

黄金膏中盐酸小檗碱的定性鉴别与含量测定^Δ

陈良*, 刘炜, 葛朝伦, 田红林[#](新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4262-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.30

摘要 目的:建立黄金膏中盐酸小檗碱的定性鉴别与含量测定方法。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的盐酸小檗碱进行定性鉴别,采用高效液相色谱法对制剂中盐酸小檗碱进行含量测定。色谱柱为Symmetry Shield Rp-18,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(50:50, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为265 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:制剂中盐酸小檗碱的TLC斑点清晰,分离度好。盐酸小檗碱检测质量浓度线性范围为2.5~20.0 μg/ml($r=0.999\ 0$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率为97.7%~102.1%,RSD为1.68%($n=6$)。结论:该方法简便易行、准确、重复性好,可用于黄金膏中盐酸小檗碱的定性鉴别与含量测定。

关键词 黄金膏;盐酸小檗碱;薄层色谱法;高效液相色谱法

Qualitative Identification and Content Determination of Berberine Hydrochloride in Huangjin Paste

CHEN Liang, LIU Wei, GE Chao-lun, TIAN Hong-lin(Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the qualitative identification and content determination of berberine hydrochloride in Huangjin paste. METHODS: TLC was adopted for the qualitative identification of berberine hydrochloride and HPLC was conducted for the content determination of berberine hydrochloride in preparation. The column was Symmetry Shield Rp-18 with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (50:50, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 265 nm, column temperature was 30 ℃ and injection volume was 10 μl. RESULTS: TLC spots of berberine hydrochloride in preparation were clear and well-separated. The linear range of berberine hydrochloride was 2.5-20.0 μg/ml($r=0.999\ 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 97.7%-102.1% (RSD=1.68%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the qualitative identification and content determination of berberine hydrochloride in Huangjin paste.

KEYWORDS Huangjin paste; Berberine hydrochloride; TLC; HPLC

黄金膏是由黄柏、大黄、陈皮、厚朴等中药组成的外用制剂,具有消肿止痛的作用,临床常用于无名肿痛、乳痈初起红肿、湿疮丹毒、瘟毒发颐、两腮红肿、灼热疼痛的治疗。目前未见黄金膏中盐酸小檗碱的定性、定量研究报告。为加强制剂的质量控制,保证用药安全、有效,笔者采用薄层色谱(TLC)法^[1]对黄金膏中的盐酸小檗碱进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对其进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器

Centra-20型紫外-可见分光光度计(澳大利亚GBC公司);2695型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Waters公司);AL204型电子天平、AG135型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SK3300LH型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 药品与试剂

黄金膏(新疆医科大学附属中医医院自制,批号:20140806、20140809、20140810);盐酸小檗碱对照品(中国食

品药品检定研究院,批号:120937-201007,纯度:100%);黄柏对照药材(新疆奇康哈博维药有限公司,批号:20130106)。甲醇、乙腈为色谱纯;乙酸乙酯、甲苯、石油醚(沸程:60~90 ℃)、石油醚(沸程:30~60 ℃)、2-丁酮均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别^[2-4]

取黄金膏4.0 g,加乙醚10 ml,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)处理2次,每次5 min,以半径13.5 cm、3 000 r/min离心10 min,倾去乙醚液,残渣加甲醇10 ml使溶解,超声处理5 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇5 ml使溶解,作为供试品溶液。取4.0 g缺黄柏的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。取黄柏药材4.0 g,加水50 ml,煮沸30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇10 ml使溶解,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。另取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.1 mg的对照品溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]试验,吸取上述4种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:7:1:1, V/V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰,详见图1。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验^[5-6] 色谱柱:Symmetry

^Δ 基金项目:新疆医科大学附属中医医院院级课题(No.ZYY201332)

* 主管中药师。研究方向:中药新药研发。E-mail:864358450@qq.com

[#] 通信作者:副主任中药师。研究方向:中药鉴定及新药研发。E-mail:zzqzyyyyscl@sina.com

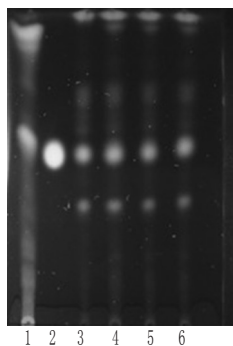


图1 薄层色谱图

1.阴性对照;2.对照品;3.对照药材;4~6.供试品(批号:20140806、20140809、20140810)

Fig 1 TLC chromatogram

1.negative control;2.reference substance;3.control medicinal herb;4-6.test samples (batch number :20140806, 20140809, 20140810)

Shield Rp-18(150 mm×3.9 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(每100 ml加十二烷基磺酸钠0.1 g)(50:50, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:265 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数以盐酸小檗碱峰计应不少于4 000,分离度>1.5;当信噪比为10时,定量限为6 ng,当信噪比为3:1时,检出限为2 ng,详见图2。

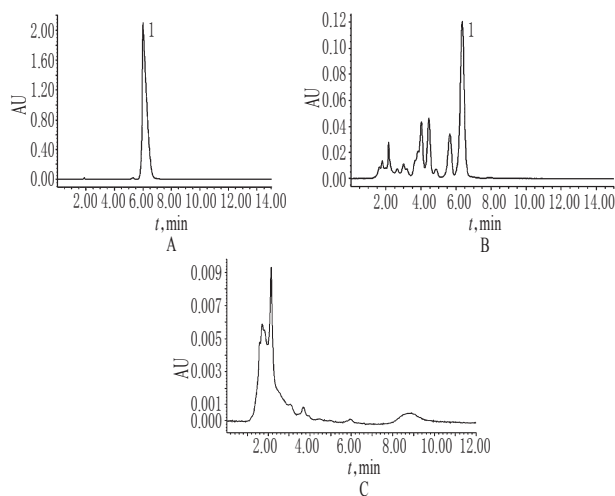


图2 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.盐酸小檗碱

Fig 2 HPLC chromatogram

A.reference substance;B.test sample;C.negative control; 1.berberine hydrochloride

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加流动相溶解,制成每1 ml含0.1 mg的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品约0.2 g,精密称定,置于50 ml量瓶中,加流动相45 ml,超声处理45 min,放冷,用流动相定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按黄金膏的处方和制备工艺制备缺黄柏的阴性样品,取适量按“2.2.3”项下方法操作,即得阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别加流动相制成质量浓度为2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/ml的系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面

积。以盐酸小檗碱峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=1.0317x \times 10^{-5} + 0.01094$ ($r=0.9990$)。结果表明,盐酸小檗碱检测质量浓度线性范围为2.5~20.0 μg/ml。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱峰面积的RSD为1.96%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:20140806)适量,分别于放置0、2、4、6、8、10、12 h时进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱峰面积的RSD为2.90%($n=7$),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20140806)适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱峰面积的RSD为2.37%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取样品(批号:20140806)适量,共6份,分别加入一定量的盐酸小檗碱对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.200 1	390.0	400.0	791.5	100.4		
0.199 7	390.0	400.0	798.3	102.1		
0.200 4	390.0	400.0	781.6	97.9		
0.199 5	390.0	400.0	789.7	99.9	100.2	1.68
0.200 6	390.0	400.0	780.9	97.7		
0.199 2	390.0	400.0	791.1	100.3		

2.2.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	盐酸小檗碱含量, mg/g
20140806	1.981 1
20140809	2.120 7
20140810	1.997 8

3 讨论

TLC鉴别中,开始笔者以苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-甲酸-水(12:6:3:3:1:1, V/V/V/V/V)为展开剂,展开后的主斑点不清晰,拖尾较严重,且比移值较低。由于甲醇提取的成分较多,如果点样量大,层析结果易受影响,所以控制点样量很重要。改用文中所述展开剂[乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:7:1:1, V/V/V/V)]后,所得斑点清晰、分离度好。

HPLC法测定中,由于黄金膏的基质比较难以处理,笔者对不同提取溶剂和提取方法进行了比较,根据结果并考虑到操作的简便性,最终选择取样品约0.2 g,精密称定,置于50 ml量瓶中,加流动相后超声处理,此时所得峰形清晰、辨识度高。

综上所述,该方法简便易行、准确、重复性好,可用于黄金膏中盐酸小檗碱的定性鉴别与含量测定。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年

毛鸡骨草种子的HPLC指纹图谱研究

雷朝天^{1*},唐哲²,甄汉深^{3#}(1.国药控股广西有限公司,南宁 545005;2.解放军第303医院,南宁 454150;3.广西中医药大学药学院,南宁 530001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4264-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.31

摘要 目的:建立毛鸡骨草种子的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为Inertsil ODS-3 C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。以相思子碱为参照物,对10批次毛鸡骨草种子采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行相似度分析。结果:10批次毛鸡骨草种子有12个共有峰,相似度均>0.9。经验证,毛鸡骨草种子的指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论:所建立的指纹图谱可为毛鸡骨草种子的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 毛鸡骨草种子;高效液相色谱法;指纹图谱

Study on the HPLC Fingerprint of *Abrus mollis* Seed

LEI Chao-tian¹, TANG Zhe², ZHEN Han-shen³(1.Sinopharm Holding Guangxi Co., Ltd., Nanning 545005, China; 2.303 Hospital of People's Liberation Army, Nanning 454150, China; 3.College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprint of *Abrus mollis* seed. METHODS: HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-3 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 270 nm, column temperature was 30 ℃ and volume injection was 10 μl. With the reference of abrine, 10 batches of *A. mollis* seed were analyzed, and similarity evaluation was performed by using chromatographic fingerprint of TCM. RESULTS: There were totally 12 common peaks, and the similarity was more than 0.9. According to the verification, the fingerprint of *A. mollis* seed has good consistency with the reference fingerprint. CONCLUSIONS: The established fingerprint can provide reference for the identification and quality evaluation of *A. mollis* seed.

KEYWORDS *Abrus mollis* seed; HPLC; Fingerprint

毛鸡骨草 *Abrus mollis* 为豆科植物相思子属毛鸡骨草去除荚果后的干燥全草^[1],产于福建、广东、海南、广西等地^[2]。其味甘苦、性凉,有清热利湿、舒肝止痛、消积解暑、活血散瘀之功效,可用于传染性肝炎、小儿疳积的治疗;外用可治烧伤、烫伤、疮疖^[3]。

目前,对毛鸡骨草主要以其叶为研究对象^[4-6],毛鸡骨草种子的指纹图谱研究未见公开报道。本研究中,笔者对毛鸡骨草种子的指纹图谱进行研究,在为建立其质量控制标准提供参考的同时,也为其药材采收加工和规范化种植提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪,包括二级管阵列检测器(美国Agilent公司);SB3200T型超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司);BP211D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

相思子碱对照品(美国Sigma公司,纯度:99.93%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯水。

1.3 药材

毛鸡骨草种子于各产地采集(详见表1),经广西一心医药有限责任公司马利飞副主任药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

- 版.北京:中国医药科技出版社,2010:286.
- [2] 谢培山.中国药典中药薄层色谱彩色图集[M].广州:广东科技出版社,1993:87.
- [3] 沈于兰,栾洁,丁晴.TLC及HPLC法检测白带丸中黄柏的质量[J].安徽医药,2013,17(1):38.

- [4] 姚民惠.补肾丸中枸杞子与关黄柏的TLC鉴别研究[J].中国中医药咨讯,2010,11(2):251.
- [5] 席桂同,陈述.复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定[J].世界中医药,2015,10(2):252.
- [6] 余华丽,王伟影,毛菊华,等.兽药小香勾中补骨脂素的定性鉴别与含量测定[J].中国药房,2015,26(6):815.

*主管药师。研究方向:中药学。E-mail:nnlctian@163.com
#通信作者:教授。研究方向:中药学。电话:0771-3124407。
E-mail:8zhen@163.com

(收稿日期:2015-06-06 修回日期:2015-07-28)
(编辑:张静)