

复方二仙汤中盐酸小檗碱及总生物碱的含量测定

年 华¹, 徐玲玲¹, 马明华², 郑汉臣³, 张巧艳³ (1. 岳阳中西医结合医院药剂科, 上海 200437; 2. 上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135; 3. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 建立复方二仙汤中盐酸小檗碱和总生物碱的含量测定方法。方法: 小檗碱的含量测定应用 HypersilBDS C₁₈ 色谱柱, 甲醇-0.02 mol/L NaH₂PO₄-0.1 mol/L 三乙胺 (40: 60: 2) 为流动相, 检测波长为 345 nm; 采用可见分光光度法于 420 nm 波长处测定总生物碱的含量。结果: 盐酸小檗碱的线性范围为 0.51~10.10 μg/mL, $r=0.9999$, 回收率 100.07%, RSD 为 0.4%; 总生物碱线性范围为 8.0~24.0 μg/mL, $r=0.9998$, 回收率 100.46%, RSD 为 0.58%。结论: 该法操作简便、快速且结果准确, 可用于该复方的质量控制。

关键词 二仙汤; 盐酸小檗碱; 总生物碱; 高效液相色谱法; 可见分光光度法

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)01-0038-04

Determination of berberine hydrochloride and total alkaloids in compound Er-xian decoction

NIAN Hua, XU Lingling, MA Minghua, ZHENG Hanchen, ZHANG Qiaoyan (1. Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Chinese Integrative Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Shanghai Xinxing Medicine Co. Ltd., Shanghai 200135, China; 3. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT **Objective** To establish a quantitative analysis method for berberine hydrochloride and total alkaloids in compound Er-xian decoction. **Methods** Berberine hydrochloride were determined by HPLC. Using HypersilBDS C₁₈ (4.6 x 200 mm) column, methanol-0.02 mol/L sodium dihydrogen phosphate-0.1 mol/L triethylamine (40: 60: 2) as the mobile phase. The detection wavelength was 345 nm. Total alkaloids were determined at 420 nm by visible spectrometry. **Results** The linearity range of berberine hydrochloride was 0.51~10.10 μg/mL, $r=0.9999$ and average recovery was 100.07%, RSD 0.4%. The linearity range of total alkaloids was 8.0~24.0 μg/mL, $r=0.9998$ and average recovery was 100.46%, RSD 0.58%. **Conclusions** The method is simple, quick and accurate. It can be used to control the quality of the decoction preparation.

KEY WORDS compound Er-xian decoction; berberine hydrochloride; total alkaloids; HPLC; visible spectrometry

复方二仙汤是张伯讷教授 20 世纪 50 年代创制的著名方剂, 由黄柏、仙茅等六味药材组成, 主要用于骨质疏松及更年期综合征的治疗, 临床疗效确切, 载入多部中医方剂学著作。黄柏为本方的重要成分, 具有清热燥湿, 泄火除蒸之功效。黄柏中生物碱类成分为本方主要有效成分, 而小檗碱为主要活性成分。目前, 测定小檗碱的方法虽然很多^[1-3], 但由于复方成分十分复杂, 常用检测方法干扰较大, 有关二仙汤中质量标准的报道极少。本实验采用紫外分光光度法和反相高效液相色谱法分别测定了复方二仙汤中总生物碱和盐酸小檗碱的含量, 为复方质量控制和工艺研究提供了依据。该法准确可靠, 重复性好, 可用于质量控制, 现报告如下:

1 仪器与试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, 岛津 2450 紫外分光光度计 (日本岛津公司)。盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0713-200107, 供含量测定用); 醋酸、醋酸钠、氢氧化钠、三氯化铝 (上海化学试剂公司, AR)。甲醇、三乙胺为色谱纯; 水为重蒸馏水; 其它化学试剂均为分析纯。复方所用药材均购自安徽亳州药材市场 (由郑汉臣教授鉴定); 复方二仙汤 (由第二军医大学生药教研室提供)。

2 方法与结果

2.1 小檗碱含量测定

2.1.1 色谱条件的选择 参照文献经筛选后, 确定色谱条件: HypersilBDS C₁₈ (4.6 mm x 200 mm, 5

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 90209043)

作者简介: 年华 (1978-), 男, 博士。Tel (021) 25072576, E-mail: jiaokyrin@hotmail.com

μm); 流动相: 甲醇-0.02 mol/L NaH_2PO_4 -0.1 mol/L 三乙胺 (40: 60: 2); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 345 nm; 保留时间约为 9 min。

2.1.2 对照品及供试液的制备 精密称量组方所需六味药材 (黄柏、仙茅、淫羊藿、巴戟天、知母、当归) 各 1 g 加入 60 mL 蒸馏水, 煮沸提取 2 h 提取液冷却浓缩后定容至 100 mL, 即得复方二仙汤。检测时用蒸馏水稀释 10 倍后, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 滤液为供试品溶液; 对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱标准品 5.06 mg 以流动相制成每 1 mL 含小檗碱 1.01 mg 的溶液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 滤液作为对照品溶液备用。

2.1.3 线性关系考察 将上述标准溶液以流动相分别稀释成每 1 mL 含盐酸小檗碱 0.505、1.01、2.02、4.04、6.06、8.08、10.10 μg 的对照品溶液, 进样量均为 20 μL , 以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标, 进行回归分析。回归方程为: $Y = 35251X - 1392.6$ $r = 0.9999$ 结果表明: 小檗碱浓度在

0.505~10.10 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 20 μL , 重复进样 5 次, 测定盐酸小檗碱峰面积, 结果峰面积的 RSD 值为 0.60%, 表明精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL , 分别于 0、2、4、8、12、24 h 及 36、48、72 h 进样, 测定盐酸小檗碱峰面积, 计算 RSD , 结果日内 (0~24 h) RSD 为 1.0%, 日间 (0~4 d) 为 1.3%。

2.1.6 重复性试验 取同一批号的二仙汤汤剂 5 份, 分别照供试品溶液制备项下操作制备样品液 5 份, 按样品含量测定法测定盐酸小檗碱峰面积, 结果 RSD 为 0.83%, 表明此法重现性良好。

2.1.7 加样回收率测定 精密量取已知含量的同一批号供试品溶液, 分别精密加入与供试品量相近的盐酸小檗碱对照品适量, 按样品制备方法和测试条件进行测定, 计算得平均回收率为 100.07%, $RSD = 0.4%$ 。

表 1 小檗碱回收率试验结果

编号	样品中含量 ($\mu\text{g/mL}$)	加标准品量 ($\mu\text{g/mL}$)	实际测得量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1.72	1.80	3.51	99.78	100.07	0.40
2	1.78	1.80	3.59	100.56		
3	1.76	1.80	3.57	100.43		
4	1.79	1.80	3.58	99.71		
5	1.80	1.80	3.59	99.86		

2.1.8 阴性干扰实验 按照处方比例, 除去黄柏药材的成分, 按制备方法制得阴性样品。按上述条件与方法试验, 结果显示阴性样品在与对照品色谱峰

相应的位置上, 无吸收峰。说明处方中其它成分对测定结果无影响。见图 1。

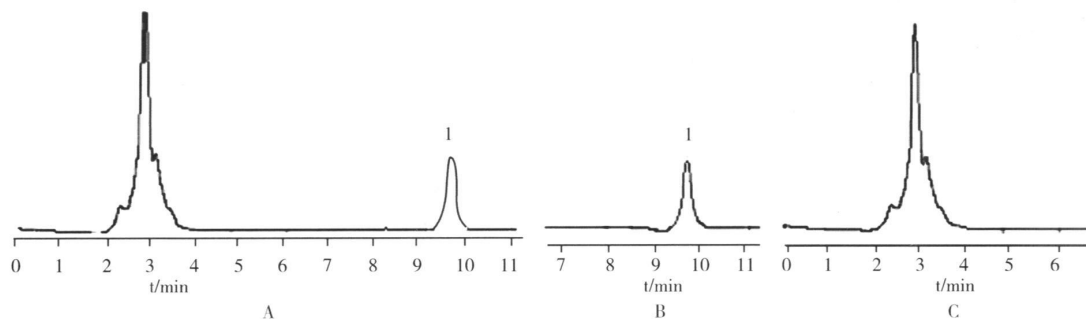


图 1 二仙汤的高效液相色谱图

A - 供试品; B - 小檗碱对照品; C - 阴性对照; 1 - 盐酸小檗碱

2.1.9 样品的测定 按 2.1.2 项下方法制备供试样品液, 进样 20 μL , 按上述色谱条件测定, 外标法计算盐酸小檗碱的含量, 5 批样品的含量数据见表 2。

2.2 总生物碱含量测定

2.2.1 检测波长的选择 将小檗碱对照品溶液, 采用酸性染料比色法^[5], 在 200~600 nm 波长范围内进行扫描。结果对照品溶液在 420 nm 波长处有良

好的吸收峰,空白样品在此波长处无干扰。故选择 420 nm 波长处测定总生物碱含量。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱 10 mg 置 100 mL 容量瓶中,用醋酸-醋酸钠缓冲液定容至 100 mL,制成每 1 mL 含盐酸小檗碱 0.1 mg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称量组方所需六味药材(黄柏、仙茅、淫羊藿、巴戟天、知母、当归)各 1 g 加入 60 mL 蒸馏水,煮沸提取 2 h 提取液冷却浓缩后定容至 100 mL,即得复方二仙汤。

2.2.4 线性关系考察精密吸取小檗碱对照品溶液 8.0、12.0、16.0、20.0、24.0 mL 于 100 mL 量瓶中,加醋酸钠缓冲液定容至刻度,摇匀,分别精密量取各

不同浓度对照品溶液 10.0 mL 置 60 mL 分液漏斗中,加溴麝香草酚蓝液 2 mL,摇匀。再加入氯仿 15 mL,振摇 3 min,静置 20 min,收集氯仿层,吸取上清液。照分光光度法^[6,7],在 420 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(Y)对浓度(X)进行回归分析,计算回归方程为: $Y = 0.0316X + 0.0407$, $r = 0.9998$,线性范围为 8.0~24.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.5 回收率实验 精密量取 5 份已知总生物碱含量的样品,各加入一定量的标准品溶液,稀释后测定,总生物碱含量测定按样品制备方法和测试条件进行测定,计算回收率,结果平均回收率为 100.46%, $RSD = 0.58\%$ ($n = 5$)。结果见表 2。

表 2 总生物碱回收率试验结果

编号	样品中含量 ($\mu\text{g/mL}$)	加标准品量 ($\mu\text{g/mL}$)	实际测得量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.31	0.20	0.51	100.43	100.46	0.58
2	0.29	0.21	0.50	100.24		
3	0.28	0.21	0.48	100.38		
4	0.27	0.21	0.48	99.89		
5	0.28	0.21	0.49	101.45		

2.2.6 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液,按上述方法在 420 nm 波长处测定吸光度,重复测定 5 次, RSD 值为 0.20%,表明精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0.2、4、8、12、24 h 进行测定,测定吸光度 RSD 为 1.0%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批号的二仙汤汤剂 5 份,分别照供试品溶液制备项下操作制备样品液 5 份,按样品含量测定法测定吸光度,结果 RSD 为 0.33%,表明此法重现性良好。

2.2.9 样品的测定 精密吸取上述供试品液 2 mL 于 25 mL 容量瓶中,用醋酸钠缓冲液定容至刻度,超声提取 1 h 而后离心 5 min 取出 10 mL 离心上清液置 60 mL 分液漏斗中,加入溴麝香草酚蓝 2 mL,摇匀。再加入氯仿 15 mL,振摇 3 min,静置 20 min 收集氯仿层,吸取上清液。照分光光度法,在 420 nm 波长处测定吸光度。按照回归方程计算总生物碱含量。

3 小结与讨论

3.1 生物碱类成分为复方二仙汤中活性成分,有关其含量测定方法未见报道。笔者首次采用 HPLC 法测定复方二仙汤汤剂中盐酸小檗碱和总生物碱的含量,此法线性关系好、快速、简便,汤剂样品直接测

定,无需氧化铝等手段纯化,有良好的分离度与稳定性且结果准确,可为二仙汤质量控制标准的制定提供参考。

表 3 二仙汤中盐酸小檗碱和总生物碱的含量测定结果

样品编号	盐酸小檗碱含量 ($\mu\text{g/mL}$)	总生物碱含量 (mg/mL)
1	1.79	0.27
2	1.73	0.25
3	1.78	0.24
4	1.77	0.26
5	1.75	0.24

3.2 根据文献的报道^[4],我们比较了各文献报道的流动相的分离效果,考察了甲醇-0.02 mol/L NaH_2PO_4 -0.1 mol/L 三乙胺等不同比例流动相的分离效果,结果表明,在本实验中所采用的色谱条件下,分离效果最佳,保留时间适当,无杂质干扰且无需特定柱温条件。

3.3 由于复方成分复杂,紫外吸收相互干扰大,测定总生物碱时必须运用适当显色剂结合酸性染料比色。本实验中选择 410 nm 波长处测定总生物碱含量,结果峰形稳定且回收率可靠,阴性对照在此波长处无干扰。

2.6 加强原材料的管理 “亮菌甲素事件”给药品安全敲响了警钟,各级药监部门加强了药品生产源头的监管,为此,做好原辅料的质量监控工作尤为重要。要求对新购进的、质量可疑的或储存时间较长的原辅料应在检验合格后方可投入使用。没有药用标准的特殊原料应进行安全性等试验,并得到省级药品监督管理部门批准。直接接触制剂的包装材料必须有注册证。

3 加强沟通协作

3.1 争取领导的支持 遇到实际问题应积极及时沟通,争取医院领导和上级主管部门在人力、财力和技术上的支持和帮助,以确保问题的解决。

3.2 各科室的积极配合 首先是制剂配制部门和药检部门通力合作,形成合力,共同解决面临的问题。其次是与临床科室的相互协作,医院制剂的最终目的是满足临床需要。制剂室每半年向相关临床科室发放“制剂临床使用调查表”,以了解问题为主。在实践中,临床科提出了不少建设性建议,促进了制剂质量的提高,更好地满足临床和患者的需要。

3.3 加强同行之间的交流和学习 与同行的交流可以互相取长补短,共同促进。要向制剂管理工作做得好的单位学习,不断提高制剂室管理水平,从而不断提高制剂质量。交流的另一方面是将临床效果好、质量保证、临床急需而市场没有供应的制剂经药监部门批准后,在医院间相互调剂使用,充分发挥优质制剂的价值,为更多的病人服务。

4 《规范》管理实践中的难点和对策

4.1 医院缺少相应制剂质量控制的必要仪器和设备 如没有抗生素效价测定仪,含抗生素的制剂质量无法进行有效控制;一般医院也没有空气微粒测定仪、浮游菌计数器、风速仪等空气质量检测设备,

无法自行对洁净室空气进行全面监测;内包材相容性试验需要气相色谱仪、红外光谱仪等设备;中药制剂含量测定往往需要高效液相色谱仪。若医院自行配置相应的贵重检验仪器设备,经费上有困难、资源上也是浪费。

对策: 一些不能自行监测的项目可以委托有条件的单位进行,如当地药检所、有条件的医疗机构,需要签定委托检测合同。

4.2 无药品标准原料的使用 医院制剂品种多,所用原辅料的品种也多,有些原辅料没有国家药品标准,进行安全性试验又没有条件。

对策: 委托有条件的单位进行试验,并签定委托合同,所用动物应有合格证。

4.3 规模缩小人员减少与高要求管理的矛盾 制剂室规模不断缩小,经济效益不断下降,医院不得不裁减制剂室人员,从事制剂生产的人员只能一人多岗,而国家对医院制剂管理的要求越来越高,增加了制剂室管理的难度。

对策: 一、制剂室根据自身条件,有所为有所不为。保证本制剂室特色品种的配制;而一些用量不大或者配制检验条件不具备的品种可以从其他医院调剂。二、建议成立地区制剂中心。药监部门根据本地区医院的数量,选择几家条件较好的制剂室作为本地区的制剂中心,加强监管,为本地区的医疗机构提供临床需要而市场不能满足供应的制剂,既有利于制剂质量的提高和管理,又有利于提高资源的利用效率。

总之,通过加强制剂室的有效管理,使医院制剂工作向标准化、制度化、规范化方向发展,从而提高药品质量,为保证临床用药安全有效、充分发挥医院制剂室的职能起到积极的作用。

收稿日期: 2006-07-14

(上接第 40 页)

参考文献:

- [1] 中国药典 2005 版. 一部 [S]. 2005 214
- [2] 马尔丽, 季申. HPLC 测定消 A 洗液中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中成药, 2001, 23(7): 493
- [3] 宋兵双, 谢昭明. HPLC 法对黄柏不同期采收药材的小檗碱含量比较 [J]. 湖南中医药导报, 2000 6(1): 38
- [4] 周芳. HPLC 测定黄柏胶囊中盐酸小檗碱的含量 [J]. 中国中

药杂志, 2003, 28(10): 984

- [5] 杨毅恒, 翟所迪. 酸性染料比色法测定鞣苦胶囊中苦参总生物碱的含量 [J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(6): 63.
- [6] 辛海量, 赵玉海, 林峰, 等. 苦草中总生物碱含量测定 [J]. 解放军药学报, 2002, 18(2): 113.
- [7] 郭胜伟, 王天山, 杨冬冬, 等. 分光光度法测定抗风痛胶囊中总生物碱的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(5): 290

收稿日期: 2007-06-25