

高效液相色谱法测定黄连配方颗粒中生物碱的含量

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定黄连配方颗粒中生物碱(表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱)的含量。色谱条件: C_{18} 4.6×250mm, 5 μ m, 流速为 1.0mL/min, 柱温为 30°C, 进样量为 10 μ L, 检测波长为 345nm。实验结果: 生物碱中的盐酸小檗碱在测定浓度范围内具有良好的线性关系 ($R^2=0.9995$); 盐酸小檗碱的仪器检出限为 0.045 μ g/mL, 仪器定量限为 0.151 μ g/mL。其中, 盐酸小檗碱峰的理论塔板数为 14933, 满足标准《黄连(黄连)配方颗粒》中盐酸小檗碱理论塔板数的要求。

关键词: 黄连;生物碱;测定

中药配方颗粒是由单味中药饮片按传统标准炮制后经提取浓缩制成的、供中医临床配用的颗粒。中药配方颗粒是以传统中药饮片为原料, 经过提取、分离、浓缩、干燥、制粒、包装等生产工艺, 加工制成的一种统一规格、统一剂量、统一质量标准的新配药用。

中药配方颗粒的有效成分、性味、归经、主治、功效和传统中药饮片完全一致, 保持了传统中药饮片的全部特征, 既能保证中医传统的君、臣、佐、使和辨证论治、灵活加减的特点, 优于中成药, 又免去了病人传统煎煮的麻烦, 同时还可灵活地单味颗粒冲服, 卫生有效。

2021年1月26日, 国家药监局发布《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》, 先后有两批共计196种中药配方颗粒标准出炉。

黄连配方颗粒为毛茛科植物黄连的干燥根茎经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒, 为黄棕色至深棕色的颗粒; 气微, 味极苦, 主要用于湿热内蕴、肠胃湿热、呕吐、泻痢等症的治疗。适用于黄连配方颗粒中生物碱(表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱)的含量测定。黄连配方颗粒试样经甲醇-盐酸溶液超声提取后, 使用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 在等度条件下进行分离, 盐酸小檗碱在 345nm 处有紫外吸收, 采用一测多评的方式进行定量。

1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

乙腈: 色谱纯;

甲醇：色谱纯；

磷酸二氢钾：优级纯；

盐酸：优级纯；

甲醇-盐酸（100:1）溶液：量取 100mL 甲醇，加入盐酸 1mL，混匀，备用；

盐酸小檗碱对照品：纯度 98.38%；

盐酸小檗碱标准储备液：取盐酸小檗碱对照品适量，置棕色容量瓶中，加甲醇制成每 1mL 含 511.576 μ g 的溶液；

盐酸小檗碱标准工作液：将盐酸小檗碱标准储备液（3.8）用甲醇稀释并定容配制成标准工作液，盐酸小檗碱系列浓度依次为 10.232 μ g/mL、20.463 μ g/mL、81.852 μ g/mL、102.315 μ g/mL 和 204.630 μ g/mL。

2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站；

名称	设备型号	仪器配置
悟空 HPLC	K2025	K2025 P2 二元高压输液泵 K2025 AS 自动进样器 K2025 CO 柱温箱 K2025 UVD 紫外-可见光检测器 Wookinglab 色谱工作站

分析天平：精确到 0.0001g；

涡旋振荡仪；

超声波清洗机；

容量瓶：10mL、100mL，棕色带刻度；

具塞锥形瓶：50mL，棕色。

3 测定步骤

3.1 样品处理

取黄连配方颗粒适量，研细，取约 0.2g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇-盐酸（100:1）的混合溶液 50mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 250W，频率 40kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 1mL，置 10mL 容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得。

3.2 色谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 4.6×250mm, 5μm 或者相当的色谱柱;
- b) 流动相: 乙腈: 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液 (50:50) (每 100mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4g, 再以磷酸调节 pH 值为 4.0);
- c) 柱温: 30°C;
- d) 进样量: 10μL;
- e) 流速: 1.0mL/min;
- f) 波长: 345nm。

4 结果

4.1 重复性测试

按照上述色谱条件进行采集, 盐酸小檗碱对照品溶液 (浓度为 81.853μg/mL) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

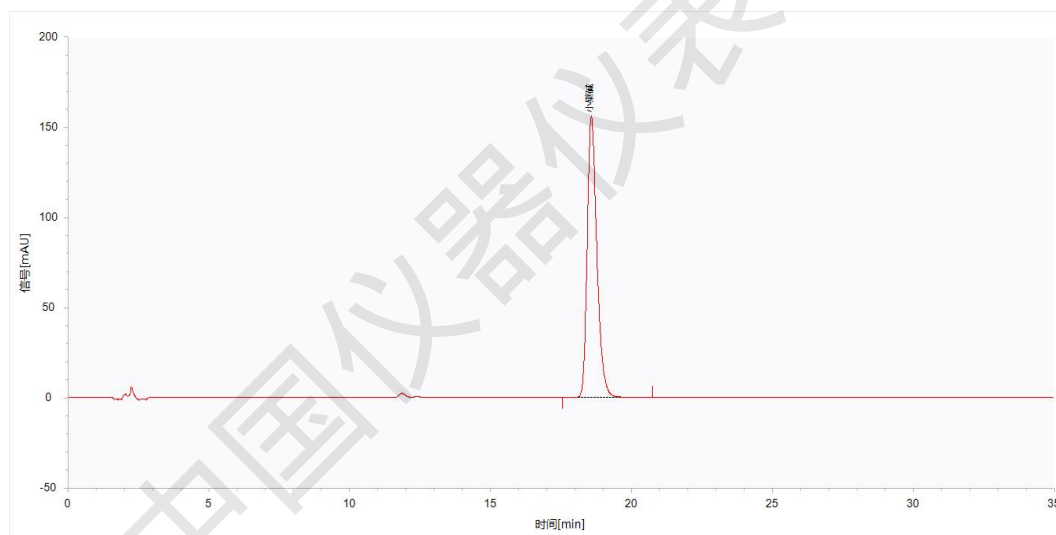


图 1 盐酸小檗碱对照品溶液的色谱图

表 1 盐酸小檗碱对照品溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板 数	分离度	对称/拖尾因子
小檗碱	18.592	3724.936	155.904	14933	-	1.32

由表 1 中可知, 盐酸小檗碱的理论塔板数为 14933, 满足《黄连 (黄连) 配方颗粒》中盐酸小檗碱峰的理论塔板数不低于 5000 的要求。

将盐酸小檗碱对照品溶液连续进样 7 针, 叠加的色谱图如图 2 所示, 结果见表 2。

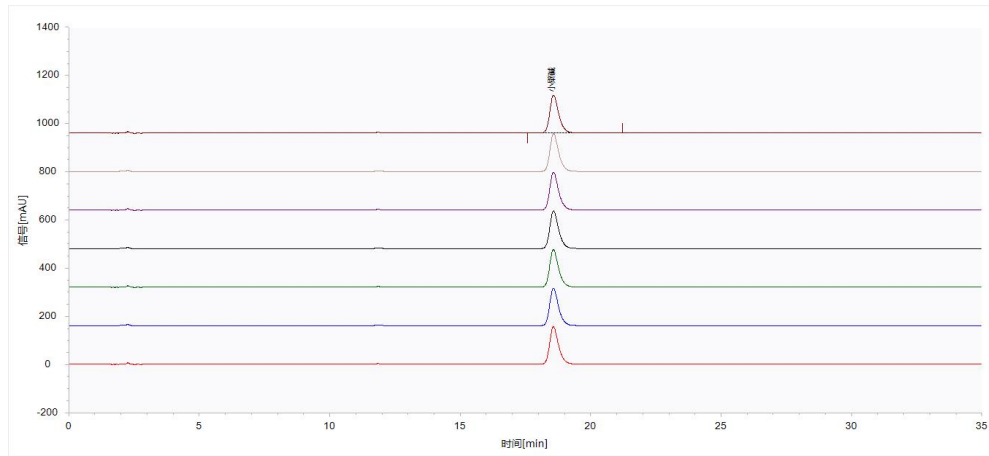


图2 盐酸小檗碱对照品溶液连续进样7针叠加的色谱图

表2 盐酸小檗碱对照品溶液连续进样7针重复性数据统计

目标物	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD %
小檗碱	18.592	18.592	18.592	18.592	18.592	18.600	18.592	18.593	0.016
峰面积	3710.61	3716.05	3724.93	3738.33	3743.94	3757.10	3760.97	3735.99	0.524
	2	6	6	4	2	4	2	4	

盐酸小檗碱对照品溶液连续进样7针重复性测试，保留时间的RSD为0.016%，峰面积的RSD为0.524%。

4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图3所示，计算结果见表3。

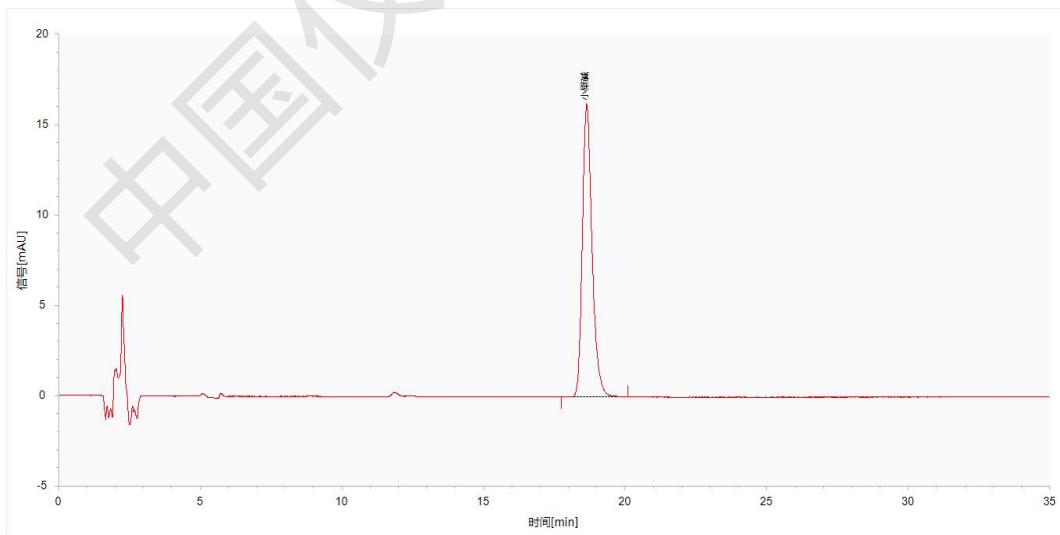


图3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
小檗碱	9.385	16.209	0.026	623.4	0.045	0.151

通过计算，盐酸小檗碱的仪器检出限为 $0.045\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.151\mu\text{g/mL}$ 。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线

将配制好的盐酸小檗碱标准工作液（3.9）在 HPLC 上进行测定，以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及相关系数见图 4，叠加色谱图见图 5。小檗碱在测定浓度范围内，曲线的相关系数 R^2 达到 0.9995，线性关系良好。

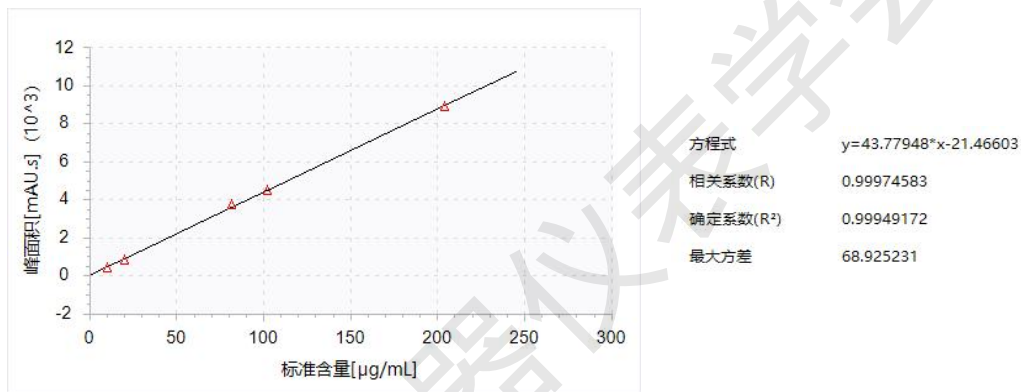


图 4 盐酸小檗碱标准溶液的校准曲线

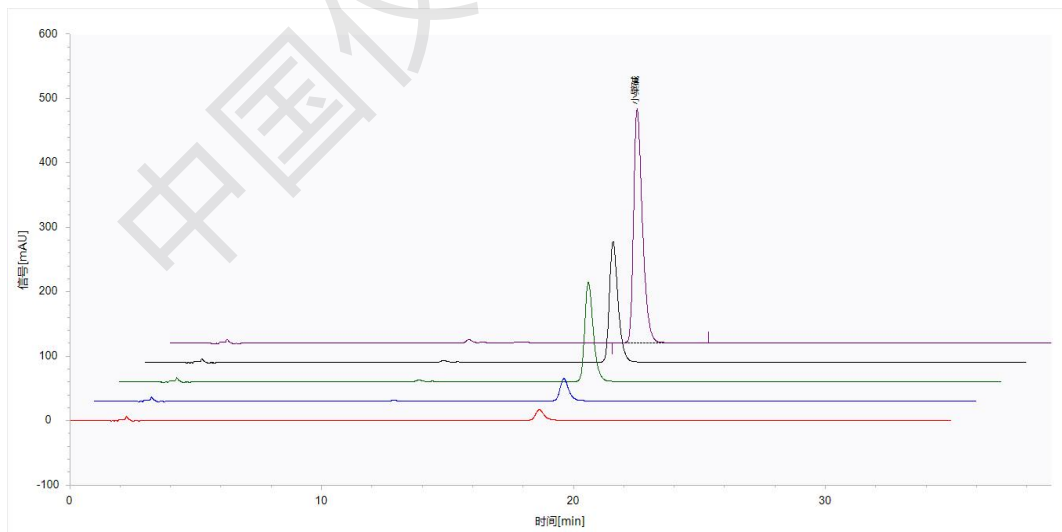


图 5 盐酸小檗碱标准溶液浓度系列曲线叠加色谱图

4.3.2 含量计算

购买黄连配方颗粒作为样品，按照 5.1 的流程对样品进行处理，并根据样品的含量，对样品进行加标回收实验。按照公式（1）进行计算，样品的色谱图及样品加标的色谱图如图

6 及图 7。

$$\omega = \frac{C \times V}{m \times 10^3} \quad \text{----公式 (1)}$$

式中： ω ---为样品中小檗碱的含量，单位为毫克每克（mg/g）；

C ---为通过校准曲线计算的样品中小檗碱浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ---为样品的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ---为样品质量，单位为克（g）。

样品中表小檗碱、黄连碱、巴马汀的定量采用一测多评的方式，用对照品盐酸小檗碱的含量进行定量，计算系数为 1。表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的峰位，利用待测成分色谱峰与盐酸小檗碱色谱峰的相对保留时间进行确定，实测以上四种物质的相对保留时间见表 4。

表 4 待测成分的相对保留时间

待测成分	保留时间	相对保留时间	标准规定相对保留时间	偏差%
表小檗碱	12.758	0.686	0.710	-3.39
黄连碱	14.183	0.763	0.780	-2.24
巴马汀	16.658	0.896	0.910	-1.58
小檗碱	18.600	-	-	-

由表 4 可以看出，四种物质的相对保留时间均在标准要求的 $\pm 5\%$ 之内。

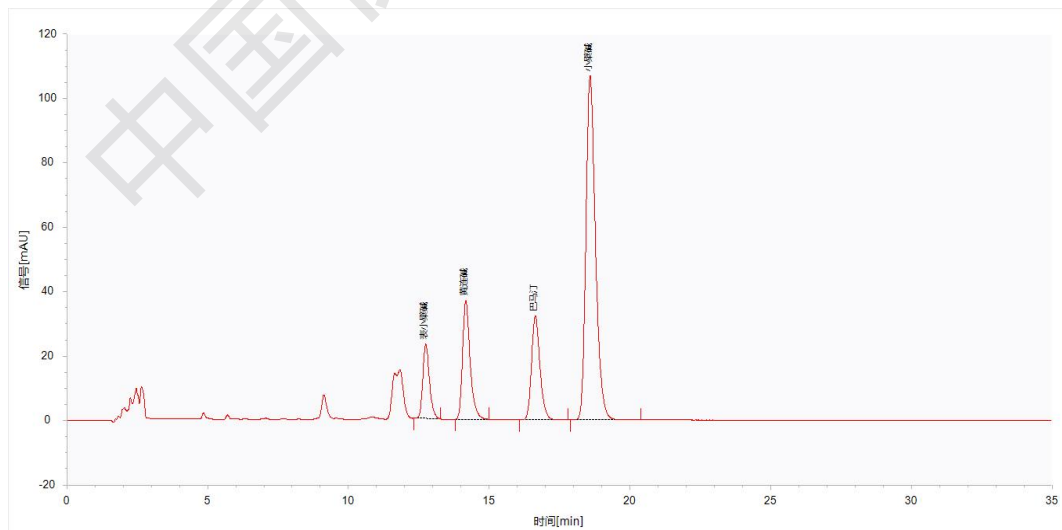


图 6 黄连配方颗粒样品的色谱图

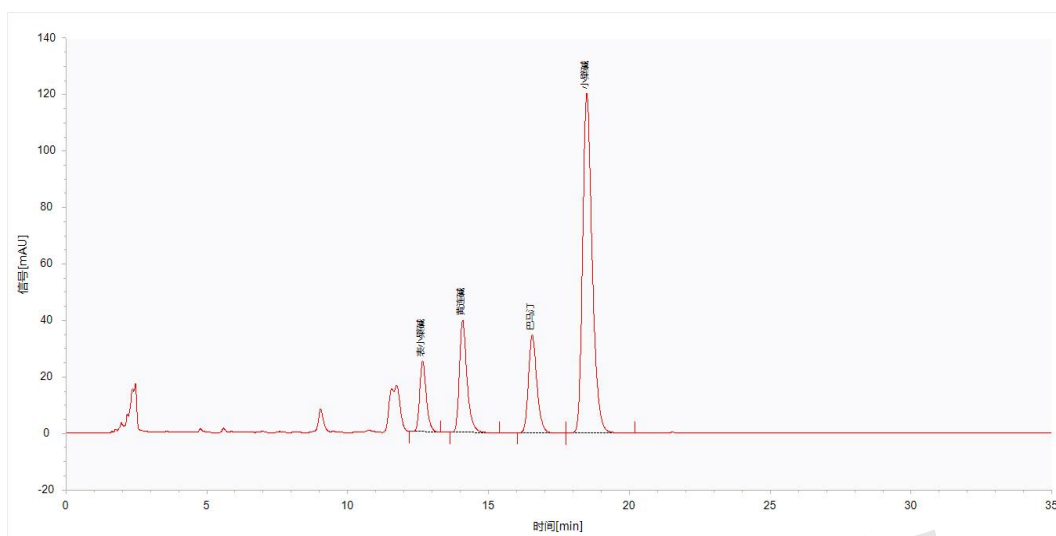


图 7 黄连配方颗粒样品加标的色谱图

经计算，此黄连配方颗粒样品中小檗碱的含量为 140.8mg/g，加标回收率为 102.7%，表小檗碱、黄连碱、巴马汀的总量为 102.2mg/g。

5 结论

通过对小檗碱的理论塔板数、重复性、灵敏度、线性的测试和对黄连配方颗粒样品中表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的相对保留时间的考察以及对其相关生物碱的含量进行测定，实验结果表明：用 K2025 测定黄连配方颗粒，盐酸小檗碱的理论塔板数为 14933，满足《黄连（黄连）配方颗粒》中盐酸小檗碱峰的理论塔板数不低于 5000 的要求；在测定浓度范围内，小檗碱具有良好的线性关系，确定系数 R^2 为 0.9995；重复性测试中，连续进样 7 针，小檗碱保留时间 RSD 为 0.016%，峰面积 RSD 范围为 0.524%，定性定量均有良好的重复性；小檗碱的仪器检出限为 0.045 μ g/mL，仪器定量限为 0.151 μ g/mL；样品中表小檗碱、黄连碱、巴马汀与小檗碱的相对保留时间均满足标准规定的 $\pm 5\%$ 的要求；样品中小檗碱的含量为 140.8mg/g，加标回收率为 102.7%，表小檗碱、黄连碱、巴马汀的总量为 102.2mg/g。因此，K2025 高效液相色谱仪可以满足《黄连（黄连）配方颗粒》中生物碱含量测定的需求。