

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.07.05

# 一测多评法测定白头翁口服液中 3 种生物碱成分研究

张璐, 龚旭昊, 赵富华, 范强\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-05-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 07-0028-08 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 建立同时测定白头翁口服液中 3 种生物碱成分含量的一测多评法。采用 Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (50:50) (每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g, 再以磷酸调节 pH 为 4.0) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 采用 347 nm 作为检测波长进行检测。以小檗碱为内参物, 分别计算与黄连碱和巴马汀的相对校正因子及相对保留时间, 实现一测多评。本研究拟为白头翁口服液质量控制提供新的思路。

**[关键词]** 白头翁口服液; 生物碱; 一测多评

## Simultaneous Determination of Three Alkaloid Ingredients in Baitouweng Oral Solution by QAMS

ZHANG Lu, GONG Xu-hao, ZHAO Fu-hua, FAN Qiang\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: FAN Qiang, E-mail: tcmfanqiang@126.com

**Abstract:** A method for simultaneous determination of three alkaloid ingredients in Baitouweng oral solution was established. An Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used as analytical column. The mobile phase was consisted of acetonitrile - 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (50:50) (added 0.4 g of sodium dodecyl sulfate per 100 mL, then adjusted the pH to 4.0 with phosphoric acid) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 347 nm. Taking berberine as an internal reference, the relative correction factors and relative retention time of coptisine and palmatine were calculated respectively. By measuring the content of one component, the simultaneous determination of the content of multiple components is achieved. This study is intended to provide new ideas for the quality control of Baitouweng oral solution.

**Key words:** Baitouweng oral solution; alkaloid; quantitative analysis of multi-components by single marker

作者简介: 张璐, 硕士, 从事兽药检验及相关研究。

通讯作者: 范强。E-mail: tcmfanqiang@126.com

白头翁口服液由白头翁、黄连、秦皮、黄柏 4 味药组成,具有清热解毒,凉血止痢的功效<sup>[1]</sup>。处方中君药黄连起主要药效作用,且价格较贵。黄连的主要有效成分为生物碱类<sup>[2]</sup>。为避免某些企业因节约成本,不投、少投、投劣质黄连<sup>[3]</sup>,更好控制白头翁口服液质量,建立了同时测定白头翁口服液中 3 种生物碱成分的高效液相色谱法。鉴于多指标的质量控制模式需要对照品的种类和数量较多,且部分对照品(如盐酸黄连碱)价格较贵,参照《一测多评法建立的技术指南》<sup>[4]</sup>要求,以盐酸小檗碱为内参物,建立盐酸小檗碱与盐酸黄连碱、盐酸巴马汀间的相对校正因子( $f_{si}$ )及相对保留时间,并计算各成分的量,达到使用 1 种对照品对多种成分进行同步定量测定的目的。同时采用外标法同步测定,验证一测多评法所得结果的准确性和可靠性。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 PDA 检测器, Empower 色谱工作站软件;电子分析天平:感量 0.00001 g;KQ3200 型超声波清洗器;乙腈,色谱纯,购自默克公司;甲醇、盐酸等试剂均为分析纯,购自国药化学试剂有限公司;水由实验室 MILLIPORE 超纯水仪自制。

1.2 试剂 盐酸小檗碱对照品(批号 Z0221507),购自中国兽药药品监察所;盐酸黄连碱对照品(批号 112026 - 201802)、盐酸巴马汀对照品(批号 110732 - 201812)均购自中国食品药品检定研究院。白头翁口服液分别购自北京、山东等地。

## 2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立及方法学考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g,再以磷酸调节 pH 为 4.0);流速:1.0

mL/min;检测波长:347 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

2.1.2 对照品储备溶液的制备 取盐酸黄连碱对照品、盐酸巴马汀对照品、盐酸小檗碱对照品各约 10 mg,精密称定,分别置 25 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为盐酸黄连碱对照品储备溶液、盐酸巴马汀对照品储备溶液、盐酸小檗碱对照品储备溶液。

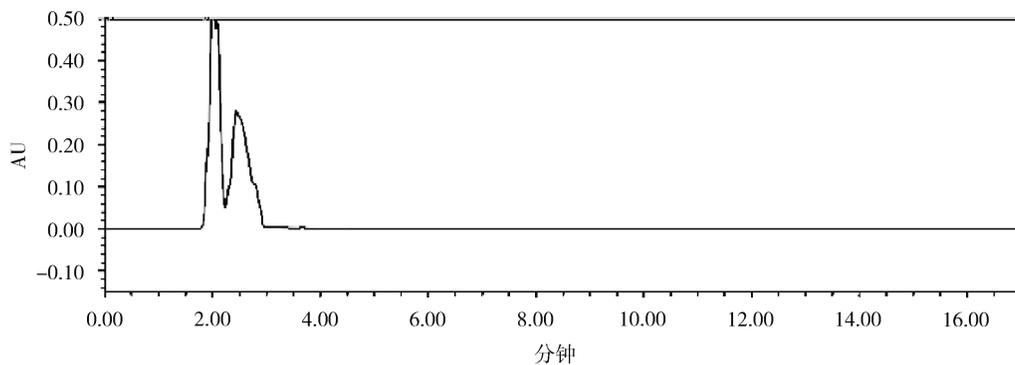
2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取供试品溶液 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇 - 盐酸(100:1)的混合溶液适量,超声 10 min,放置至室温,加甲醇 - 盐酸(100:1)的混合溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.1.4 阴性供试品溶液的制备 实验室照白头翁口服液制法自制,即取白头翁 30 g、秦皮 30 g,每次加水 100 mL 煎煮,煎煮 3 次,合并煎液,滤过,滤液加入乙醇,使含醇量达到 75%,静置 12 h,滤取上清液回收乙醇,加水调至 97.5 mL,即得。

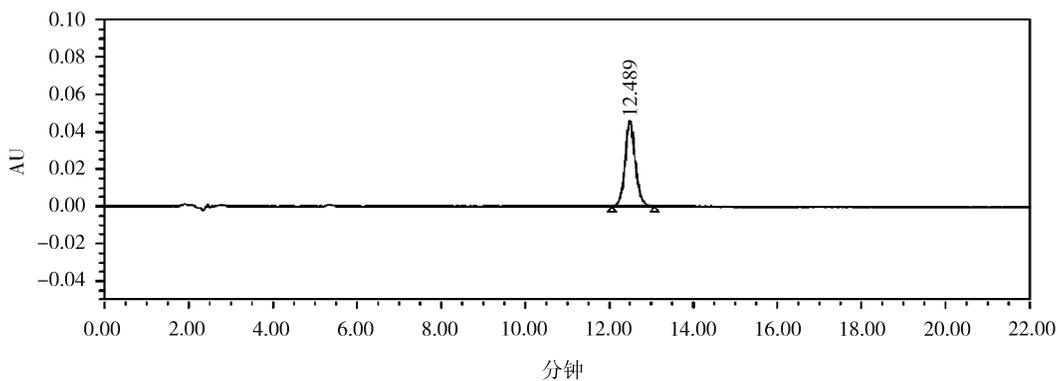
2.1.5 专属性试验 分别吸取阴性供试品溶液、各对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,照“2.1.1”项下色谱条件测定。盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱与相应的对照品色谱峰保留时间一致,达到基线分离。阴性供试品溶液色谱中与各成分峰相应的保留时间处无吸收峰,表明制剂中其他成分对测定无干扰,结果见图 1。

2.1.6 检测波长的选择 照“2.1.1”项下色谱条件,分别进样对照品溶液和供试品溶液,所得紫外吸收光谱图见图 2。综合《中国兽药典》2015 年版二部中黄连含量测定项下 345 nm 的检测波长,选择 347 nm 作为白头翁口服液含量测定的测定波长。

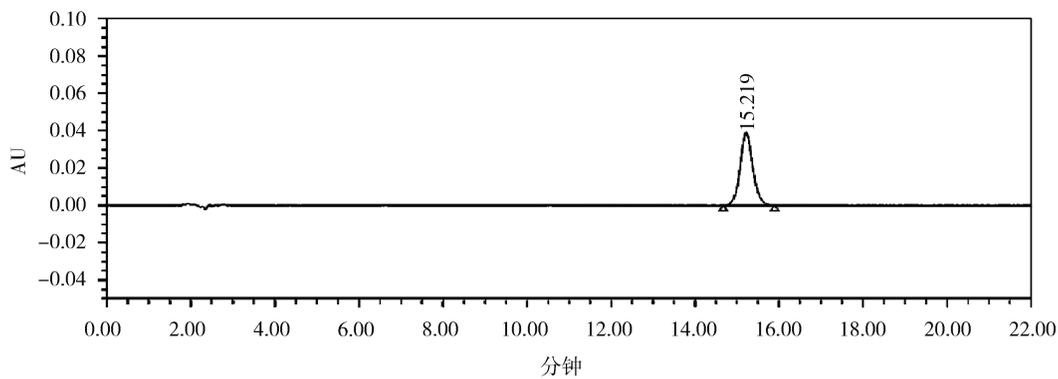
2.1.7 线性关系考察 精密量取盐酸黄连碱对照品储备溶液、盐酸巴马汀对照品储备溶液、盐酸小檗碱对照品储备溶液适量,置量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 0.5、1、2.5、5、10、20 μg/mL 6 个浓度的混合对照品溶液,滤过,分别进样 10 μL,



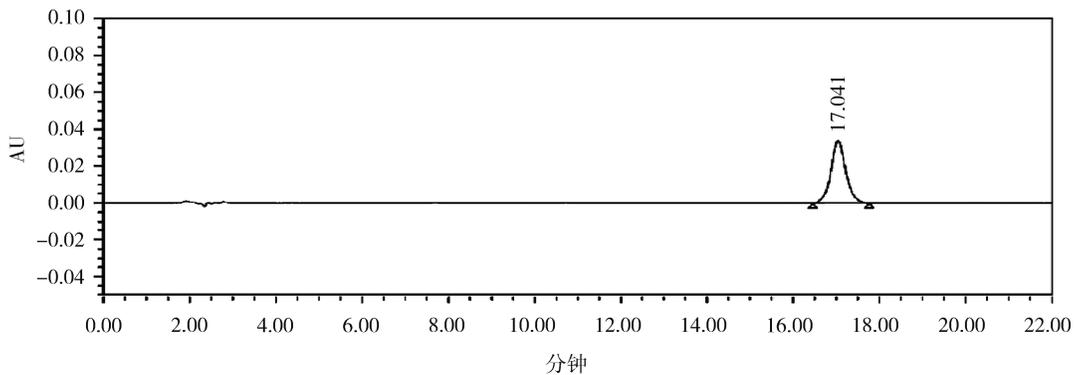
(a)



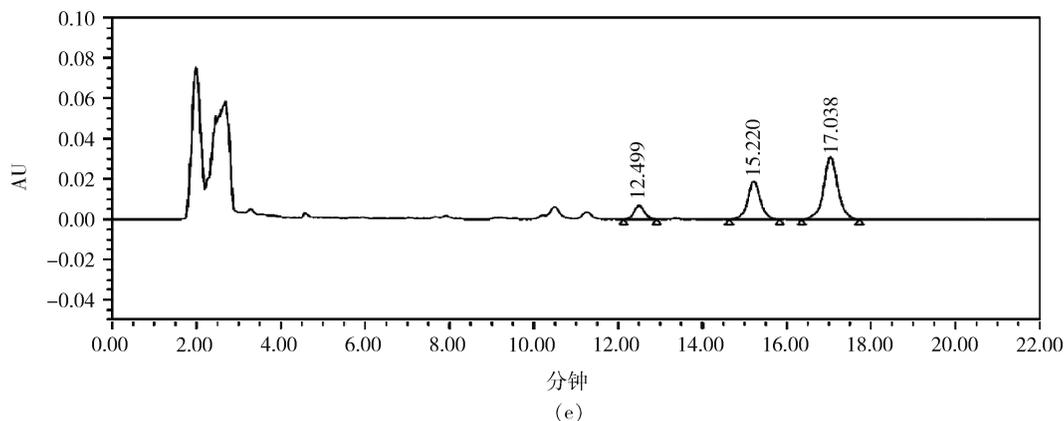
(b)



(c)



(d)



a. 阴性供试品溶液; b. 盐酸黄连碱对照品溶液; c. 盐酸巴马汀对照品溶液; d. 盐酸小檗碱对照品溶液; e. 供试品溶液

a. Negative sample solution; b. Coptisine hydrochloride reference solution; c. Parmatine hydrochloride reference substance solution; d. Berberine Hydrochloride Reference Solution; e. Test solution

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 The high performance liquid chromatogram

测定。以对照品溶液浓度为横坐标( $X$ ),峰面积积分为纵坐标( $Y$ ),分别绘制标准曲线,得盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱回归方程( $n=6$ ):  
 $Y=79669X+2867.4, r=1.00$ ;  $Y=76963X+2281.4, r=1.00$ ;  $Y=77018X+3179, r=1.00$ 。结果表明,盐酸黄连碱在  $0.5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 、盐酸巴马汀在  $0.5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱在  $0.5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$  范围内,峰面积与溶液浓度线性关系良好,见图 3。

2.1.8 精密度试验 精密吸取“2.1.7”项下的同一混合对照品溶液  $10 \mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,记录峰面积,结果盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的  $RSD$  分别为  $0.33\%$ 、 $0.49\%$ 、 $0.53\%$ ,表明方法精密度良好。

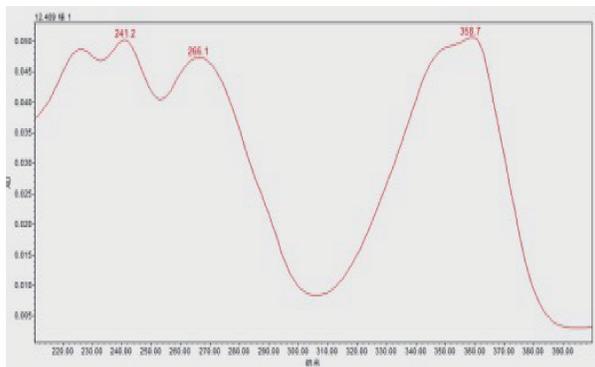
2.1.9 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液  $10 \mu\text{L}$ ,分别在  $0, 6, 12, 24 \text{ h}$  进样测定,记录峰面积,结果盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的  $RSD$  分别为  $0.20\%$ 、 $0.62\%$ 、 $0.14\%$ ,表明供试品溶液在  $24 \text{ h}$  内稳定。

2.1.10 重复性试验 精密量取同一供试品 6 份,分别照“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液,照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,测得

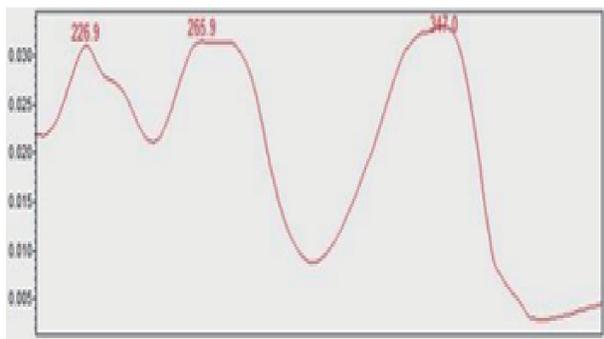
盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的平均含量分别为  $33.16, 122.88, 225.68 \mu\text{g/mL}$ ,  $RSD$  分别为  $0.36\%$ 、 $0.20\%$ 、 $0.21\%$ ,表明方法重复性良好。

2.1.11 定量限与检出限 精密吸取“2.1.2”项下的对照品储备溶液,取适量混合并逐步稀释,取稀释后溶液进样检测。按照 10 倍噪音计算定量限,盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的定量限浓度均为  $0.20 \mu\text{g/mL}$ ;按照 3 倍噪音计算检出限,盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的检出限浓度均为  $0.10 \mu\text{g/mL}$ 。

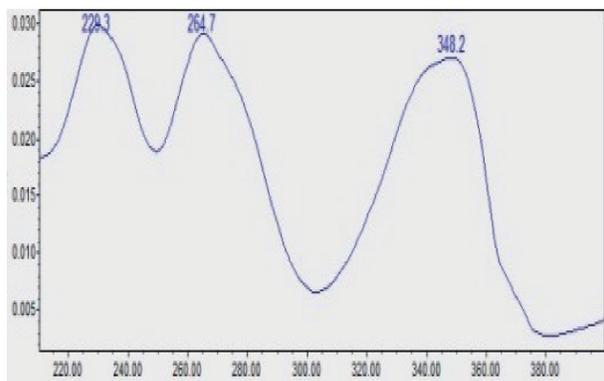
2.1.12 回收率试验 供试品溶液中盐酸黄连碱的量为  $66.31 \mu\text{g}$ 、盐酸巴马汀的量为  $245.77 \mu\text{g}$ 、盐酸小檗碱的量为  $451.36 \mu\text{g}$ 。添加等量对照品,盐酸黄连碱添加量为  $65.00 \mu\text{g}$ 、盐酸巴马汀添加量为  $240.00 \mu\text{g}$ 、盐酸小檗碱添加量为  $450 \mu\text{g}$ ,各平行 6 份,照“2.1.1”项下色谱条件测定,计算加标回收率(表 1)。其中,盐酸黄连碱的平均回收率为  $99.34\%$ ,  $RSD$  值为  $0.67\%$ ;盐酸巴马汀的平均回收率为  $97.20\%$ ,  $RSD$  值为  $0.31\%$ ;盐酸小檗碱的平均回收率为  $98.72\%$ ,  $RSD$  值为  $0.25\%$ 。上述试验表明该方法回收率高。



(a)



(b)



(c)

(a) 盐酸黄连碱紫外吸收光谱;

(b) 盐酸巴马汀紫外吸收光谱;

(c) 盐酸小檗碱紫外吸收光谱

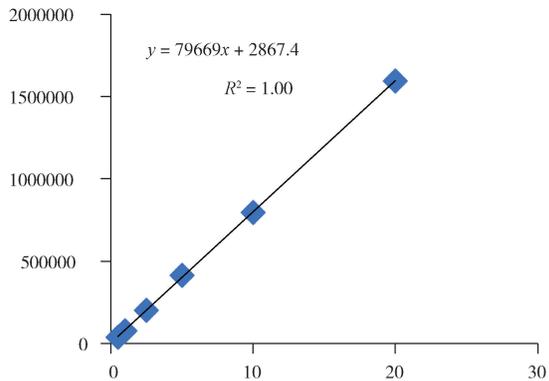
(a) Ultraviolet absorption of coptisine hydrochloride;

(b) Ultraviolet absorption of palmatine hydrochloride;

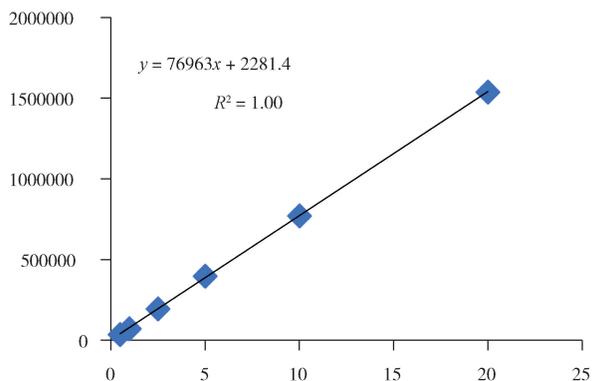
(c) Ultraviolet absorption of berberine hydrochloride

图 2 紫外吸收光谱图

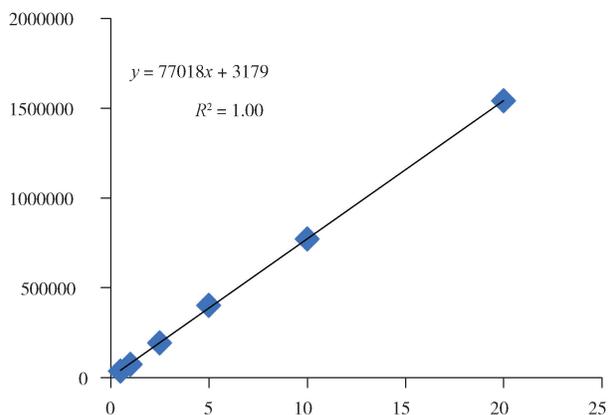
Fig 2 The ultraviolet absorption spectrum



(a)



(b)



(c)

(a) 盐酸黄连碱线性关系图;(b) 盐酸巴马汀线性关系图;

(c) 盐酸小檗碱线性关系图

(a) Linear diagram of coptisine hydrochloride;

(b) Linear relationship diagram of palmatine hydrochloride;

(c) Linear relationship diagram of berberine hydrochloride

图 3 各成分线性关系图

Fig 3 Linear relationship diagram of each component

表 1 加标回收率试验数据表

Tab 1 Sample recovery rate test results

待测成分	本底值/ $\mu\text{g}$	添加量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
盐酸黄连碱	66.31	65.00	130.44	98.66	99.34	0.67
			131.04	99.59		
			131.53	100.33		
			130.51	98.77		
			130.60	98.90		
			131.18	99.80		
盐酸巴马汀	245.77	240.00	479.73	97.48	97.20	0.31
			479.54	97.40		
			479.39	97.35		
			478.95	97.16		
			477.74	96.65		
			478.92	97.15		
盐酸小檗碱	451.36	450	895.41	98.68	98.72	0.25
			894.57	98.49		
			895.07	98.60		
			895.98	98.80		
			895.00	98.59		
			897.65	99.17		

2.2 相对校正因子的确定

2.2.1 相对校正因子的计算 取“2.1.7”项下配制的 6 份混合对照品溶液,每个浓度平行进样 2 针,分别以盐酸黄连碱峰面积、盐酸巴马汀峰面积与盐酸小檗碱峰面积的比值的平均值作为相对校正因子,按下式计算:

$$f_{si} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{A_s/C_s}{A_i/C_i} \quad (1)$$

式中  $A_s$  为内参物对照品(盐酸小檗碱) $s$  峰面积, $C_s$  为内参物对照品(盐酸小檗碱) $s$  浓度; $A_i$  为待测成分对照品(盐酸黄连碱、盐酸巴马汀) $i$  峰面积, $C_i$  为待测成分对照品(盐酸黄连碱、盐酸巴马汀) $i$  浓度。计算得到相对校正因子  $f_{\text{黄连碱/小檗碱}} = 1.02$ ,RSD 值为 1.18%; $f_{\text{巴马汀/小檗碱}} = 1.00$ ,RSD 值为 0.61%。

在测定含量时,内参物(盐酸小檗碱) $s$  的浓度可按常规方法进行测定( $C_s$ ),应用  $f_{si}$ ,结合内参物

(盐酸小檗碱) $s$  实测值  $C_s$ ,计算待测成分(盐酸黄连碱、盐酸巴马汀) $i$  的浓度,按下式计算:

$$C_i = f_{si} \times C_s \times \frac{A_i}{A_s} \quad (2)$$

式中  $A_i$  为供试品中待测成分  $i$  的峰面积,  $C_i$  为供试品中待测成分  $i$  的浓度,  $A_s$  为供试品中内参物  $s$  的峰面积,  $C_s$  为供试品内参物  $s$  的浓度,  $f_{si}$  为内参物  $s$  对待测成分  $i$  的校正因子。

2.2.2 相对保留时间的确定 取“2.1.4”项下配制的混合对照品溶液,采用四种色谱柱:Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ )、资生堂 MG II C18(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ )、Waters Xbridge C18(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ )、资生堂 MG II C18(4.6 mm × 150 mm,5  $\mu\text{m}$ );采用三种流动相比例:有机相 - 水相(52:48)、有机相 - 水相(50:50)、有机相 - 水相(48:52);采用三种流动相 pH 值:3.8、4.0、4.2;采用三种柱温:25  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、

35 ℃, 分别以盐酸黄连碱峰保留时间、盐酸巴马汀峰保留时间与盐酸小檗碱峰保留时间的比值的平均值作为相对保留值, 计算待测成分出峰位置。得

到相对保留时间值  $r_{\text{盐酸黄连碱/盐酸小檗碱}} = 0.74$ ,  $RSD$  值为 1.24%;  $r_{\text{盐酸巴马汀/盐酸小檗碱}} = 0.90$ ,  $RSD$  值为 1.05%, 结果见表 2。

表 2 相对保留时间

Tab 2 Relative retention time

色谱条件	保留时间/min			相对保留时间		
	盐酸黄连碱	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	盐酸黄连碱	盐酸巴马汀	
色谱柱类型	Agilent ZORBAX SB C18 (4.6mm × 250mm, 5μm)	7.542	9.112	10.25	0.7358	0.8890
	资生堂 MG II C18 (4.6mm × 250mm, 5μm)	9.335	11.276	12.672	0.7367	0.8898
	Waters Xbridge C18 (4.6mm × 250mm, 5μm)	12.892	15.899	17.53	0.7354	0.9070
	资生堂 MG II C18 (4.6mm × 150mm, 5μm)	7.907	9.71	10.735	0.7366	0.9045
流动相比例	有机相 - 水相(52:48)	14.921	18.665	20.498	0.7279	0.9106
	有机相 - 水相(48:52)	23.592	28.720	32.201	0.7326	0.8919
流动相 pH	3.8	19.298	23.239	25.805	0.7478	0.9006
	4.2	17.971	21.535	23.822	0.7544	0.9040
柱温/℃	25	20.214	23.876	26.908	0.7512	0.8873
	30	17.461	21.292	23.250	0.7510	0.9158
	35	18.860	22.665	25.138	0.7503	0.9016

2.3 一测多评法与外标法的比较 精密吸取 9 批白头翁口服液各 2 mL, 分别照“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积。采用常规外标法和一测多评法计算各成分的含量。各成

分含量相对偏差见表 3。外标法与一测多评法计算所得的各成分含量的相对偏差均  $\leq 3.26\%$ , 符合《一测多评法建立的技术指南》中样品含量计算值与实测值间相对偏差  $< 5\%$  的考量尺度。

表 3 两种方法所测结果比较

Tab 3 Comparison of the results measured by the two methods

供试品编号	盐酸黄连碱含量 /(mg · mL <sup>-1</sup> ) (外标法)	盐酸黄连碱含量 /(mg · mL <sup>-1</sup> ) (一测多评法)	盐酸巴马汀含量 /(mg · mL <sup>-1</sup> ) (外标法)	盐酸巴马汀含量 /(mg · mL <sup>-1</sup> ) (一测多评法)	黄连碱含量 相对偏差/%	巴马汀含量 相对偏差/%
1	0.033	0.034	0.123	0.124	2.09	0.24
2	0.113	0.116	0.338	0.339	1.38	0.14
3	0.030	0.031	0.262	0.263	2.40	0.12
4	0.030	0.031	0.059	0.060	2.33	0.88
5	0.067	0.069	0.163	0.164	1.63	0.33
6	0.027	0.028	0.060	0.061	2.51	0.88
7	0.018	0.019	0.045	0.046	3.26	1.15
8	0.023	0.025	0.027	0.028	2.65	2.01
9	0.227	0.233	0.684	0.685	1.19	0.05

### 3 结果与讨论

一测多评法是利用中药有效成分间的内在函数和比例关系,以样品中某一典型成分为内参物,建立其与其他待测成分间的相对校正因子,通过相对校正因子,计算得其他待测成分的含量,从而实现测定一个代表性成分同步监测多个指标性成分的目的<sup>[5]</sup>。盐酸小檗碱对照品来源充足,化学性质稳定,在药材中含量高,故选择盐酸小檗碱作为内参物能够充分体现一测多评法低成本高效率的优势<sup>[6]</sup>。

在一测多评法中,色谱系统误差是影响其准确性的关键因素。色谱系统误差因素包括流动相的组成比例、pH 值、柱温、流速、色谱柱类型等。研究中采用相对保留时间值对待测组分色谱峰进行定位,分别从 4 种不同品牌色谱柱、不同流速、柱温等因素对相对校正因子和相对保留时间的重复性进行考察,结果 RSD 均 < 2%,表明建立的一测多评法系统适用性较好。

将一测多评法应用于白头翁口服液的质量评价体系中,具有快速、简便、低成本等优点,可有效应对化学对照品昂贵、检验过程繁琐复杂的局面,为白头翁口服液质量控制提供了新的思路与数据支撑。

### 参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2017 年版[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary drug quality standards, 2017 edition[S].

- [2] 杨念云,张启春,唐志书,等. 黄连生物碱类资源性化学成分研究进展与利用策略[J]. 中草药, 2019, 50(20): 5080-5087.  
Yang N Y, Zhang Q C, Tang Z S, *et al.* Research progress and utilization strategy on alkaloid resource chemistry of *Coptidis Rhizoma*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(20): 5080-5087.
- [3] 张璐,龚旭昊,范强,等. 白头翁口服液质量标准研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(12): 23-30.  
Zhang L, Gong X H, Fan Q, *et al.* Study on quality standard of Baitouweng oral solution [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(12): 23-30.
- [4] 王智民,钱忠直,王峥涛,等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.  
Wang Z M, Qian Z Z, Wang Z T, *et al.* Technical guide for the establishment of quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(6): 657-658.
- [5] 梁小银,严萍,詹若挺,等. 新胃乃安片中 4 中异黄酮成分的含量测定及一测多评法的建立[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 370-374.  
Liang X Y, Yan P, Zhan R T, *et al.* Simultaneous determination of four isoflavonoids in Xin Wei Nai An tablet and establishment of a quantitative analysis method of multi-component with a single-marker[J]. Mod Chin Med, 2019, 21(3): 370-374.
- [6] 廖辉,张璐,杨红霞,等. 一测多评法测定双黄连口服液中 4 种指标性成分[J]. 海峡药学, 2020, 32(2): 55-57.  
Liao H, Zhang L, Yang H X, *et al.* Simultaneous determination of four index components in Shuanghuanglian oral liquid by QAMS [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2020, 32(2): 55-57.

(编辑:李文平)