

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.06

高效液相色谱法测定微球中硫酸小檗碱的含量

朱庆贺, 王丽坤, 张艳, 杨旭东, 王爽, 陈曦, 王观悦, 穆永才, 罗天瑶, 史同瑞*

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2019-11-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)02-0034-05 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了测定微球中硫酸小檗碱含量的高效液相色谱法(HPLC)。采用 C18 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(45:55)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 349 nm, 进样量 5 μL, 柱温 30 ℃。硫酸小檗碱浓度在 0.098 ~ 49.00 μg/mL 时, 其峰面积与浓度线性关系良好($R^2 = 0.9991$), 无杂质干扰, 稳定性高, 平均回收率为 98.98%。本操作方法简便, 分析快速, 结果准确, 适用于微球中硫酸小檗碱的含量测定。

[关键词] 硫酸小檗碱; 微球; 高效液相色谱法; 含量

Content Determination of Berberine Sulfuric in Microspheres by HPLC

ZHU Qing-he, WANG Li-kun, ZHANG Yan, YANG Xu-dong, WANG Shuang, CHEN Xi,
WANG Guan-yue, MU Yong-cai, LUO Tian-yao, SHI Tong-rui*

(Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heilongjiang, Qiqihar 161005, China)

Corresponding author: SHI Tong-rui, E-mail: systr@sing.com

Abstract: A method for the content determination of berberine sulfuric in microspheres by HPLC was established. HPLC system consisted of C18 column(5 μm 4.6 × 250 mm), methyl alcohol-water(45:55) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wave length was 349 nm. The injection volume was 5 μL and column temperature was 30 ℃. There was no interference occurred from impurities. The calibration curve was linear in the range of 0.098 ~ 49.00 μg/mL($R^2 = 0.9991$). The average recovery was 98.98%. The method is rapid, simple and accurate for the content determination of berberine sulfuric suspo-emulsions.

Key words: berberine sulfuric; microspheres; HPLC; content

硫酸小檗碱(Berberine Sulfate)是由含有小檗碱的植物中提取的一种生物碱,在黄连、黄柏、三颗针等植物中含量丰富。硫酸小檗碱具有清热解毒、

抗感染等功效^[1],与甲氧苄胺及抗菌肽等合用对大肠杆菌等细菌有协同作用^[2-4],有研究表明硫酸小檗碱对猪轮状病毒有一定抑制作用^[5],兽医临床中

基金项目:黑龙江科研机构创新能力提升专项“兽药新药新品种开发”(YC2016D004)

作者简介:朱庆贺,助理研究员,硕士研究生,从事兽药研究。

通讯作者:史同瑞, E-mail: systr@sina.com

常用于动物细菌性肠炎、各种化脓性感染的治疗。载药体系微球制剂具有高效无毒、释药速率恒定以及粒径可控的优点^[6],黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院兽药研究室结合硫酸小檗碱及微球特性制备了硫酸小檗碱微球制剂,为进一步进行硫酸小檗碱含量检测需要,建立了微球中硫酸小檗碱含量的高效液相色谱检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂 硫酸小檗碱标准品(含量 98.0%,中国食品药品检定研究院);硫酸小檗碱微球制剂(规格:2%,自制);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);无水乙醇(分析纯,天津市百世化工有限公司)。

1.1.2 仪器 电子分析天平,MS104TS/02 型,梅特勒-托利多(上海)有限公司;高效液相色谱仪,LC-20AT SPD-20A,SHIMADZU;纯水仪,XYE2-20-H 型,北京湘顺源科技有限公司;实验室 pH 计,FE20 型,梅特勒-托利多(上海)有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:C18(250 mm × 4.6 mm,5 μm);柱温:30 ℃;流速:1 mL/min;检测波长 349 nm;检测器:SPD-20A;进样量 5 μL;流动相:乙腈:水(45:55)。

1.2.2 溶 液 制 备

1.2.2.1 对照品溶液 精密称取经 105 ℃干燥至恒重的硫酸小檗碱对照品 10 mg,置 100 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成 98 μg/mL 的对照品储备液。精密量取对照品储备液 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液作为对照品溶液。

1.2.2.2 供试品溶液 按照配方比例制备硫酸小檗碱微球制剂,精密取样品适量(相当于硫酸小檗碱 10 mg),置 100 mL 容量瓶中,加流动相充分溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取此液 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液作为供试品溶液。

1.2.2.3 阴性对照品溶液 按配方比例量取与供

试品溶液相当的基质溶液(与硫酸小檗碱微球制剂相比只是不含硫酸小檗碱,其他成分相同)适量,按照供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

1.2.3 系统专属性考察 分别取硫酸小檗碱对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按 1.2.1 项色谱条件进样测定。

1.2.4 方法检测限与定量限 取供试品溶液加流动相稀释,分别配制成 0.001,0.002,0.004,0.008 和 0.016 μg/mL 浓度的检测样品溶液,按 1.2.1 项下色谱条件进样测定。测得基线噪音值,按信噪比 $S/N \geq 3$ 确定方法的检测限(LOD),按信噪比 $S/N \geq 10$ 确定方法的定量限(LOQ)。

1.2.5 线性试验 精密量取对照品储备液适量,分别置 10 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,配置成浓度分别为 0.098、0.98、4.90、24.50、49.00 μg/mL 的系列对照品溶液。按 1.2.1 项色谱条件进样测定,以峰面积(y)对硫酸小檗碱的浓度(x ,μg/mL)进行线性回归方程。

1.2.6 回收率测定 取 1.2.2 项下制备的储备液,分别精密量取适量并添加配方剂量的空白基质,用流动相稀释成低($L = 0.98 \mu\text{g/mL}$)、中($M = 24.50 \mu\text{g/mL}$)、高($H = 49.00 \mu\text{g/mL}$)3 种理论浓度的对照品,每个浓度配制 3 份,按 1.2.1 项色谱条件进样测定,并利用外标法计算其含量。

1.2.7 精密度试验 取 1.2.2 项制备的储备液适量,用流动相稀释成 24.50 μg/mL 的标准溶液,按 1.2.1 项色谱条件重复进样 6 次,分别测定其峰面积。

1.2.8 稳定性试验 取 1.2.2 项制备的储备液适量,用流动相稀释成 24.50 μg/mL 的标准溶液,按 1.2.1 项色谱条件分别于 0、2、4、8、10、12 h 测定其峰面积。

1.2.9 样品含量测定 精密量取批号为 20151101、20160125、20170607 的 3 批次的硫酸小檗碱微球样品适量,每批次 3 份,按 1.2.2 项制成供试品溶液,分别进行含量测定。

2 结果与分析

2.1 系统专属性考察 分别取硫酸小檗碱对照品

溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按 1.2.1 项色谱条件测定,结果见图 1。在该色谱条件下,硫酸小檗碱的保留时间 k 为 26.9 min 左右,阴性对照在此时间附近没有出峰,因此,对硫酸小檗碱 HPLC 的测定没有影响,专属性能满足检测要求。

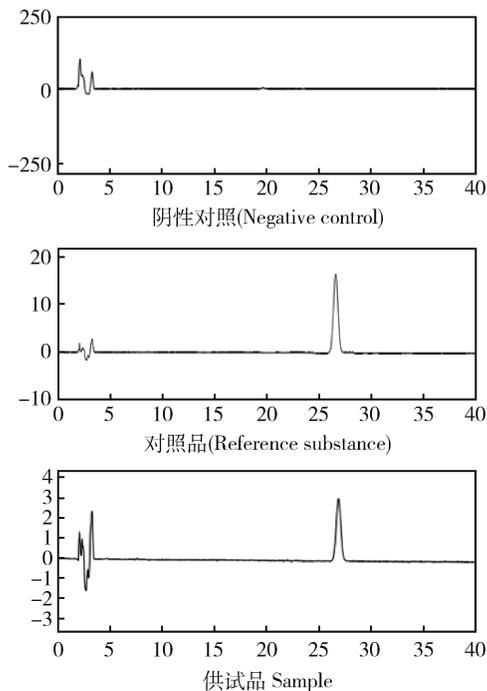


图 1 HPLC 图

Fig 1 The HPLC chromatogram

2.2 方法检测限、定量限的确定 按信噪比 $S/N \geq 3$ 确定检测限 (LOD),按信噪比 $S/N \geq 10$ 确定其定量限 (LOQ)。经测定,本方法对硫酸小檗碱微

球制剂中硫酸小檗碱的 LOD 为 $0.001 \mu\text{g/mL}$,LOQ 为 $0.002 \mu\text{g/mL}$ 。

2.3 线性试验 配制 $0.098, 0.98, 4.90, 24.50, 49.00 \mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,分别按 1.2.1 项色谱条件进样测定,以峰面积 (y) 对硫酸小檗碱的浓度 ($x, \mu\text{g/mL}$) 进行线性回归方程,得回归方程为 $y = 64832x + 47399, R^2 = 0.9991$ 。结果表明硫酸小檗碱在 $0.098 \sim 49.00 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好 (图 2)。

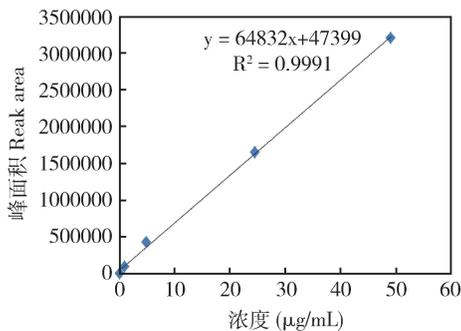


图 2 硫酸小檗碱标准曲线

Fig 2 The standard curve of Berberine sulfuric

2.4 回收率测定 分别测定低 ($L = 0.98 \mu\text{g/mL}$)、中 ($M = 24.50 \mu\text{g/mL}$)、高 ($H = 49.00 \mu\text{g/mL}$) 3 种理论浓度的对照品溶液的峰面积,并计算其实测浓度,结果表明高、中、低浓度对照品溶液中硫酸小檗碱的平均回收率为 98.98% ,该方法回收率符合要求 (表 1)。

表 1 硫酸小檗碱的回收率

Tab 1 Recovery rate of Berberine sulfuric

编号	理论浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	实测浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
L1		0.9408	96.0		
L2	0.98	0.9604	98.0		
L3		0.9604	98.0		
M1		24.33	99.3		
M2	24.50	24.45	99.8	1.33	98.98
M3		24.01	98.0		
H1		48.85	99.7		
H2	49.00	49.64	101.3		
H3		48.85	99.7		

2.5 精密度试验 制备得 24.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,按 1.2.1 项色谱条件重复进样 6 次,测定其峰面积分别为 1849872、1796579、1846351、1860479、1851674、1847562。计算 RSD 为 1.24%,表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 制备得 24.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,按 1.2.1 项色谱条件分别于 0、2、4、8、10、12 h 测定其峰面积分别为 1849852、1896754、1846851、1861456、1844598、1857562,平均峰面积为 1859512, RSD 为 1.04%,表明样品在 12 h 内含量稳定。

2.7 样品含量测定 批号为 20151101、20160125、20170607 的 3 批样品中硫酸小檗碱平均含量分别为标示量的 98.18%、101.41%、103.29%,符合规定。

3 讨论与结论

3.1 色谱条件 应用二级阵列检测器对对照品溶液在 200~400 nm 波长范围内进行扫描得知,硫酸小檗碱标准品溶液在 229、349 nm 处有最大吸收峰,另外,参考文献报道^[7-9]得知,小檗碱在 349 nm 为常用紫外测定波长。因此,选择 349 nm 波长下测定硫酸小檗碱微球制剂中硫酸小檗碱的含量。通过色谱结果的比较分析,在 349 nm 波长下测定,能够获得最大的灵敏度和抗干扰能力,本试验中选择 349 nm 作为硫酸小檗碱含量的检测波长。试验中比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-磷酸二氢钾溶液作为流动相的分离效果,结果表明,乙腈-水在经过比例调试(45:55)后分离效果最好,分离得到的硫酸小檗碱峰型良好,无拖尾现象,分离度大,因此,选择乙腈-水(45:55)为检测流动相。

3.2 小檗碱的含量检测方法 小檗碱的主要成盐形式包括盐酸盐和硫酸盐,盐酸小檗碱作为临床中常用中药成分,研究较多。而硫酸小檗碱在兽医临床领域,尤其是制剂含量检测方面文献较少。因此,建立硫酸小檗碱的含量检测方法对于硫酸小檗碱的药物规范化应用具有重要意义。李华琴^[10]等首先利用分光光度计法建立了注射液中硫酸小檗

碱含量检测方法,该方法适用于企业进行产品的质量控制。之后又利用 HPLC 建立了注射液中硫酸小檗碱的含量检测方法,但由于未购得硫酸小檗碱标准品,所以用盐酸小檗碱标准品进行代替^[7]。本研究因剂型优化,制备了硫酸小檗碱微球制剂,但尚无微球制剂中硫酸小檗碱的含量检测方法,因此,本试验利用 HPLC 建立了微球中硫酸小檗碱的含量检测方法,为以后硫酸小檗碱微球制剂的含量检测提供技术支持。

本实验室成功研制了硫酸小檗碱微球制剂,兼具了硫酸小檗碱和微球制剂的共同优点,是兽医临床中一种良好的长效缓释剂型^[6]。为了这一新剂型的更好应用,建立了硫酸小檗碱的 HPLC 检测方法,本方法分离度好,硫酸小檗碱的保留时间在 26.9 min 左右,峰形好,基本无拖尾,杂质不干扰实验测定,而且采用外标法测定硫酸小檗碱微球的含量操作简单,结果准确,回收率高,重现性好,可以为微球中硫酸小檗碱含量的检测提供参考。

参考文献:

- [1] 张瑞芬,苏和. 黄连的药理研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2010,29(3):114-117.
Zhang R F, Su H. The pharmacological research of coptis[J]. Inner Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 29(3):114-117.
- [2] 左茹,曹雪滨,张文生. 黄连素药理作用研究进展[J]. 环球中医药, 2014,7(7):568-572.
Zuo R, Cao X B, Zhang W S. The progress of berberine's pharmacological effects[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2014, 7(7):568-572.
- [3] Wang N, Tan H Y, Li L, et al. Berberine and coptidis Rhizoma as potential anticancer reagents: Recent updates and future perspectives[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 176:35-48.
- [4] 范学政,马健,陶庆树,等. P10B 抗菌肽和硫酸小檗碱对肉鸡源大肠杆菌的体外联合抗菌作用研究[J]. 中国兽药杂志, 2018,52(9):22-26.
Fan X Z, Ma J, Tao Q S, et al. Research on the Antibacterial Effects of Berberine Sulfate Combined with Antibacterial Peptide P10B against *Escherichia coli* from Broilers *in vitro*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(9):22-26.
- [5] 徐环叶,李姝玲,陈立功,等. 硫酸小檗碱对猪轮状病毒感染

- 的 IPEC - J2 中 TGF - β_1 、EGFR、EGF、IGF₁ mRNA 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(10): 2283 - 2291.
- Xu H Y, Li S L, Chen L G, *et al.* Berberine Sulfate Affects TGF - β_1 、EGFR、EGF、IGF₁ mRNA Expression in Rotavirus - infected IPEC - J2[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2018, 49(10): 2283 - 2291.
- [6] 何广宏, 万丹丹, 董 然. 长效微球注射剂的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(10): 963 - 966.
- He G H, Wan D D, Dong R. Advances in studies on microsphere for long - acting injections [J]. Chin Hosp Pharm J, 2015, 35(10): 963 - 966.
- [7] 李华岑, 刘素梅, 臧合英, 等. 高效液相色谱法测定硫酸小檗碱注射液的含量[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(10): 31 - 33.
- Li H C, Liu S M, Zang H Y, *et al.* Determination of Berberine Sulfate Injection by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(10): 31 - 33.
- [8] 马永贵, 谢 委, 方建国, 等. 高效液相色谱法测定洁泽洗液中盐酸小檗碱的含量[J]. 医药导报, 2011, 30(11): 1484 - 1486.
- Ma Y G, Xie W, Fnag J G, *et al.* Determination of Berberine Hydrochloride in Jieze Lotion by HPLC[J]. Herald of Medicine, 2011, 30(11): 1484 - 1486.
- [9] 张盈娇, 夏 陈, 陈 建, 等. 兽药三黄散超微粉中黄芩苷和盐酸小檗碱含量的高效液相色谱法测定[J]. 现代农业科技, 2015, 18: 266 - 269.
- Zhang Y J, Xia C, Chen J, *et al.* Simultaneous Determination of Baicalin and Berberine Hydrochloride in Sanhuang San for Animals by HPLC[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015, 18: 266 - 269.
- [10] 李华岑, 刘素梅, 韩 立, 等. 分光光度计法测定硫酸小檗碱注射液[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(1): 40 - 41.
- Li H Q, Liu S M, H L, *et al.* Spectrophotometric Determination of Berberine Sulfate Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(1): 40 - 41.

(编辑: 侯向辉)