

HPLC法同时测定儿泻停糖浆中黄芩苷、盐酸小檗碱、葛根素的含量

周越^{1*}, 陈建伟^{2#}(1.南京中医药大学附属连云港市中医院药学部, 江苏连云港 222000; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210046)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0394-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.37

摘要 目的:建立同时测定儿泻停糖浆中葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈, 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 柱温为30℃, 检测波长为275 nm, 进样量为10 μl。结果:黄芩苷、盐酸小檗碱、葛根素的检测质量浓度线性范围分别为10.43~83.44、10.71~85.68、12.58~100.64 μg/ml; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%; 加样回收率分别为98.25%~100.87%、99.41%~101.40%、98.13%~99.76%, RSD分别为0.92%、0.68%、0.57% (n=9)。结论:该方法操作简便, 结果可靠, 可用于儿泻停糖浆的质量控制。

关键词 儿泻停糖浆; 黄芩苷; 盐酸小檗碱; 葛根素; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Puerarin, Berberine Hydrochloride and Baicalin in Erxieting Syrup by HPLC
ZHOU Yue¹, CHEN Jianwei²(1.Dept. of Pharmacy, Lianyungang Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Lianyungang 222000, China; 2.School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of puerarin, berberine hydrochloride and baicalin in Erxieting syrup. METHODS: HPLC was performed on the column of Kromasil-C₁₈ with mobile phase of methanol-0.2% Phosphoric acid solution (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, column temperature was 30℃, detection wavelength was 275 nm, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear was 10.43-83.44 μg/ml for puerarin, 10.71-85.68 μg/ml for berberine hydrochloride and 12.58-100.64 μg/ml for baicalin ($r \geq 0.999 3$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.25%-100.87% (RSD=0.92%, n=6), 99.41%-101.40% (RSD=0.68%, n=6) and 98.13%-99.76% (RSD=0.57%, n=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, reliable, can be used for the quality control of Erxieting syrup.

KEYWORDS Erxieting syrup; Puerarin; Berberine hydrochloride; Baicalin; HPLC

儿泻停糖浆是南京中医药大学附属连云港市中医院使用多年且安全稳定、疗效确切的院内制剂, 由葛根、黄连、黄芩、苍术、白术、甘草、滑石、藿香、砂仁、诃子、芡实、石榴皮等14味中药精制而成, 具有清肠化湿、涩肠止泻的功效, 主要应用于小儿腹泻。本制剂原有质量标准较低, 仅采用薄层色谱法定性鉴别, 未对方中各味药成分进行含量测定。为提高该制剂

质量标准, 适应现代中药制剂要求, 保证临床疗效, 本研究建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定其中葛根、黄连、黄芩的主要活性成分葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-1200型HPLC仪, 包括Model 2000型检测器(美国

在葛根素供试品溶液制备时, 选择30%乙醇^[6]、30%甲醇、甲醇作为提取溶剂进行考察, 结果表明30%乙醇为提取溶剂时提取较为完全。

柴葛感冒合剂处方中葛根为君药, 由于葛根素为葛根的指标性成分, 故本研究所建标准可用于柴葛感冒合剂的质量控制。

参考文献

[1] 赵淑芹. 葛根的药理作用与临床应用[J]. 中国医药科学, 2013, 3(2): 40.

* 副主任中药师, 硕士。研究方向: 中药制剂工艺与质量。电话: 0518-85417572。E-mail: zhphenix@sina.com

通信作者: 教授, 博士生导师。研究方向: 中药品质评价。电话: 025-85811153。E-mail: chenjqw55@sina.com

[2] 吴伟, 何梅凤, 郭泽莉, 等. 白芍总苷对葡萄膜炎模型大鼠的保护作用[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 994.

[3] 李乔. 连翘化学成分研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(7): 82.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录34、97、159.

[5] 赵玥, 王光函, 吴怡, 等. 芩双片的薄层鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(6): 1394.

[6] 董宪凤. HPLC法测定清瘟解毒片中葛根素的含量[J]. 天津药学, 2012, 24(4): 13.

(收稿日期: 2015-02-04 修回日期: 2015-08-17)

(编辑: 张静)

Agilent公司);KQ-5007DB型高频数控超声波清洗器(上海顾村电光仪器厂,功率:200 W,频率:40 kHz);FA2004B型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)。

1.2 药品与试剂

儿泻停糖浆(南京中医药大学附属连云港市中医院制剂室自制,批号:20140304、20140311、20140324);黄芩苷对照品(批号:110715-200514,纯度:98.1%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:100%)、葛根素对照品(批号:110718-200908,纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为自制亚沸蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5μm);流动相:甲醇-0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:275 nm;进样量:100 μl。在上述色谱条件下,理论板数按葛根素峰计算应不低于3 000,各组分峰之间的分离度均>2.0。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of the linear gradient elution

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	35	65
8	35	65
10	48	52
26	48	52
28	35	65
35	35	65

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取葛根素对照品10.43 mg、盐酸小檗碱对照品10.71 mg、黄芩苷对照品12.58 mg,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得葛根素、盐酸小檗碱和黄芩苷对照品溶液。分别精密量取上述3种对照品溶液各1 ml,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成每1 ml溶液中含葛根素104.3 μg、盐酸小檗碱107.1 μg、黄芩苷125.8 μg的混合对照品溶液,并保存于4℃冰箱中,备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品1.0 g,置于250 ml具塞锥形瓶中,精密加入甲醇100 ml,称定质量,超声处理15 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按该制剂制备工艺和配方比例制备缺葛根、黄连、黄芩的阴性样品,再按“2.2.2”项下色谱条件制备,即得。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,供试品色谱中在与混合对照品色谱相应的位置有相同的色谱峰,而阴性对照在此位置(6.27 min)无相应的色谱峰,表明此色谱分析条件无干扰,专属性较好。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、4、6、8 ml,

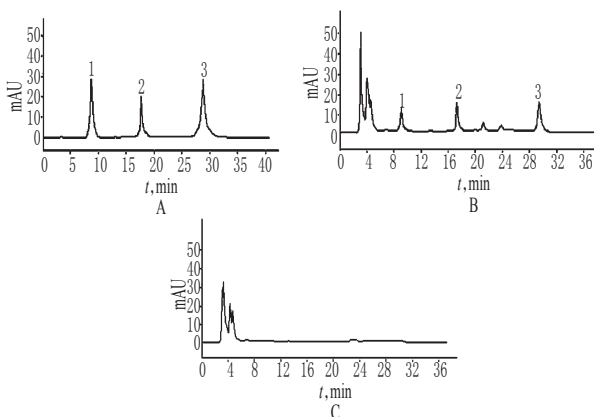


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.葛根素;2.盐酸小檗碱;3.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.puerarin; 2.berberine hydrochloride; 3.baicalin

置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得系列混合对照品溶液。分别精密吸取上述溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以黄芩苷、盐酸小檗碱、葛根素的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得黄芩苷回归方程为 $y=17.509x+8.813$ ($r=0.9995$)、盐酸小檗碱回归方程为 $y=14.575x+11.062$ ($r=0.9993$)、葛根素回归方程为 $y=11.294x+4.6129$ ($r=0.9993$)。结果表明,黄芩苷、盐酸小檗碱、葛根素的检测质量浓度线性范围为10.43~83.44、10.71~85.68、12.58~100.64 μg/ml。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,连续进样6次,记录峰面积。结果,葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.29%、0.63%、0.75%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号:20140311)适量,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.93%、1.33%、1.17%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20140311)1.0 g,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.89%、1.14%、1.21%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:20140311)9份,每份0.5 g,分别精密加入“2.2.1”项下黄芩苷对照品溶液3 ml、盐酸小檗碱对照品溶液3 ml、葛根素对照品溶液2 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算

加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	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, %
葛根素	0.498 8	203.8	208.6	411.7	99.66	99.06	0.57
	0.498 3	199.1	208.6	405.8	99.09		
	0.497 1	191.6	208.6	398.8	99.33		
	0.498 9	204.5	208.6	412.6	99.76		
	0.501 5	201.6	208.6	407.1	98.51		
	0.499 5	205.1	208.6	409.8	98.13		
	0.501 1	204.6	208.6	412.3	99.57		
	0.499 7	204.1	208.6	409.9	98.66		
	0.498 2	202.7	208.6	408.8	98.80		
	0.498 2	202.7	208.6	408.8	98.80		
盐酸小檗碱	0.500 7	322.5	321.3	648.3	101.40	100.31	0.68
	0.498 9	299.3	321.3	618.7	99.41		
	0.495 8	279.3	321.3	602.6	100.62		
	0.495 3	273.1	321.3	596.9	100.78		
	0.498 1	282.7	321.3	604.3	100.09		
	0.496 5	290.1	321.3	609.8	99.50		
	0.500 4	307.1	321.3	631.5	100.96		
	0.499 6	299.3	321.3	620.1	99.84		
	0.498 9	295.4	321.3	617.4	100.22		
	0.498 9	295.4	321.3	617.4	100.22		
黄芩苷	0.497 1	352.4	377.4	726.3	99.07	99.32	0.92
	0.496 8	347.6	377.4	718.4	98.25		
	0.499 6	378.1	377.4	752.2	99.13		
	0.498 2	359.5	377.4	733.6	99.13		
	0.500 9	378.4	377.4	749.9	98.44		
	0.502 5	389.7	377.4	763.3	98.99		
	0.499 5	361.1	377.4	741.8	100.87		
	0.498 8	357.2	377.4	737.5	100.77		
	0.499 3	360.5	377.4	735.1	99.26		
	0.499 3	360.5	377.4	735.1	99.26		

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 3 Results of contents determination of samples (n=3, mg/g)

批号	黄芩苷	盐酸小檗碱	葛根素
20140304	0.752	0.598	0.437
20140311	0.726	0.611	0.441
20140324	0.739	0.608	0.439

3 讨论

3.1 质量控制指标的选择

儿泻停糖浆中葛根素为君药葛根的主要活性成分,具有提高免疫力、降血糖、降血压、抗氧化及抗肿瘤等作用^[1];黄芩苷为臣药黄芩的主要活性成分,具有解痉、抑菌、抗炎、利尿及抗变态反应的作用以及较强的抗癌作用^[2];盐酸小檗碱为臣药黄连的主要活性成分,具有抗菌、抗病毒、降糖及抗肿瘤作

用^[3]。为确保该制剂疗效稳定、质量可控,本试验选用葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷作为其质量控制指标。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 测定波长的选择 参考相关文献^[4-8],对本制剂的待测成分葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷进行全波长扫描,结果各成分在275 nm波长处均有较大吸收,且该波长处待测成分无干扰。因此,选择275 nm作为测定波长。

3.2.2 洗脱程序的选择 预试验曾采用等度洗脱和梯度洗脱两种方式来处理流动相,结果等度洗脱的色谱峰保留时间长,且待测成分有峰重叠现象;而梯度洗脱的色谱峰峰形较好。因此,本试验采用梯度洗脱的程序来处理流动相。

3.2.3 流动相的选择 预试验时比较了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.4%磷酸水溶液等不同流动相系统,结果甲醇-水为流动相时出现峰拖尾现象,甲醇-0.1%磷酸水溶液和甲醇-0.4%磷酸水溶液为流动相时均有峰重叠现象,而以甲醇-0.2%磷酸水溶液为流动相时峰形较好。因此,本试验选择甲醇-0.2%磷酸水溶液作为流动相。

综上所述,本方法操作简便,结果可靠,可用于儿泻停糖浆的质量控制。

参考文献

- [1] 王苏静,赵新杰.葛根素的药理作用研究进展[J].内蒙古中医药,2010,29(2):107.
- [2] 雷芳.黄芩苷药理作用研究进展[J].中国药业,2010,19(15):87.
- [3] 张瑞芬,苏和.黄连的药理研究进展[J].内蒙古中医药,2010,29(3):114.
- [4] 肖丽和,王铁杰.HPLC法同时测定万氏牛黄清心片中4个有效成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(7):1 227.
- [5] 王敏,王逢春,郭琪.高效液相色谱法测定半夏泻心口服液中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J].解放军医药,2013,25(10):76.
- [6] 叶建晨.高效液相色谱法同时测定芩连胶囊中黄芩苷及盐酸小檗碱含量[J].中国药业,2013,22(6):61.
- [7] Liu F, Li Z, Shi X, et al. Determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine in rabbit plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed, 2011, 56(5):1 006.
- [8] 周伟,狄留庆,毕肖林,等.双波长高效液相色谱法同时测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A的含量[J].中华中医药杂志,2011,26(9):2 111.

(收稿日期:2015-06-26 修回日期:2015-10-16)

(编辑:刘 柳)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅