

高效液相色谱法同时测定黄连解毒胶囊中5组分的含量

雷 鹏*, 刘 韶, 李新中, 钱康年(中南大学湘雅医院药剂科, 长沙市 410008)

中图分类号 R927.2 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2005)12-0940-02

摘要 目的: 建立以高效液相色谱法同时测定黄连解毒胶囊中盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷含量的方法。方法: 采用3种紫外检测波长同时进行测定, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为水-甲醇-0.05%磷酸(梯度洗脱), 柱温为35℃, 流速为1.0ml/min, 检测波长为345、280、238nm, 进样量为10μl。结果: 盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷进样量分别在0.105μg~1.680μg($r=0.999$)、0.045μg~0.720μg($r=0.998$)、0.065μg~1.040μg($r=0.997$)、0.190μg~3.040μg($r=0.999$)、0.145μg~2.320μg($r=0.999$)范围内呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为99.11%、98.19%、97.21%、98.52%、99.22%。结论: 本方法快速、重现性好、灵敏度高, 可为黄连解毒胶囊提供更合理、可靠的质量控制方法。
关键词 高效液相色谱法; 黄连解毒胶囊; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马亭; 盐酸药根碱; 黄芩苷; 栀子苷; 含量

Simultaneous Determination of 5 Compositions in Coptis Chinensis Detoxication Capsule by HPLC

LEI Peng, LIU Shao, LI Xinzong, QIAN Kangnian(Dept. of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determinate simultaneously the contents of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, baicalin and jasmionidin in coptis chinensis detoxication capsule by HPLC. METHODS: 3 different UV wavelengths were adopted simultaneous in the determination in which Diamonsil C₁₈ was taken as the chromatographic column and water-methanol-0.05% H₃PO₄(gradient elution) was taken as mobile phase, the column temperature was set at 35℃ and the flow rate was 1.0ml/min, the detection wavelength were 345nm, 280nm and 238nm respectively and the sample size was 10μl. RESULTS: They took good linear relationships when the respective sample size of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, baicalin and jasmionidin were at 0.105μg~1.680μg($r=0.999$), 0.045μg~0.720μg($r=0.998$), 0.065μg~1.040μg($r=0.997$), 0.190μg~3.040μg($r=0.999$) and 0.145μg~2.320μg($r=0.999$); Their respective average recovery rates were 99.11%, 98.19%, 97.21%, 98.52% and 99.22%. CONCLUSION: This method is fast, reproducible, sensitive, and which can provide a more reasonable and reliable quality control for coptis chinensis detoxication capsule.

KEY WORDS HPLC; Coptis chinensis detoxication capsule; Berberine hydrochloride; Palmatine hydrochloride; Jatrorrhizine hydrochloride; Baicalin; Jasmionidin; Content

黄连解毒汤原载于唐代王焘所著的《外台秘要》, 由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成, 为清热解毒的代表方。近年来, 其被用于高血压、中风后遗症、老年痴呆症等的治疗。在日本, 黄连解毒汤是汉方常用处方之一, 临床上主要用于治疗高血压, 并有数家汉方药公司生产黄连解毒汤颗粒剂, 如东洋黄连解毒汤、津村黄连解毒汤等, 但国内未见有厂家生产。黄连解毒胶囊即是中南大学湘雅医院根据黄连解毒汤研制的一种医院制剂, 在临床上用于治疗高血压并被证实具有良好的疗效。现代药理实验表明, 该方中生物碱、黄酮类、环烯醚萜苷类物质均为主要活性成分^[1]。为更好地控制黄连解毒胶囊的质量, 笔者采用二极管阵列检测器(DAD), 根据黄连解毒胶囊中3类组分不同的光谱特性, 建立了在3个紫外检测波长下同时测定其中3类组分(包括5个成分)含量的方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1100 高效液相色谱仪, 包括 G1311A 型四元梯度泵、G1313A 型自动进样器(美国 Agilent 公司); G1315A 型 DAD(美国惠普公司); AG285 型分析天平(瑞士 Mettler Toled 公司); KS-600D 超声清洗机(浙江宁波海曙科生超声设备有限公司)。

* 主管药师, 讲师, 硕士。研究方向: 中药新药研发。电话: 0731-4327460

1.2 试药

盐酸小檗碱对照品(批号: 0713-9906)、盐酸药根碱对照品(批号: 0733-200004)、黄芩苷对照品(批号: 0715-9909)、栀子苷对照品(批号: 749-200108)(均由中国药品生物制品检定所提供); 盐酸巴马亭(中南大学湘雅医院药剂科自制, 归一法计算含量大于98%); 黄连解毒胶囊(中南大学湘雅医院药剂科自制, 批号: 20040108、20040506、20040507、20040508、20040601); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm); 流动相由水(A)、甲醇(B)、0.05%磷酸(C)组成, 并采用梯度洗脱(梯度洗脱程序详见表1); 检测波长: 345、280、238nm; 柱温: 35℃; 流速 1ml/min; 进样量: 10μl。理论塔板数按盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷计算, 均应不低于10000, 对照品和样品色谱详见图1。

2.2 对照品溶液的制备及线性关系考察

准确称取盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷对照品各适量, 加入甲醇溶解并配制成浓度分别为0.168、0.072、0.104、0.304、0.232mg/ml的混合对照品储备液。分别精密吸取该贮备液适量, 稀释成系列浓度的对照品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样, 以峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归, 即得各组分的线性回归方程, 详见表2。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间 (min)	流动相组成		
	A (%)	B (%)	C (%)
0	45	25	30
10	30	40	30
15	0	80	20
20	0	90	10

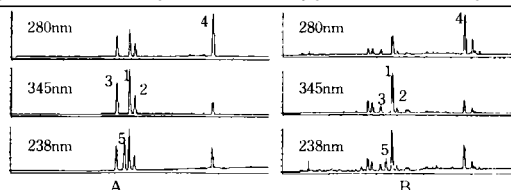


图 1 高效液相色谱

A. 对照品; B. 样品; 1. 盐酸小檗碱; 2. 盐酸巴马亭; 3. 盐酸药根碱;
4. 黄芩苷; 5. 栀子苷

Fig 1 HPLC

A. control substance; B. sample; 1. berberine hydrochloride;
2. palmatine hydrochloride; 3. jatrorrhizine hydrochloride; 4. baicalin;
5. Jasmninoidin;

表 2 线性关系考察结果

Tab 2 Results of linear relationship determination

组分	线性范围(μg)	回归方程	r
盐酸小檗碱	0.105~1.680	$Y = 0.262X + 8.094$	0.9999
盐酸巴马亭	0.045~0.720	$Y = 0.274X + 0.947$	0.9998
盐酸药根碱	0.065~1.040	$Y = 0.255X + 3.490$	0.9997
黄芩苷	0.190~3.040	$Y = 0.674X - 14.271$	0.9999
栀子苷	0.145~2.320	$Y = 0.303X - 7.521$	0.9999

由表 1 可知, 各组分在各自浓度范围内线性关系均良好。

2.3 样品溶液的制备

取黄连解毒胶囊内容物适量, 研成细粉, 取约 0.1g, 准确称定, 置于 100ml 具塞锥形瓶中, 再精密加入甲醇 40ml, 称重, 超声振荡 30min 后, 于室温放置 30min, 用甲醇补足损失重量, 摇匀, 过滤, 续滤液以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2”项下混合对照品贮备液稀释 2 倍后的对照品溶液 10 μl , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 测定峰面积积分值。结果, 盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷峰面积积分值相对标准差分别为 0.26%、0.30%、0.26%、0.25%、0.20%。

2.5 稳定性试验

取同一批(批号: 20040108)样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12h 进样 10 μl , 测定峰面积积分值。结果, 盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷峰面积积分值相对标准差分别为 0.33%、0.27%、0.66%、0.28%、0.39%。表明样品溶液在 0h~12h 内稳定性良好。

2.6 重现性试验

取同一批(批号: 20040108)样品 5 份, 按“2.3”项下样品溶液制备方法平行制备 5 份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积积分值。结果, 盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷峰面积积分值相对标准差分别为 0.89%、1.12%、1.45%、0.68%、1.34%。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的黄连解毒胶囊 5 份, 每份约 0.05g, 准确称定, 分别加入浓度为 0.168、0.072、0.104、0.304、0.232mg/ml 的盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷混合对照品溶液 10ml, 按 2.3 项下方法制备并测定, 计算含量, 结果详见表 3。

表 3 加样回收率试验结果(n=5)

Tab 3 Results of recovery test(n=5)

组分	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	平均回收率 (%)	RSD(%)
盐酸小檗碱	2.020	1.680	3.685	99.11	1.68
盐酸巴马亭	0.630	0.720	1.337	98.19	1.93
盐酸药根碱	0.950	1.040	1.961	97.21	1.81
黄芩苷	2.930	3.040	5.925	98.52	1.85
栀子苷	1.450	2.320	3.752	99.22	1.24

2.8 样品含量测定

精密吸取“2.2”项下混合对照品贮备液稀释 2 倍后的对照品溶液, 与“2.3”项下样品溶液各 10 μl , 按“2.1”项下色谱条件进样, 并计算各样品中盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱、黄芩苷、栀子苷的含量, 结果详见表 4。

表 4 样品含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=3)

批号	盐酸小檗碱 (mg/粒)	盐酸巴马亭 (mg/粒)	盐酸药根碱 (mg/粒)	黄芩苷 (mg/粒)	栀子苷 (mg/粒)
20040506	9.80	3.96	1.82	12.30	6.58
20040507	9.69	3.74	1.80	9.14	5.90
20040508	8.83	2.34	1.13	9.30	10.82
20040601	14.48	4.97	2.36	7.35	6.95

3 讨论

笔者采用 DAD 在 200nm~600nm 波长范围内进行扫描, 结果表明, 生物碱类成分在 345nm 波长处有最大吸收, 黄酮类成分在 280nm 波长处有最大吸收, 栀子苷在 240nm 波长处有最大吸收。为使各组分达到吸收强、干扰小的目的, 笔者选择于 345nm 波长处测定盐酸小檗碱、盐酸巴马亭、盐酸药根碱, 280nm 波长处测定黄芩苷及 240nm 波长处测定栀子苷。

由于黄连解毒胶囊的化学成分众多, 且生物碱、黄酮类、环烯醚萜苷类物质的成分差异较大, 采用等梯度洗脱难以达到有效分离, 故笔者尝试了甲醇-水、乙腈-水、甲醇和乙腈(改变二者比例)-水等体系, 并在流动相中添加磷酸(H_3PO_4)或四氢呋喃, 以调节 pH 值或极性。结果表明, 加入 H_3PO_4 使体系呈弱酸性能够改善峰形及分离度。经过条件优化, 最终确定了本文所述的色谱条件, 并得到在每个波长下均分离理想的检测结果。其中, 盐酸小檗碱、盐酸药根碱与栀子苷保留时间较为接近, 但采用不同波长检测可使其互不干扰。

运用高效液相色谱法研究复方中成药化学成分的文獻已有不少, 但绝大部分只对其中的单一成分(如盐酸小檗碱)进行定量测定^[2,3], 小部分对某一类物质几个成分进行了定量分析^[4], 而至今未见运用高效液相色谱法对黄连解毒胶囊中 3 类成分进行同时测定的文献报道。本文中笔者所建立的分析方法, 在 25min 内可同时测定黄连解毒胶囊的 3 类 5 个主要成分的含量, 将为黄连解毒胶囊及黄连解毒汤的深入研究和评价提供有利的方法和依据, 并为同时测定中药复方制剂中多类组分提供新的模式, 也提供了更加简便、合理、可靠的质量控制依据。

参考文献

- [1] 陈光亮, 张秀荣, 王饮茂. 黄连解毒汤药理研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(5): 67.
- [2] 晏媛, 陈娜娜, 郭丹, 等. 反相高效液相色谱法测定胃必宁片中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房, 2003, 14(7): 427.
- [3] 姚国新, 张晓燕, 朱美艳. 高效液相色谱法测定黄连解毒汤中小檗碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(5): 276.
- [4] 洪筱坤, 王凌, 王智华. 黄连解毒汤中生物碱的多组分分析研究[J]. 上海中医药大学学报, 1999, 13(2): 51.

(收稿日期: 2004-12-10 修回日期: 2005-01-03)