79
	3.0	9.021	3.7	2.82
	3.2	9.818	3.7	2.79

2.10 三批样品含量测定 取苦参功劳颗粒样品(20140401,20140402,20140403),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱的含量,三批样品测定结果见表 7。

表 7 样品含量测定结果

Tab 7 The results of sample content determination

批号	含量/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
20140401	2.8
20140402	2.5
20140403	2.7

### 3 讨论与结论

3.1 苦参功劳颗粒含量测定方法选择 《中国兽药典》2010 年版二部十大功劳标准中未规定盐酸小檗碱含量测定,文献有不同产地十大功劳含量测定方法报道<sup>[7-9]</sup>,但并未有苦参功劳颗粒中十大功劳所含盐酸小檗碱含量测定方法。参考《中国兽药典》2010 年版功劳木药材中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀含量测定方法,建立了苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱含量测定。

3.2 色谱条件的考察 参照《中国兽药典》2010 年版二部功劳木药材中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀含量测定方法,确定流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液。通过不同流动相比例、柱温、流

速、不同色谱柱及 pH 值的耐用性考察,从各因素保留时间和分离度可以看出,柱温、pH 值对盐酸小檗碱的色谱行为影响较小,流动相比例、流速对盐酸小檗碱的保留时间影响较大,色谱柱型号变化对盐酸小檗碱的色谱行为影响较大,但分离度均符合要求,且对含量测定结果无显著影响,说明方法耐用性良好。

**3.3 结论** 通过专属性、线性、精密度、重复性、稳定性、加样回收率、耐用性的方法验证,结果表明苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱含量测定以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(30:70)为流动相,检测波长为 265 nm,流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 °C,色谱柱 Agilent Zorbax SB-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)的色谱条件,专属性强、准确度高、耐用性好,操作简单,可用于苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱的含量控制。

#### 参考文献:

- [1] 王筠默. 中药十大功劳的研究[J]. 中医药研究, 2002, 18(5): 45.  
Wang Y M. Study on Mahonia of traditional Chinese medicine [J]. Research of Traditional Chinese Medicine, 2002, 18(5): 45.
- [2] Stermitz F R, Lorenz P, Tawara J N, *et al.* Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000, 97(4):1433-1437.
- [3] 张明发, 沈雅琴, 汤臣康. 小檗碱的消炎镇痛作用[J]. 天然

产物研究与开发, 1990, (1):49-53.

Zhang M F, Shen Y Q, Tang C K. Anti-inflammatory and analgesic actions of berberine[J]. Natural Product Research and Development, 1990, (1): 49~53.

- [4] Ivanovska N, Philipov S. Study on the anti-inflammatory action of Berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids [J]. International Journal of Immunopharmacology, 1996, 18(10): 553-561.
- [5] Yasukawa K, Takido M, Ikekawa T, *et al.* Relative inhibitory activity of berberine-type alkaloids against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1991, 39(6): 1462-1465.
- [6] Cernáková M, Kostálová D. Antimicrobial activity of berberine-a constituent of Mahonia aquifolium[J]. Folia Microbiologica, 2002, 47(4): 375-378.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版二部[S]. Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese veterinary pharmacopoeia[S], 2010(2).
- [8] 郝洁, 张聪, 李焕娟, 等. 不同产地十大功劳中盐酸小檗碱含量的测定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, (8):163-165.  
Hao J, Zhang C, Li H J, *et al.* Determination of berberine hydrochloride in Mahonia from different habitats[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, (8): 163-165.
- [9] 杨昌贵, 肖承鸿, 江维克等. 十大功劳叶药材的质量标准提高研究[J]. 中国药房, 2018, 29(4): 470-473.  
Yang C G, Xiao C H, Jiang W K, *et al.* Study on the improvement of quality standard for Folium Mahoniae[J]. China Pharmacy, 2018, 29(4): 470-473.

(编辑:陈希)