

四妙丸中盐酸小檗碱和苍术素的含量测定方法研究

王艳秋, 刘向前 (沈阳市中医药学校, 辽宁沈阳 110300)

摘要 [目的]建立四妙丸中盐酸小檗碱和苍术素的含量测定方法。[方法]采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Promosil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A) ~ 0.1% H₃PO₄ 溶液(B), 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~5 min, 25% A; 5~7 min, 25%~90% A; 7~15 min, 90% A; 检测波长 340 nm。[结果]盐酸小檗碱和苍术素的线性范围分别为 0.25~2.50 和 0.32~3.20 μg, 平均回收率分别为 97.5% 和 96.8%, RSD 分别为 2.6% 和 2.8%。[结论]该方法准确、可靠, 可作为四妙丸的质量控制方法。

关键词 四妙丸; 盐酸小檗碱; 苍术素; 含量测定

中图分类号 R284.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)09-157-03

Content Determination of Berberine Hydrochloride and Atractylodin in Simiao Pills

WANG Yan-qi, LIU Xiang-qian (Shenyang School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110300)

Abstract [Objective] To establish a method for the content determination of berberine hydrochloride and atractylodin in Simiao pills. [Method] The HPLC method was adopted with Promosil C₁₈ chromatography column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile (A) - 0.1% H₃PO₄ solution (B) with gradient eluent, the elution program was 0-5 min, 25% A; 5-7 min, 25%-90% A; 7-15 min, 90% A. The detection wavelength was 340 nm. [Result] The linear ranges of berberine hydrochloride and atractylodin were 0.25-2.5 and 0.32-3.2 μg, respectively. The average recovery rates of the two components in Simiao pills were 97.5% and 96.8%, while RSD were 2.6% and 2.8%, respectively. [Conclusion] The method is accurate and reliable for the quality control of Simiao pills.

Key words Simiao pill; Berberine hydrochloride; Atractylodin; Content determination

四妙丸由苍术、盐黄柏、牛膝、薏苡仁四味中药组成, 是在二妙丸基础上加味牛膝以及薏苡仁而来, 方中黄柏作为君药, 行使清热燥湿之功; 苍术辅助以燥湿健脾之效, 为臣药; 牛膝的功效为补益肝肾、强化筋骨、活血兼舒络, 并可引药下行, 作为辅药, 同时行使佐使药之功; 薏苡仁健脾祛湿、利水消肿, 为佐药; 诸药相辅相成, 标本皆可兼治^[1]。四妙丸是治疗下焦湿热、足膝红肿热痛之良方, 经过历代医家的临床实践及推演, 再加上当代医学药理学的试验研究, 其应用范围已经更加广泛, 是许多湿热体质患者的首选方剂^[2-4]。

方中君药黄柏中的主要成分为盐酸小檗碱, 臣药苍术的主要有效成分为苍术素, 测定二妙丸、三妙丸、四妙丸中盐酸小檗碱含量的方法最常用的是高效液相色谱法^[5-6], 用毛细管气相色谱测定这 3 种复方中苍术素含量^[7]。该研究采用高效液相色谱法同时测定四妙丸中盐酸小檗碱和苍术素的含量, 为四妙丸的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1100 series HPLC 仪(真空脱气机、柱温箱、四元泵、VWD)(美国安捷伦公司); UV3010 型紫外分光光度计(日本日立公司); CP225D 型十万分之一分析天平(德国 SARTORIUS 公司)。

1.2 试材 四妙丸为自制, 药材均采购于安徽亳州药材市场, 由辽宁中医药大学中药鉴定教研室李峰教授进行鉴定, 各药材均符合药典规定; 对照品盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所, 批号 110713-200911)、苍术素(上海中药标准化研究中心, 批号 17-2001); 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 测定波长的选择。分别取苍术素、盐酸小檗碱对照品溶液, 在 200~400 nm 进行扫描, 盐酸小檗碱的最大吸收波长为 265 和 349 nm, 苍术素在 340 nm 处有较大吸收, 因此选择 340 nm 为检测波长。

1.3.2 色谱条件。Promosil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A) ~ 0.1% H₃PO₄ 溶液(B), 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~5 min, 25% A; 5~7 min, 25%~90% A; 7~15 min, 90% A; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 340 nm; 柱温为室温; 进样量 20 μL。

1.3.3 供试品溶液制备方法考察。按四妙丸处方比例取黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝四味药材, 粉碎过 40 目筛, 备用。

1.3.3.1 提取方法的考察。按处方比例, 分别精密称取药材粉末 3 份, 每份 1 g, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入甲醇 30 mL, 称重。分别考察加热回流 2 h、超声提取 30 min、索氏提取 4 h 这 3 种提取方式的提取效果, 提取后放冷, 并用甲醇补足重量, 混合均匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定, 分别记录盐酸小檗碱和苍术素峰面积, 计算其含量。

1.3.3.2 提取溶媒的考察。按处方比例, 精密称取药材粉末 4 份, 每份 1 g, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 分别精密加入 30 mL 甲醇、95% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇, 加热回流 2 h, 提取后放冷, 用相应的提取溶媒补足重量, 混匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定, 分别记录盐酸小檗碱和苍术素峰面积, 计算其含量。

1.3.3.3 溶媒用量的考察。精密称取药材粉末 3 份, 每份 1 g, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 分别精密加入 75% 乙醇 50、100、150 mL, 称重, 加热回流 2 h, 提取后放冷, 用溶媒补足重量, 混匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定, 分别记录盐酸小檗碱和苍术素峰面积, 计算其含量。

1.3.3.4 提取时间的考察。精密称取药材粉末3份,每份1 g,置250 mL圆底烧瓶中,精密加入75%乙醇100 mL,称重,分别加热回流0.5、1.0、2.0 h,提取后放冷,用溶媒补足重量,混匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液20 μL 注入高效液相色谱仪,测定,分别记录盐酸小檗碱和苍术素峰面积,计算其含量。

1.3.4 对照品溶液的制备。精密称取盐酸小檗碱和苍术素标准品适量,用甲醇分别配制成浓度为1.00和0.64 mg/mL的对照品储备液,精密吸取盐酸小檗碱对照品储备液12.5 mL、苍术素对照品储备液25 mL,置于50 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得对照品混合溶液(盐酸小檗碱浓度250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苍术素浓度320 $\mu\text{g}/\text{mL}$),避光保存。精密量取盐酸小檗碱和苍术素混合对照品储备液,分别为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置10 mL量瓶中,甲醇定容至刻度,作为混合系列对照品溶液。

1.3.5 阴性样品溶液的制备。按照药典所载处方比例,分别制备无黄柏、苍术的阴性样品,按“1.3.3”方法制备阴性样品溶液。

1.3.6 方法学考察。

1.3.6.1 系统适应性试验。取样品溶液、混合对照品溶液和阴性对照溶液,按“1.3.2”色谱条件测定,绘制HPLC图谱^[10],考察系统适应性。

1.3.6.2 线性关系考察。取“1.3.4”系列混合对照品溶液,其中盐酸小檗碱浓度分别为12.50、25.00、50.00、75.00、100.00、125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苍术素浓度分别为16.00、32.00、64.00、96.00、128.00、160.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分别精密吸取上述混合对照品溶液各20 μL ,进样,按“1.3.2”色谱条件分析,以峰面积为纵坐标、进样量为横坐标绘制标准曲线。

1.3.6.3 精密度试验。精密吸取中间浓度(盐酸小檗碱浓度75.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苍术素含量96.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合对照品溶液20 μL ,按照“1.3.2”色谱条件测定,重复进样6次,分别记录盐酸小檗碱和苍术素的峰面积。

1.3.6.4 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进样,通过HPLC分析并分别记录盐酸小檗碱和苍术素的峰面积,计算RSD值。

1.3.6.5 重复性试验。取同一批样品共6份,每份1 g,精密称定,其余按“1.3.3”方法制备供试品溶液,进样,测定,计算盐酸小檗碱和苍术素的含量和RSD。

1.3.6.6 加样回收率试验。取已知含量(盐酸小檗碱6.26 mg/g、苍术素5.31 mg/g)的样品6份,每份0.5 g,精密称定,分别加入盐酸小檗碱对照品溶液4 mL(浓度为1.00 mg/mL)和苍术素对照品溶液4 mL(浓度为0.64 mg/mL),按“1.3.3”制备供试品溶液并测定,计算样品的回收率和RSD。

1.3.7 样品的含量测定。按“1.3.1”~“1.3.6.1”方法测定3个批次四妙丸中盐酸小檗碱和苍术素的含量。

2 结果与分析

2.1 供试品溶液制备方法

2.1.1 提取方法的考察。从表1可以看出,采用加热回流

提取法进行提取得到的2种成分含量较高,故该试验供试品的制备方法确定为加热回流提取法。

表1 提取方法的考察结果

Table 1 Investigation results of extraction methods

提取方法 Extraction method	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride mg/g	苍术素 Atractylodin mg/g
加热回流 Heated reflux	5.23	4.38
超声提取 Ultrasonic extraction	4.64	4.04
索氏提取 Soxhlet extraction	4.78	4.13

2.1.2 提取溶媒的考察。从表2可以看出,采用甲醇提取苍术素和盐酸小檗碱含量最高,但液相图谱中干扰色谱峰较多,而75%乙醇提取二者含量与甲醇提取相似,且干扰较少,故选择75%乙醇为提取溶媒。

表2 提取溶媒的考察结果

Table 2 Investigation results of extraction solvents

提取溶媒 Extraction solvent	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride mg/g	苍术素 Atractylodin mg/g
甲醇 Methanol	5.53	4.74
95%乙醇 95% ethanol	4.81	4.61
75%乙醇 75% ethanol	5.41	4.89
50%乙醇 50% ethanol	4.64	4.51

2.1.3 溶媒用量的考察。从表3可以看出,加溶媒量100和150 mL的这2种成分含量明显高于加入50 mL,而加入100 mL与加入150 mL溶媒的二者含量变化不大,故选择加入100 mL的75%乙醇提取。

表3 溶媒用量的考察结果

Table 3 Investigation results of solvent dosage

溶媒用量 Solvent dosage mL	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride mg/g	苍术素 Atractylodin mg/g
50	5.38	4.86
100	6.22	5.31
150	6.24	5.33

2.1.4 提取时间的考察。由表4可见,提取1 h样品已经基本提取完全,增加时间二者含量变化不明显,故选择加热回流时间为1 h。

表4 提取时间的考察结果

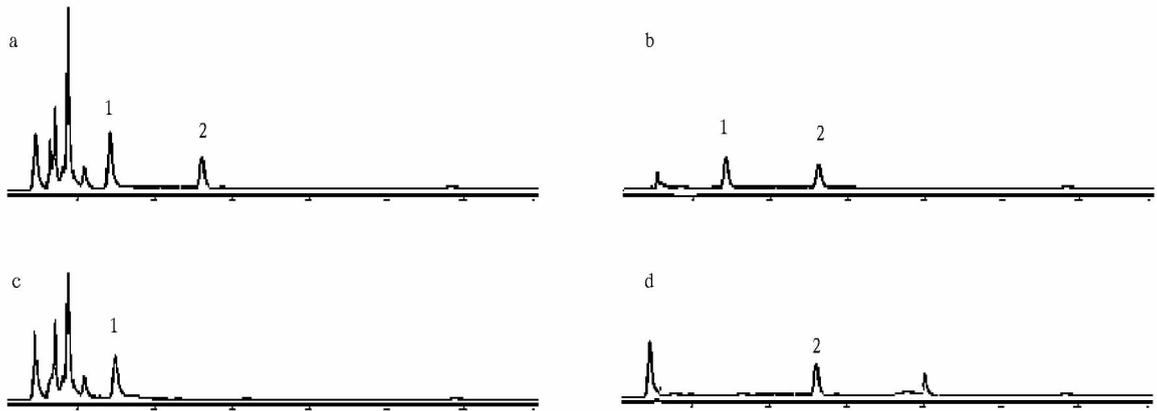
Table 4 Investigation results of extraction time

提取时间 Extraction time min	盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride mg/g	苍术素 Atractylodin mg/g
30	4.35	3.89
60	6.28	5.38
120	6.31	5.42

综上所述,确定供试品溶液的制备方法为:取四妙丸粉末1.0 g,精密称定,加75%乙醇100 mL,加热回流提取1 h,滤过,滤液蒸干,用甲醇溶解并定容于100 mL容量瓶中,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得,避光保存。

2.2 方法学考察。

2.2.1 系统适应性试验。图1表明,苍术素和盐酸小檗碱



注: a 为四妙丸供试品; b 为混合对照品; c 为阴性液(不加苍术); d 为阴性液(不加黄柏)。1 为盐酸小檗碱; 2 为苍术素。

Note: a. Tested substances of Simiao pills; b. Mixed reference substance; c. Negative solution (not adding *Atractylodes lancea*); d. Negative solution (not adding *Phellodendron amurense*); 1. Berberine hydrochloride; 2. Atractylodin.

图1 供试品和对照品溶液的 HPLC 图

Fig.1 HPLC of the solutions of tested substances and reference substances

色谱峰与相邻色谱峰的分度均符合要求,说明苍术素和盐酸小檗碱与其他组分完全分离,阴性样品溶液在盐酸小檗碱与苍术素的峰位置处无干扰。

2.2.2 线性关系考察。按“1.3.6.2”方法操作,以峰面积为纵坐标、进样量为横坐标绘制标准曲线,得出苍术素和盐酸小檗碱的回归方程分别为 $y = 3.857 \times 10^4 x - 1.273 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)、 $y = 1.76366 \times 10^5 x - 2.71973 \times 10^5$ ($r = 0.9993$),说明盐酸小檗碱、苍术素分别在 $0.25 \sim 2.50$ 、 $0.32 \sim 3.20 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度试验。按“1.3.6.3”方法操作,计算得出盐酸小檗碱和苍术素的峰面积的 RSD 均小于 3.0% ,符合有关规定,表明在此试验条件下精密度良好。

2.2.4 稳定性试验。按“1.3.6.4”方法操作,计算得出盐酸小檗碱和苍术素的峰面积的 RSD 值均小于 3.0% ,符合有关规定,表明盐酸小檗碱和苍术素在 24 h 内比较稳定。

2.2.5 重复性试验。按“1.3.6.5”方法操作,计算得盐酸小檗碱和苍术素的含量的平均值分别为 6.26 和 5.31 mg/g ,二者的 RSD 均小于 3.0% ,表明该方法重现性良好。

2.2.6 加样回收试验。按“1.3.6.6”方法操作,计算盐酸小檗碱和苍术素的平均回收率分别为 97.5% 和 96.8% , RSD 分别为 2.6% 和 2.8% ,符合有关规定。表明该方法准确、可靠,可用于四妙丸中盐酸小檗碱和苍术素的含量测定。

2.3 含量测定 由表 5 可知,不同批号四妙丸中盐酸小檗碱含量接近,苍术素的含量也差别不大。

3 讨论和结论

(1) 四妙丸为二妙丸类方,以往文献关于方中苍术的含量测定多以茅术醇和 β -桉叶油醇为对照品,该研究采用 2010 版《中国药典》中苍术项下记载的对照品苍术素作为指标性成分建立含量测定方法,这为更好地控制四妙丸的质量提供了基础^[8]。

表 5 四妙丸中盐酸小檗碱及苍术素含量测定

Table 5 Contents of berberine hydrochloride and atractylodin in Simiao pills

样品批号 Batch number of samples	盐酸小檗碱含量 Berberine hydrochloride mg/g	苍术素含量 Atractylodin mg/g
1	6.42	5.33
2	6.38	5.38
3	6.35	5.37

(2) 试验中流动相的选择曾尝试用甲醇-磷酸系统、乙腈-甲酸系统等,经反复摸索最终确定乙腈 $\sim 0.1\%$ H_3PO_4 溶液梯度洗脱,并确定了最佳洗脱程序。

(3) 苍术素为聚乙烯炔类成分,对光不稳定,试验过程中供试品和对照品溶液均应放在棕色瓶中避光保存^[9]。

(4) 该研究采用高效液相色谱法同时测定四妙丸中盐酸小檗碱和苍术素的含量,结果表明,盐酸小檗碱和苍术素的线性范围分别为 $0.25 \sim 2.50$ 和 $0.32 \sim 3.20 \mu\text{g}$,平均回收率分别为 97.5% 和 96.8% , RSD 分别为 2.6% 和 2.8% 。该方法准确、可靠,可作为四妙丸的质量控制方法。

参考文献

- [1] 胡宇哲. 二妙丸与四妙丸的组方及功能比较[J]. 吉林中医药,2007,27(6):48.
- [2] 郑永刚. 四妙丸加味治疗湿热痹阻型急性痛性关节炎 37 例临床观察[J]. 中医药导报,2013,19(7):53-55.
- [3] 谷玉娟,段大航. 四妙丸治疗湿疹疾病的临床应用[J]. 中国民康医学,2013,25(8):102-103.
- [4] 王晓玉,张晓兰,张丽,等. 四妙丸对大鼠佐剂性关节炎作用机制的研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(21):2889-2892.
- [5] 潘扬,王永珍,任仁安. 二妙丸、三妙丸与四妙丸中小檗碱和掌叶防己碱含量测定[J]. 中成药,1990,12(5):11-12.
- [6] 韦国兵. HPLC 法测定二妙胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(6):1701-1703.
- [7] 朱爱兰,潘扬,张弦. 二妙丸、三妙丸、四妙丸中 β -桉叶醇和茅术醇的含量测定[J]. 南京中医药大学学报,1999,15(1):30-32.
- [8] 国家药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:中国医药出版社,2010:153.
- [9] 陈炎明,俞桂新,王峰涛. 反相高效液相色谱法同时测定苍术中的两种聚乙烯炔类化合物[J]. 色谱,2007,25(1):84-87.