

HPLC 法测定香荷药条中小檗碱及巴马亭的含量*

杨 柳 邓远辉 董玉珍(广州 510120 广东省中医院)

摘要 目的: 采用高效液相色谱法分离测定香荷药条中的小檗碱和巴马亭。方法: 固定相为 BDS C₁₈, 5 μm, 4.9mm × 250mm HPLC 柱; 流动相为乙腈-水(1: 1, 每 1000 mL 中含 KH₂PO₄ 3.4g, CH₃(CH₂)₁₁SO₄NaI. 7g); 检测波长为 345nm。结果: 小檗碱的平均回收率为 98.23%, RSD= 2.17%, 巴马亭的平均回收率为 97.14%, RSD= 2.85%。结论: 该法简便、快速、灵敏; 结果稳定, 重现性好。

关键词 HPLC; 香荷药条; 小檗碱; 巴马亭

Determination of Berberine and Palmatine in Xianghe Tampon by HPLC

Yang Liu, Deng Yuanhui, Dong Yuzheng (Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510120)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a HPLC method to determine Berberine and Palmatine in Xianghe Tampon. **METHODS:** The column was ODS C₁₈, 5 μm, 4.9mm × 250mm, Acetonitrile-water(1: 1, containing 3.4g KH₂PO₄ and 1.7g CH₃(CH₂)₁₁SO₄Na per 1000ml) was as the mobile phase, The detection wavelength was 345nm. **RESULT:** The average recoveries of the two constituents were 98.23 ± 2.17% and 97.14 ± 2.85%, respectively. **CONCLUSION:** The method was simple, rapid and sensitive, and its result was stable and with high reproducibility.

KEY WORDS Xianghe Tampon, Berberine, Palmatine, HPLC

香荷药条是我院剂型改革的成果。该方由黄连、黄柏、苦参等多味中药配伍组成, 具有清热燥湿、杀虫疗癣之功, 经多年临床验证, 对妇科炎症有良好疗效。它克服了传统外用洗剂使用、携带不便的弊病, 独创以棉条为骨架物的阴道给药途径, 达到了缓慢释药并自洁内环境的双重效果, 开发利用前景十分广阔。小檗碱和巴马亭是黄连、黄柏的主要有效成分。现代药理研究表明, 黄连、黄柏及其有效成分具有广谱抗病原菌作用及抗炎作用^[1]。因此, 建立药条中小檗碱和巴马亭的分离测定方法, 具有重要意义。本文采用 HPLC 法同时分离并测定香荷药条中小檗碱及巴马亭, 建立制剂中主要有效成分的分离测定方法, 为进一步控制香荷药条的质量, 提供了实验依据。

1 仪器与药品

SP8800 高效液相色谱仪, SP8800 高压泵, SPC200 紫外可见光检测器, SP4270 积分仪。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余所用试剂均为分析纯, 水为注射用水; 小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所), 巴马亭对照品(中国药品生物制品检定所), 黄连、黄柏、苦参等药材均购自广州市药材公司, 由本院药剂科董玉珍主任药师鉴定。香荷药条为本院中心实验室自制。

2 色谱条件及分离结果

2.1 色谱条件 C₁₈-BDS 柱(4.9mm × 250mm, 5μm); 流动相为乙腈-水(1: 1, 1000ml 含 KH₂PO₄ 3.4g, CH₃(CH₂)₁₁SO₄NaI. 7g); 流速 1ml/min, 柱温室温, 巴马亭及小檗碱的检测波长为 345nm。

2.2 分离结果(见图 1)

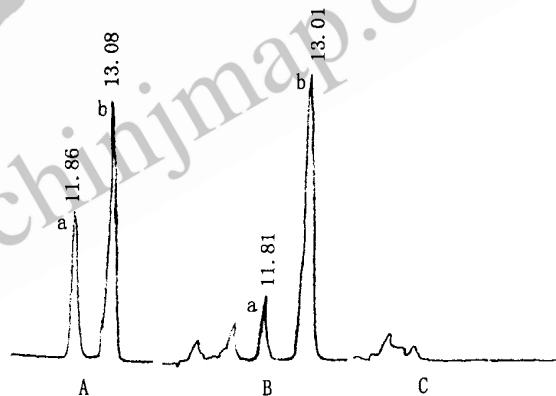


图 1 样品对照品分离图

A 对照品分离图 B 样品分离图 C 阴性样品分离图

a 巴马亭 b 小檗碱

3 方法与结果

3.1 标准溶液的制备 分别精密称取已干燥至恒重的小檗碱、巴马亭适量, 同置 25ml 量瓶中, 以甲醇为溶剂, 配制成含小檗碱 0.28mg/ml, 巴马亭 0.2mg/ml 的混合溶液, 作为标准品贮备液。

3.2 供试品溶液的制备 取剪碎药条约 0.5g, 精密称定重量。置索氏提取器中, 加适量甲醇, 索氏回流提取至无色, 回收甲醇, 残留物用 10ml 甲醇溶解, 上 Al₂O₃ 净化柱, 甲醇洗

本项目为 1996 年广东省重点科技攻关项目: 粤科字[1996]58 号, 项目号: 9622007- 03

脱至无色,洗脱液定量转移至 50mL 量瓶中,稀释至刻度。微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液,作为供试品溶液。

3.3 空白试验 按香荷药条配方配制不含黄连、黄柏的阴性样品,按“样品测定”方法测定,结果见图 1,从图可见,在小檗碱和巴马亭出峰区间未出现干扰峰。

3.4 线性关系考察 精密吸取浓度均为 0.28mg/mL 的混合标准品溶液 0.05mL、0.1mL、0.2mL、0.4mL、0.8mL、1.6mL 置于 2mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后,进样 10 μ L,测定。同一浓度测定 3 次,取其平均值,以标准品的量(μ g)为横坐标,小檗碱及巴马亭的峰面积为纵坐标,得回归方程、相关系数及线性范围分别为:

小檗碱 $Y = 1.41 \times 10^5 + 5.46 \times 10^6$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.07~2.24 μ g;

巴马亭 $Y = 1.96 \times 10^5 X + 6.81 \times 10^6$, $r = 0.9997$, 线性范围 0.07~2.24 μ g;

3.5 精密度试验 按上述色谱条件,用浓度均为 1.12×10^{-2} mg/mL 的小檗碱和巴马亭标准溶液进样 6 次,每次 10 μ L,分别测得各次峰面积,结果 RSD 值分别为 1.12% 和 0.89%。

3.6 重现性试验 取同一批号样品,按供试品溶液制备方法制备 6 份供试液,分别进样,记录色谱,计算结果。小檗碱和巴马亭的 RSD 分别为 0.59% 和 2.56% ($n = 6$)。

3.7 稳定性试验 取供试品溶液,每 1h 进样 10 μ L,分别测定小檗碱及巴马亭的峰面积,结果 7h 内小檗碱 RSD = 1.90%,巴马亭 RSD = 2.44%。结果表明小檗碱和巴马亭在 7h 内测定结果稳定。

3.8 加样回收率试验 准确称取已测知含量的样品各 5 份,加入一定量的对照品,按样品溶液制备方法进行提取处理及测定,计算加样回收率。小檗碱的加样回收率为 98.23%,RSD 为 2.17%;巴马亭的加样回收率 97.14%,RSD 为 2.85% ($n = 5$)。

3.9 样品含量测定 精密吸取供试品溶液,进样分析,按前述色谱条件测定峰面积,计算样品中小檗碱及巴马亭的含量。测定结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果($n = 3$)

Batch NO.	Berberine (mg/支)	RSD/%	Palmatine (mg/支)	RSD/%
980701	39.37	1.78	8.38	3.59
980720	56.25	0.82	13.40	1.30
980818	53.50	0.93	12.07	3.05

4 讨论

4.1 采用 HPLC 法,一次进样分离香荷药条中小檗碱、巴马亭的含量,方法简便、快速,结果可靠。

4.2 测定小檗碱、巴马亭等生物碱曾有报道用 345nm^[2] 或 264nm^[3] 作为检测波长,本文选择了 345nm^[2] 作为检测波长,能较好地消除其它成分的干扰。

4.3 黄连、黄柏生物碱为季铵型生物碱,因其易溶于水、甲醇等溶剂,故选用甲醇为提取溶剂。对提取方法进行了索氏提取 4h、索氏提取 7h、索氏提取至无色、冷浸 24h 后索氏提取至无色及超声波提取几种方案的比较,实验结果表明,甲醇回流提取的生物碱含量较超声提取 3 次的含量要高,而回流提取方法又以索氏回流提取至无色为宜。故采用甲醇索氏回流提取至无色的方法提取样品。

4.4 由于香荷药条成分十分复杂,其提取液中同时含有多种非待测成分,若直接进样分析,不仅会干扰待测生物碱的准确定量,还会对色谱柱造成污染,影响柱效和缩短色谱柱的寿命,因此进样前我们将提取液用中性氧化铝层析柱法进行了净化,操作简便,效果良好。

参考文献

- 1 王本祥主编.现代中药药理学.第一版.天津:天津科学技术出版社,1997:302,310
- 2 潘 杨,王天山,马国祥,等.HPLC 测定糖皮质激素中小檗碱、掌叶防己碱和药根碱的含量.南京中医药大学学报,1996,12(6):25
- 3 邹昭明,舒元瑜,杨安东等.秃叶黄皮树质量标准研究.中药材,1991,14(4):16