

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.08

# UPLC 法同时测定苦参功劳颗粒中苦参碱和 盐酸小檗碱的含量

刘 栓<sup>1</sup>, 姚路路<sup>2</sup>, 魏 轲<sup>2</sup>, 周 冰<sup>2</sup>, 卞梦芹<sup>2</sup>, 李焕娟<sup>2</sup>, 张 聪<sup>2\*</sup>

(1. 普莱柯生物工程股份有限公司, 河南洛阳 471000; 2. 洛阳惠中兽药有限公司, 河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2022-09-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 04-0054-06 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 建立超高效液相色谱法(UPLC)同时测定苦参功劳颗粒中苦参碱和盐酸小檗碱含量的方法。采用 Acquity BEH C18(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 值至 3.0)为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 214 nm。苦参碱和盐酸小檗碱分别在 12.04 ~ 48.17 μg/mL、13.18 ~ 52.71 μg/mL 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数(*r*)分别为 1.0000、0.9999; 准确度考察中苦参碱和盐酸小檗碱平均加样回收率分别为 99.6% (*RSD* = 1.0%, *n* = 6)、98.9% (*RSD* = 1.0%, *n* = 6)。该方法具有良好的专属性、精密度及准确度, 且操作简便、环境友好, 可用于苦参功劳颗粒的质量控制。

**[关键词]** 苦参碱; 盐酸小檗碱; 超高效液相色谱法; 苦参功劳颗粒

## Determination of Matrine and Berberine Hydrochloride in Kushen Gonglao Granules by UPLC

LIU Shuan<sup>1</sup>, YAO Lu-lu<sup>2</sup>, WEI Ke<sup>2</sup>, ZHOU Bing<sup>2</sup>, BIAN Meng-qin<sup>2</sup>, LI Huan-juan<sup>2</sup>, ZHANG Cong<sup>2\*</sup>

(1. Pulike Biological Engineering Co., Ltd Luoyang, Henan 471000, China,

2. Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd. Luoyang, Henan 471000, China)

Corresponding author: ZHANG Cong, E-mail: zhangcong301@163.com

**Abstract:** To establish a method for simultaneous determination of Matrine and Berberine Hydrochloride in Kushen Gonglao granules. Ultra Performance Liquid Chromatography(UPLC) method was adopted, The separation was performed on a Acquity BEH C18(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with mobile phase consisted of methanol - 0.02 mol/L Potassium dihydrogen phosphate solution (Adjust pH to 3.0 with phosphoric acid), gradient elution, the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 30 °C, The detection wavelength was set at 214 nm. Matrine and Berberine Hydrochloride concentration showed a good relationship with the peak area in 12.04 ~ 48.17 μg/mL (*r* = 1.0000), 13.18 ~ 52.71 μg/mL (*r* = 0.9999); the average recoveries were 99.6% (*RSD* = 1.0%, *n* = 6), 98.9% (*RSD* = 1.0%, *n* = 6). The method has good specificity, precision and accuracy,

作者简介: 刘 栓, 从事兽药研发工作。

通讯作者: 张 聪。E-mail: zhangcong301@163.com

and is easy to operate and friendly to the environment. It can be used for quality control of Kushen Gonglao granules.

**Key words:** Matrine; Berberine Hydrochloride; UPLC; Kushen Gonglao granules

苦参功劳颗粒处方由十大功劳、苦参、木香组成,具有清热燥湿、止痢的功效,该药在临床上用于鸡大肠杆菌病的治疗<sup>[1-2]</sup>。十大功劳为本方的君药,主要功效为清热燥湿、解毒止泻,文献报道以小檗碱、药根碱等为主要成分的十大功劳提取物能消除大肠杆菌的耐药性<sup>[3]</sup>;苦参为本方的臣药,研究表明苦参生物碱对大肠杆菌有明显的抑制效果<sup>[4]</sup>。在该产品的研制注册过程中,本单位建立了盐酸小檗碱的含量测定方法并其进行控制<sup>[5]</sup>,为进一步加强对该产品的质量,本研究拟建立超高效液相色谱法(UPLC)同时测定苦参功劳颗粒中苦参碱和盐酸小檗碱的含量,为提升该制剂的质量控制水平提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 试验材料 Acquity UPLC(配 TUV 型紫外检测器), Waters 公司; XSR205 型电子分析天平, METTLER TOLEDO 公司; KQ-500DB 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

苦参碱对照品(批号 110805-202010, 含量: 98.7%, 中国食品药品检定研究院); 盐酸小檗碱对照品(批号 110713-202015, 含量: 85.9%, 中国食品药品检定研究院); 苦参功劳颗粒(洛阳惠中兽药有限公司, 批号: 20200501、20200502、20200503, 规格: 100 g/袋); 磷酸二氢钾、磷酸为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

## 1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Acquity BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: 以甲醇为流动相 A, 以 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸溶液调节 pH 值至 3.0)为流动相 B, 按表 1 程序进行线性洗脱; 检测波长: 214 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 0.2 mL/min; 进样体积: 2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure		
时间/min Time	A/%	B/%
0	5	95
8	5	95
15	42	58
20	60	40
30	5	95
35	5	95

## 1.2.2 溶液的制备

1.2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品 9.76 mg、盐酸小檗碱对照品 12.27 mg, 置于同一 100 mL 量瓶中, 用 5% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液; 精密量取储备液 5 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用 5% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液(苦参碱浓度为 24.08 μg/mL、盐酸小檗碱浓度为 26.35 μg/mL)。

1.2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量, 研细, 精密称取 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加 5% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

1.2.2.3 阴性对照溶液的制备 按苦参功劳颗粒处方比例和工艺分别制备缺十大功劳阴性对照样品和缺苦参阴性对照样品, 按“1.2.2.2”项下方法分别制备阴性对照溶液。

## 2 结果与分析

2.1 专属性考察 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、缺十大功劳阴性对照溶液和缺苦参阴性对照溶液各 2 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果: 供试品溶液色谱图中, 苦参碱峰和盐酸小檗碱峰与混合对照品溶液相应主峰的保留时间一致, 且阴性对照溶液不干扰苦参碱和盐酸小檗碱

的测定,表明本方法专属性良好,见图 1。

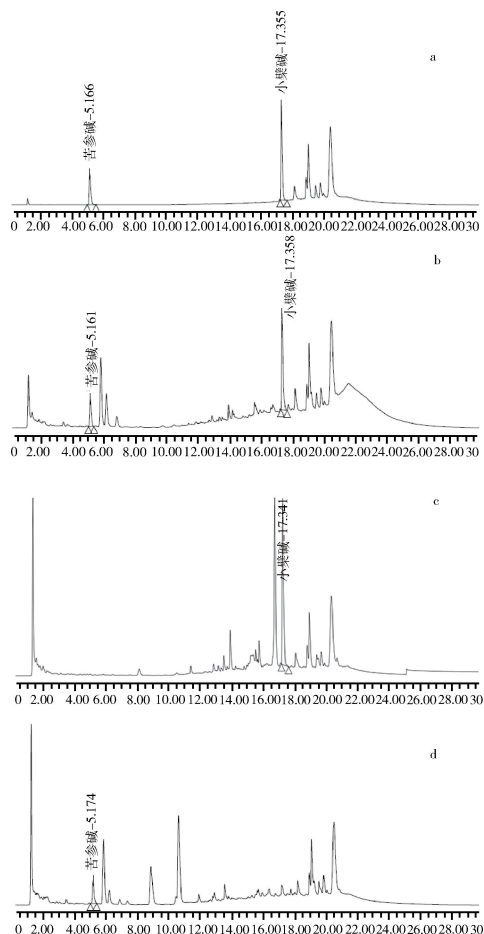


图 1 专属性考察色谱图

Fig 1 Chromatogram of specificity inspection

a. 对照品 b. 供试品 c. 缺苦参阴性对照

d. 缺十大功劳阴性对照

a. reference substance b. test sample c. Lack of

*Sophorae flavescentis radix* negative control

d. Lack of *Mahoniae folium* negative control

2.2 线性及范围考察 取“1.2.2.1”项下混合对照品储备液,依次精密量取 2.5 mL、3.75 mL、5.0 mL、7.5 mL、10.0 mL,分别置 20 mL 量瓶中,用 5% 甲醇稀释至刻度,分别制成含苦参碱 12.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、18.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以及含盐酸小檗碱 13.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、19.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、26.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、39.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、52.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准工作溶液,分别精密吸取上述不同浓度的混合标准工作溶液 2  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱

仪,记录峰面积。以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得苦参碱的回归方程为: $Y = 12472.25X + 1247.20$ , $r = 0.99999$ ;盐酸小檗碱的回归方程为: $Y = 26538.98X + 40305.72$ , $r = 0.99993$ 。结果表明苦参碱在 12.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 48.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内浓度与峰面积线性关系良好;盐酸小檗碱在 13.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 52.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内浓度与峰面积线性关系良好。

2.3 精密度考察 精密吸取“1.2.2.1”项下的混合对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,记录色谱图,测得苦参碱、小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.3%、1.3%,表明仪器精密度良好,见表 2。

表 2 精密度考察结果

Tab 2 Precision test results

编号 NO.	峰面积 peak area						RSD%
	1	2	3	4	5	6	
苦参碱 Matrine	302629	301839	300462	300799	300338	301938	0.3
小檗碱 Berberine	751703	748573	729296	737037	728372	736186	1.3

2.4 重复性考察 精密称取同一批号的供试品(批号:20200501)0.5 g,按上述“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,测得苦参碱、盐酸小檗碱含量的 RSD 分别为 0.8%、0.6%,表明本方法重复性良好,见表 3。

表 3 重复性考察结果

Tab 3 Repeatability test results

编号 NO.	含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) content						RSD%
	1	2	3	4	5	6	
苦参碱 Matrine	2.07	2.10	2.11	2.10	2.07	2.08	0.8
小檗碱 Berberine	2.90	2.91	2.88	2.87	2.89	2.89	0.6

2.5 溶液稳定性考察 取本品,按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于第 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,结果苦参碱、小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.4%、0.3%,结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定

性良好,见表 4。

表 4 溶液稳定性考察结果

Tab 4 Solution stability test results

编号 NO.	峰面积 peak area						RSD%
	1	2	3	4	5	6	
苦参碱 Matrine	268878	267103	267747	267115	266598	266951	0.4
小檗碱 Berberine	835890	830359	830583	830703	831442	831465	0.3

2.6 准确度考察 精密称取已知含量的供试品(批号:20200501)0.25 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,分别精密加入苦参对照品储备液(浓度为 0.09633 mg/mL)5 mL,盐酸小檗碱对照品储备液(浓度为 0.1054 mg/mL)7.5 mL,按“1.2.2.2”项下方法制备加样回收供试品溶液,平行制备 6 份,测定并计算加样回收率,测得苦参碱、小檗碱平均回收率分别为 99.6% (RSD = 1.0%)、98.9% (RSD = 1.0%),表明方法准确度良好,见表 5 和表 6。

表 5 苦参碱回收率考察结果

Tab 5 Test results of matrine recovery

取样/g sample	本底量/mg Amount of sample	加入量/mg Amount of reference substance	测得量/mg Amount of mesured	回收率/% Recovery	平均值/% mean	RSD%
0.24836	0.5191	0.4817	0.9986	99.5%	99.6	1.0
0.25156	0.5258	0.4817	1.0001	98.5%		
0.25085	0.5243	0.4817	1.0070	100.2%		
0.25321	0.5292	0.4817	1.0046	98.7%		
0.25049	0.5235	0.4817	1.0027	99.5%		
0.24859	0.5196	0.4817	1.0058	100.9%		

表 6 盐酸小檗碱回收率考察结果

Tab 6 Test results of Berberine Hydrochloride recovery

取样/g sample	本底量/mg Amount of sample	加入量/mg Amount of reference	测得量/mg Amount of mesured	回收率/% Recovery	平均值/% mean	RSD%
0.24836	0.7178	0.7907	1.4923	98.0%	98.9	1.0
0.25156	0.7270	0.7907	1.5151	99.7%		
0.25085	0.7250	0.7907	1.5070	98.9%		
0.25321	0.7318	0.7907	1.5041	97.7%		
0.25049	0.7239	0.7907	1.5100	99.4%		
0.24859	0.7184	0.7907	1.5070	99.7%		

2.7 样品测定 取苦参功劳颗粒 3 批(批号:20200501、20200502、20200503),按“1.2”项下方法测定样品中苦参碱和盐酸小檗碱的含量,结果见表 7。

表 7 样品含量测定结果

Tab 7 The results of sample content determination

批号 Batch No.	苦参碱含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) Matrine content	盐酸小檗碱含量/(mg·g <sup>-1</sup> ) Berberine Hydrochloride content
20200501	2.1	2.9
20200502	2.0	2.9
20200503	2.1	2.8

### 3 讨论

3.1 仪器测定方法的选择 文献报道测定苦参碱和盐酸小檗碱含量的方法主要有高效液相色谱法<sup>[6-7]</sup>、毛细管电泳法<sup>[8-9]</sup>,相对而言,更多采用高效液相色谱法进行中药中苦参碱和盐酸小檗碱的含量测定。由于苦参碱和盐酸小檗碱化学结构的差异,导致二者的极性和紫外吸收存在较大差异,因此大部分中药产品采用两种方法分别控制盐酸小檗碱和苦参碱的含量<sup>[10-11]</sup>,也有文献报道采用高效液相色谱法同时测定中药中苦参碱和盐酸小檗碱的含量或建立生物碱类成分的指纹图谱<sup>[6-7]</sup>。与高效液相色谱法(HPLC)相比,超高效液相色谱法(UPLC)具有检测时间短、灵敏度高、有机溶剂用量少等优点,因此,本研究选择 UPLC 法同时测定苦参功劳颗粒中苦参碱和盐酸小檗碱的含量。

3.2 检测波长的选择 分别取苦参碱对照品溶液(0.01 mg/mL)与盐酸小檗碱对照品溶液(0.01 mg/mL),采用紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 范围内进行全波长扫描,结果盐酸小檗碱分别在 228、264、347 nm 处有最大吸收峰,苦参碱在扫描范围内无最大吸收峰,仅有较强的末端吸收,两个对照品的紫外光谱图在 214 nm 处交叉,表明相同浓度的对照品溶液在 214 nm 处的紫外吸收强度相近,为使两种成分同时有较好的检测灵敏度,综合考虑,选择 214 nm 作为检测波长。

3.3 色谱分离条件的选择 文献报道的流动相体系主要有乙腈-磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.0)<sup>[6]</sup>、乙腈-磷酸二氢钾缓冲液(pH 8.0)<sup>[7]</sup>,本研究过程中分别考察了以上两个体系的分离效果,采用乙腈-磷酸二氢钾缓冲液(pH 8.0)进行洗脱时,小檗碱峰严重变宽,峰型较差,而采用乙腈-磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.0)进行洗脱时,由于苦参碱出峰较早与其他峰的分度度较差,均不适用。本研究采用甲醇-磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.0)体系进行梯度洗脱,苦参碱和小檗碱峰均有良好的分度度,可同时测定苦参碱和盐酸小檗碱的含量。

3.4 样品处理方法选择 本研究过程中考察采用苦参功劳颗粒质量标准盐酸小檗碱含量测定项下

供试品溶液的制备方法,但样品使用 30% 乙腈超声处理测定时由于溶剂效应导致苦参碱峰裂分。根据苦参碱和盐酸小檗碱的理化性质,二者均可溶于水,为避免溶剂效应,因此选择 5% 甲醇对样品进行溶解后进行测定。

### 4 结论

本研究建立了 UPLC 法同时测定苦参功劳颗粒中苦参碱和盐酸小檗碱的含量,方法学考察结果表明该方法具有良好的专属性、精密度和准确度,可有效控制苦参功劳颗粒的质量,对提高检验效率及提升本产品质量控制水平具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 潘贵珍,李召斌,冻杨美,等. 苦参功劳颗粒对鸡大肠杆菌病治疗效果评价试验[J]. 中国动物保健, 2021, 23(12): 127-130.  
Pan G Z, Li Z B, Dong Y M, *et al.* Evaluation of therapeutic effect of Kushen Gonglao Granules on Chicken Colibacillosis[J]. China Animal Health, 2021, 23(12): 127-130.
- [2] 高艳艳,高富红,张晓会,等. 苦参功劳颗粒治疗鸡大肠杆菌病的Ⅲ期临床试验[J]. 中国动物保健, 2018, 20(10): 48-51.  
Gao Y Y, Gao F H, Zhang X H, *et al.* Phase III clinical trial of Kushen Gonglao granules in the treatment of Chicken Colibacillosis [J]. China Animal Health, 2018, 20(10): 48-51.
- [3] 张秀英,高光,段文龙,等. 十大功劳对大肠杆菌耐药性的消除作用[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(01): 108-110.  
Zhang X Y, Gao G, Duan W L, *et al.* The elimination of the E. coli's resistance by mahonia[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2012, 32(01): 108-110.
- [4] 陈度煌. 苦参生物碱体外抗菌活性研究[J]. 中国动物保健, 2010, 12(01): 28-30.  
Chen D H. Study on antibacterial activity of Sophora flavescens alkaloids *in vitro* [J]. China Animal Health, 2010, 12(01): 28-30.
- [5] 杨会鲜,姚路路,周冰,等. 苦参功劳颗粒中盐酸小檗碱含量测定研究[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(01): 41-45.  
Yang H X, Yao L L, Zhou B, *et al.* Determination of Berberine Hydrochloride in Kushen Gonglao Granules [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(01): 41-45.
- [6] 孙承浩,董斌,谭无名. HPLC 法同时分析测定妇炎康复片中

- 4 个生物碱成分[J]. 临床军医杂志, 2015, 43(12): 1226-1229.
- Sun C H, Dong B, Tan W M. Determination of four alkaloids in Fuyankangfu tablets by HPLC[J]. Clinical Journal of Medical Officers, 2015, 43(12): 1226-1229.
- [7] 邓红,张蜀,林华庆,等. 山黄口腔贴片中生物碱类成分的指纹图谱鉴别及苦参碱的含量测定[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(16): 1577-1580.
- Deng H, Zhang S, Lin H Q, *et al.* Qualitative fingerprint of alkaloid and quantitative assay of matrine in Shanhuang buccal adherent tablets[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2009, 18(16): 1577-1580.
- [8] 谢梦婷,王晓可,毋福海. 毛细管电泳法同时测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、苦参碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 113-116.
- Xie M T, Wang X K, Wu F H. Simultaneous Determination of Berberine Hydrochloride, Phellodendrine Hydrochloride and Matrine in Qingfei Yihuo Pills by Capillary Electrophoresis Method[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(13): 113-116.
- [9] 班丽娜,许海棠,徐远金. 桂林西瓜霜喷剂中盐酸小檗碱、苦参碱与黄芩苷的毛细管电泳测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(11): 1217-1220.
- Ban L N, Xu H T, Xu Y J. Determination of Berberine Hydrochloride, Matrine and Baicalin in Guilin Watermelon Frost by Capillary Electrophoresis [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2008, 27(11): 1217-1220.
- [10] 曾金,李萍,欧人豪,等. 参柏湿疹搽剂质量控制方法研究[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(3): 21-32.
- Zeng J, Li P, Ou R H, *et al.* Study on the quality control method of Shen Bo Eczema Liniment [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2022, 31(3): 21-32.
- [11] 欧燕,李希,张嵩,等. 消炎洗散质量标准研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 629-633.
- Ou Y, Li X, Zhang S, *et al.* Quality standard of Xiaoyanxi Powder[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 011, 33(4): 629-633.

(编辑:陈希)