

HPLC 同时测定参柏颗粒中甘草苷、柚皮苷、盐酸小檗碱

文 谨, 刘起华*, 王 菲

中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘 要: 目的 建立参柏颗粒中甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱的 HPLC 测定方法。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 276 nm, 柱温 30 ℃。结果 甘草苷、柚皮苷、盐酸小檗碱的线性范围分别为 0.164~0.820、0.480~2.400、0.048~0.240 μg, 平均回收率分别为 98.6%、98.4%、98.0%。结论 该方法简便快速、准确灵敏, 为评价和控制参柏颗粒的质量提供了可靠的方法。

关键词: 参柏颗粒; 甘草苷; 柚皮苷; 盐酸小檗碱; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2005-03

Simultaneous determination of liquiritin, naringin, and berberin hydrochloride in Shenbai Granula by HPLC

WEN Jin, LIU Qi-hua, WANG Fei

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Key words: Shenbai Granula; liquiritin; naringin; berberin hydrochloride; HPLC

参柏颗粒是由黄柏、甘草、枳壳等制成的中药制剂, 具有清热解毒、消肿止痛、祛风止痒、凉血散瘀等作用, 临床用于肛肠科痔疮术后止痛止血, 促进创面愈合, 软化瘢痕。文献有对其方中甘草、枳壳、黄柏中主要成分甘草苷、柚皮苷、盐酸小檗碱单个成分进行测定的报道^[1-3], 但对 3 个成分的同时测定尚未见报道。然而复方中药药效的发挥是多组分共同作用的结果, 为了更好地评价参柏颗粒的质量, 本实验建立了 HPLC 法同时测定参柏颗粒中甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱的方法, 该方法专属性强、操作简便、精密度高、重现性好, 能更好地实现对参柏颗粒多指标多成分的控制。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪、PAD 检测器、Empower Pro 色谱工数据工作站 (美国 Waters 公司)。

甘草苷 (批号 111610-200402)、柚皮苷 (批号 110722-200309)、盐酸小檗碱 (批号 110713-200910) 对照品均购于中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯; 磷酸、甲醇为分析纯; 水为屈臣氏蒸馏水。

参柏颗粒自制 (批号 091216、091217、091220)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 276 nm, 流动相为乙腈 (A)-0.1%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱, 0~15 min, 17% A; 15~30 min, 17%~25% A; 进样量 10 μL, 各对照品的理论塔板数均大于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取甘草苷、柚皮苷、盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成 0.041、0.120、0.012 mg/mL 混合对照品溶液, 使用前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 供试品溶液的制备

取参柏颗粒约 0.25 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

收稿日期: 2010-12-13

基金项目: 中国中医科学院广安门医院资助项目 (2008s183)

作者简介: 文 谨 (1977—), 女, 研究方向为中药新制剂及质量控制。Tel: 13651083263 E-mail: wenjin7777@hotmail.com

*通讯作者 刘起华 Tel: (010)60214943 E-mail: gam-yaoyan@163.com

2.4 空白对照溶液的制备

按处方中药味的比例及工艺, 分别制成不含甘草、枳壳和黄柏的参柏颗粒阴性样品, 以样品溶液制备方法制成空白对照溶液并测定, 阴性样品在与对照品色谱峰相应的位置上无干扰, 表明供试品溶液中的其他成分对测定结果无影响。色谱图见图1。

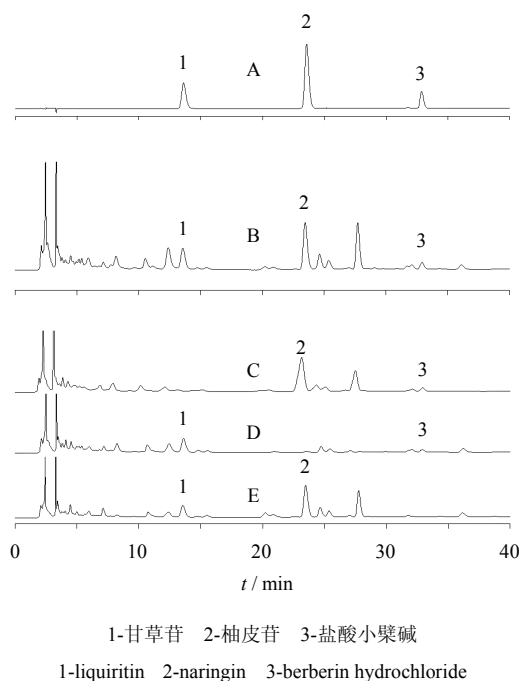


图1 对照品(A)、供试品(B)和缺甘草(C)、缺枳壳(D)、缺黄柏(E)阴性对照的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), samples (B), blank samples without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (C), without *Aurantii Fructus* (D), or without *Phellodendri Chinensis Cortex* (E)

2.5 线性关系考察

精密吸取甘草苷、柚皮苷、盐酸小檗碱混合对照品溶液4、8、12、16、20 μL , 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标, 各组分的质量为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程: 甘草苷 $Y=1\,904\,012.2\,X-32\,446.6$, $r=0.999\,9$; 柚皮苷 $Y=1\,557\,006.5\,X-88\,206.5$, $r=0.999\,9$; 盐酸小檗碱 $Y=2\,872\,525\,X+8\,725.2$, $r=0.999\,8$; 结果表明甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱分别在0.164~0.820、0.480~2.400、0.048~0.240 μg 线性关系良好。

2.6 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(批号091216), 重复进样5次, 求得样品中甘草苷、柚皮苷、盐酸小

檗碱峰面积的RSD分别为0.8%、1.2%、0.9%。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号091216)在0、2、4、8、24 h分别进样, 样品中甘草苷、柚皮苷、盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为1.1%、1.3%、2.0%, 说明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 重现性试验

取同一批样品(批号091216)5份, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果样品中甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱质量分数的RSD分别为1.3%、1.9%、1.2%。

2.9 回收率试验

采用加样回收法, 取同一批号(批号091220)样品6份, 每份0.125 g, 精密称定, 每份分别精密加入甘草苷对照品溶液0.420 mg/mL、柚皮苷对照品溶液1.192 mg/mL和盐酸小檗碱对照品溶液0.081 mg/mL各1.0 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱的平均回收率分别为98.6%、98.4%、98.0%, RSD分别为1.6%、1.9%、2.1%。

2.10 样品测定

分别取3批样品, 每批平行3份, 制备供试品溶液, 依上述色谱条件进样测定, 外标法计算, 结果见表1。

表1 参柏颗粒中甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of liquiritin, naringin, and berberin hydrochloride in Shenbai Granula ($n=3$)

批号	甘草苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	柚皮苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	盐酸小檗碱/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
091216	3.634	9.826	0.638
091217	3.412	9.637	0.523
091220	3.540	9.744	0.586

3 讨论

在流动相的选择上, 由于甘草苷、柚皮苷和盐酸小檗碱的极性差异较大, 为了能同时分析3个成分, 选择了梯度洗脱。参考文献方法^[4-6]以乙腈-0.1%磷酸为系统, 经过多次调整洗脱时流动相的比例、体积流量, 最终筛选出使各成分能较好分离的色谱条件, 在本试验系统条件下, 各组分均可基线分离, 峰形较好, 且试验时间短, 在40 min内就能实现良好的分离。

本实验应用 PAD 检测器对测定波长进行了考察,其中甘草苷的最大吸收在 276 nm,柚皮苷的最大吸收在 283 nm,盐酸小檗碱的最大吸收在 265 nm,而采用 276 nm 作为测定波长能够满足方法学考察的要求,同时,对 3 个化合物在同一波长下测定使得方法更加简单,增加了普适性。

根据相关文献报道^[7-8],本实验对提取溶剂、提取方法、提取时间分别进行了系统考察。提取溶剂的考察方法为,分别选取甲醇、95%乙醇为溶剂,对同一样品超声提取 30 min,结果采用甲醇提取效果最好;本实验比较了超声提取、加热回流提取方法,发现加热回流提取的色谱峰面积与超声提取的色谱峰面积差别不大,因此选择超声提取作为样品溶液的制备方法;本实验考察了超声 30、45、60 min 3 个时间点,发现超声 30 min 就可以把待测组分提取完全,因此确定超声时间为 30 min。综上,样品溶液的制备条件为甲醇超声提取 30 min。

本研究建立了同时测定参柏颗粒中甘草苷、柚皮苷与盐酸小檗碱的方法,该法具有操作简便、结果可靠等特点,能够应用于参柏颗粒的质量评价与质量控制。

参考文献

- [1] 张 萍,郭亚东,马银海,等. HPLC 测定玄麦甘桔颗粒中甘草苷和甘草酸的含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(4): 335-337.
- [2] 郭宗珍,王英锋,申 严,等. HPLC 测定通降颗粒中柚皮苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 2001-2002.
- [3] 庞小雄,宋粉云,钟兆健,等. HPLC 法测定拈痛丸中盐酸小檗碱的含量 [J]. 广东药学院学报, 2007, 23(3): 240-241.
- [4] 董 玄,高文远,李凤阁,等. RP-HPLC 法测定枳壳药材中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 283-284.
- [5] 丘文珍. HPLC 法测定障眼明片中盐酸小檗碱 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1030-1031.
- [6] 段天璇,于密密,刘春生,等. HPLC 法同时测定甘草指纹图谱暨甘草苷、甘草酸含量 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 161-165.
- [7] 池玉梅,崔小兵,陈 维,等. HPLC 双波长梯度洗脱同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷的含量 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(17): 1348-1350.
- [8] 朱 克,吴立成,周玲娜. HPLC 法测定抗骨增生片中柚皮苷 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 914-916.