

HPCE 和 HPLC 测量导赤丸中盐酸小檗碱含量

房娟娟, 黄玉芝, 李金, 闫滨(山东中医药大学, 济南 250355)

摘要: 目的 建立毛细管电泳法(HPCE)与高效液相色谱法(HPLC)测定导赤丸中盐酸小檗碱含量的方法, 并比较二者在测定本品中盐酸小檗碱含量方面的差异。方法 采用盐酸-甲醇(1:100)溶液提取导赤丸样品。HPCE 分离条件为: 熔融石英毛细管柱(67 cm×75 μm, 有效长度 60 cm), 缓冲液体系为 60 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲溶液-甲醇(65:35), pH 3.5, 分离电压 30 kV, 毛细管柱温 25 °C, 检测波长 254 nm, 进样时间 5 s; HPLC 分离条件为: C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流动相为 60 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-甲醇(60:40, 用磷酸调 pH3.5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果 盐酸小檗碱在 HPLC 和 HPCE 各自的分离条件下进样浓度分别在 5.03~30.18 μg·mL⁻¹、30.18~80.48 μg·mL⁻¹ 内表现出良好线性关系($r=0.999\ 8$; $r=0.999\ 8$), 平均加样加收率分别为 99.0%, 100.8%, RSD 分别为 1.4%, 0.6%。结论 这两种方法均可用于导赤丸中盐酸小檗碱含量的测定, 二者的测定结果稍有差异, HPCE 测定盐酸小檗碱在柱效、分离时间、多组分生物碱分离上更有优势。

关键词: 高效毛细管电泳法; 高效液相色谱法; 导赤丸; 盐酸小檗碱; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)09-0860-04

Determination of Berberine from Daochi Pills by HPCE and HPLC

FANG Juanjuan, HUANG Yuzhi, LI Jin, YAN Bin(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a high performance capillary electrophoresis (HPCE) method and high performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitative determination of berberine in Daochi pills and evaluate two methods to find out the differences between them. **METHODS** Daochi pills were extracted with hydrochloric acid-methanol (1:100) solution and measured by HPCE and HPLC. An uncoated fused silica capillary(67 cm×75 μm, valid length of 60 cm) was used with a running buffer contained 60 mmol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate and methanol(65:35) under the voltage of 30 kV at 25 °C, moderating pH 3.5 through phosphoric acid, and the detection wavelength was 254 nm. The injection time was 5 s. In HPLC method, the separation was performed on a C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) under the temperature of 25 °C with potassium dihydrogen phosphate-methanol (60:40) as mobile phase at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** The linear calibration range of HPLC and HPCE was 5.03~30.18 μg·mL⁻¹, 30.18~80.48 μg·mL⁻¹, relatively. Their average recoveries were 99.0% and 100.8% with RSD 1.4% and 0.6%, respectively. **CONCLUSION** Both methods can be applied to determine the berberine in Daochi pills, but there is a slight difference between their determination results, HPCE earned more benefits on column efficiency, shorter separation time and resolution among separation of multicomponent.

KEY WORDS: HPCE; HPLC; Daochi pills; berberine chloride; content determination

导赤丸(大蜜丸)由连翘、黄连、栀子、木通等 10 味药物组成, 具有清热泻火、利尿通便的作用。用于火热内盛所致的口舌生疮、咽喉疼痛、心胸烦热、小便短赤、大便秘结等症状。盐酸小檗碱是导赤丸中主要活性成分之一, 以抗菌消炎为主^[1]。

目前盐酸小檗碱的分析方法主要有: 反相高效液相色谱法^[2]、离子交换色谱法^[3]、胶束色谱法^[4]、薄层色谱-荧光分光光度法^[5]等。中国药典 2010 版一部中导赤丸项下含量测定采用薄层扫描

法来控制其中小檗碱的含量, 目前对于导赤丸中盐酸小檗碱的含量测定的研究报道仅限于薄层扫描法^[6-7], 此方法在定量分析的准确度方面有其明显的不足。盐酸小檗碱目前的主流检测方法是 HPLC, 但复方成分复杂且盐酸小檗碱为季胺类生物碱, 碱性强, 极性大, 往往被色谱柱吸附, 对色谱柱造成污染且影响峰形, 而 HPCE 具有的高效灵敏、分离速度快、试剂消耗小以及空管介质等优点, 在中药的生物碱检测中独具优势。本试验通过对导赤丸中盐酸小檗碱色谱条件的探讨, 建

作者简介: 房娟娟, 女, 硕士生 Tel: (0531)89628901 E-mail: tyfangjuajuan2008@yahoo.cn
Tel: 13791013232 E-mail: robinyan2002@yahoo.com.cn

*通信作者: 闫滨, 男, 博士, 副教授

立了HPCE和HPLC测定导赤丸中盐酸小檗碱含量,并对其结果进行比较,分析两种方法在导赤丸含量测定方面的优劣。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Beckman P/ACE 5500 型 HPCE(美国 Beckman 公司);熔融毛细管柱(67 cm×75 μm,河北永年光导纤维厂)。Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有二极管阵列检测器(DAD),C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110713-200609,供含量测定用);甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。导赤丸(北京同仁堂,批号:9013145)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成1.006 mg·mL⁻¹对照品的溶液,4℃保存备用。

2.1.2 供试品溶液的制备^[1] 取质量本品,剪碎,混匀,取1 g,精密称定,置100 mL量瓶中,加水5 mL,放置使溶散,加入盐酸-甲醇(1:100)混合溶液约80 mL,置60℃水浴中加热15 min,取出,超声处理(250 W, 33 kHz)15 min,放冷,加盐酸-甲醇(1:100)稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL作为供试液I,III备用;精密量取续滤液20 mL浓缩至2 mL,加在中性氧化铝柱(100~200目,6 g,内径0.9 cm)上,以乙醇25 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至5 mL量瓶中,加入2 mL缓冲溶液后用甲醇稀释至刻度,用0.45 μm有机膜过滤后作为供试液II备用,残渣用甲醇溶解并转移至5 mL量瓶中,用流动相定容至刻度,作为供试液IV备用。

2.2 实验条件

2.2.1 电泳条件 熔融毛细管柱(67 cm×75 μm,有效长度为60 cm),检测波长为254 nm,进样:压力(0.586 MPa)自动进样5 s,分离电压为30 kV,柱温25℃,缓冲液体系为60 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲溶液-甲醇(65:35),磷酸调pH值为3.5。

进样前,毛细管柱需分别用0.1 mol·L⁻¹ NaOH溶液、0.1 mol·L⁻¹ HCl、超纯水各冲洗5 min再用运行缓冲溶液平衡10 min,每次测定后,用运行

缓冲溶液冲洗5 min,以确保较好的重现性。

2.2.2 色谱条件 C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温25℃;流动相磷酸二氢钾-甲醇(60:40,用磷酸调pH为3.5),流速1.0 mL·min⁻¹;检测波长254 nm。

2.3 线性关系考察

2.3.1 HPCE 线性关系考察 精密称取盐酸小檗碱对照品适量分别置于5 mL量瓶中,加入2 mL缓冲溶液,用甲醇定容,得30.18, 40.24, 50.30, 60.36, 70.42和80.48 μg·mL⁻¹的对照品溶液,依次进样,以对照品浓度为横坐标对峰面积做回归分析,得回归方程为 $Y=987\ 617X+2\ 224.1$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明盐酸小檗碱在30.18~80.48 mg·mL⁻¹内线性关系良好。

2.3.2 HPLC 线性关系考察 精密称取盐酸小檗碱对照品适量分别置于5 mL量瓶中,用流动相定容至刻度得50.30, 10.06, 15.09, 20.12, 25.15, 30.18 μg·mL⁻¹的对照品溶液,依次进样,以对照品浓度为横坐标对峰面积做回归分析,得回归方程为 $Y=31\ 920X+2.866\ 7$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明盐酸小檗碱在50.30~30.18 μg·mL⁻¹内线性关系良好。

2.4 仪器精密度试验

取30.18 μg·mL⁻¹的对照品溶液,按“2.2”项下的电泳和色谱条件,分别连续进样5次,以峰面积计算RSD分别为1.95%和0.25%,表明在两种分析条件下仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

分别量取供试品溶液I和II,用HPCE和HPLC分别测定于0, 2, 4, 6, 8和12 h样品中盐酸小檗碱的峰面积,求得RSD值分别为2.0%, 1.9%和1.9%, 1.3%,表明供试品在12 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

取同批样品按“2.1.2”项下分别制备供试品溶液,平行制备6份,按“2.2”项下的电泳和色谱条件测定峰面积,求得RSD值分别为1.27%、1.23%、1.52%、1.02%; 1.20%、1.01%、1.17%、1.02%,表明这两种方法的重复性良好。

2.7 回收率试验

取本品约0.5 g,精密称定,按表1和表2加入盐酸小檗碱对照品适量,取“2.1.2”项下制备供试品溶液I、供试品溶液III,各平行6份,通过HPCE和HPLC进行测定,结果分别见表1和表2。

表 1 毛细管电泳回收率结果(n=6)

Tab 1 Recovery of berberine by HPCE(n=6)

含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.754 0		1.378 3	103.4		
0.745 3		1.369 6	99.8		
0.752 8	0.603 6	1.354 0	99.6	100.8	0.6
0.748 0		1.351 7	100.0		
0.753 7		1.363 8	101.1		
0.754 0		1.364 2	101.1		

表 2 高效液相回收率结果(n=6)

Tab 2 Recovery of berberine by HPLC(n=6)

含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.775 0		1.375 8	99.5		
0.766 1		1.349 8	96.7		
0.773 8	0.603 6	1.379 2	100.3	99.0	1.4
0.768 9		1.361 0	98.1		
0.774 2		1.377 0	99.9		
0.775 0		1.377 4	99.8		

2.8 样品含量测定

按“2.1.2”项下方法制备各供试品溶液 3 份,按“2.2”项下的电泳和色谱条件,每份进样 2 次取平均值,结果见表 3。盐酸小檗碱对照品及样品色谱图见图 1 和图 2。

表 3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Determination results of sample(n=3)

检测方法	样品	样品含量/mg·g ⁻¹	RSD%
HPCE	供试液 1	1.505	1.25
	供试液 2	1.518	1.31
HPLC	供试液 3	1.547	1.14
	供试液 4	1.588	0.98

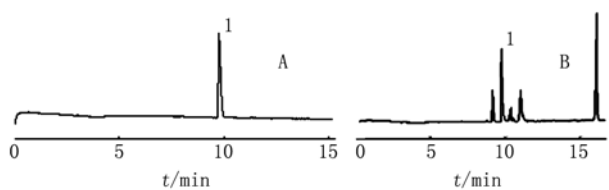


图 1 毛细管电泳图

A-对照品; B-供试品; 1-盐酸小檗碱

Fig 1 Electropherogram

A-control; B-sample; 1-berberine hydrochloride

3 讨论

根据中国药典2010年版一部规定,导赤丸中小檗碱的含量,以盐酸小檗碱计应不低于1.0 mg·g⁻¹。两种实验结果均表明,样品中小檗碱含量不低于此含量限度,符合标准。

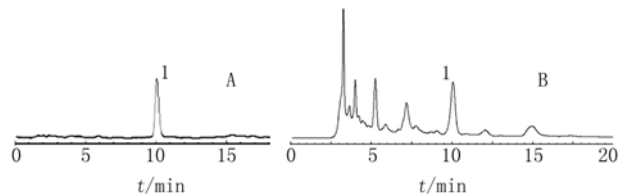


图 2 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-盐酸小檗碱

Fig 2 HPLC chromatogram

A-control; B-sample; 1-berberine

3.1 样品处理及检测方法分析

中国药典 2010 年版一部中规定导赤丸含量的测定采用薄层扫描法,并且其样品要求过氧化铝柱处理,本次实验对 HPCE 和 HPLC 两种方法进行比较,结果采用 HPLC 法时盐酸小檗碱对照品和样品的塔板数分别在 13 000 和 3 300 左右,HPCE 法时分别在 52 000 和 56 000 左右,其柱效明显高于高效液相色谱法。两种分析结果稍有差异可能与仪器的灵敏度及毛细管电泳进样量不够精确所致,由以上结果可知毛细管电泳法和高效液相法均可做为此复方药物含量测定的有效方法,而且毛细管电泳法在含量测定方面有其独特优势,此外实验结果表明导赤丸样品可不经氧化铝柱直接进行分析,但从色谱柱的保护和防止柱污染方面考虑,当采用高效液相色谱法分析时最好对样品过柱处理。

3.2 缓冲溶液pH值对分离的影响

对 HPCE 而言,缓冲体系由缓冲试剂和 pH 调节剂两部分构成,其中缓冲试剂的选择性主要是由所需 pH 决定的,缓冲溶液的 pH 值决定着毛细管表面硅羟基电离的程度,从而会直接影响电渗流, pH 值增加电渗流也随之增大。此外缓冲溶液的 pH 值也会影响样品溶质的荷电情况,从而影响其电泳行为。因此缓冲溶液的 pH 值对毛细管电泳的选择性、分离度等有重要影响,在毛细管电泳的分离条件的优化中具有重要意义。考虑缓冲溶液 pH 值对待测物分离效果的影响,加磷酸调节缓冲溶液 pH 值,分别选择 pH 为 3.0, 3.5, 5.0, 7.0 和 8.0,比较谱图中分离度 R 值和分离效果,优选出最佳值,实验结果表明 pH 值从 3.0 开始逐渐增大时,分离效果逐渐改善,分离度增大,但从 7.0 以后,谱峰形状变差,迁移时间差距逐渐扩大,因此,选择缓冲溶液最佳 pH 值为 3.5。

3.3 毛细管长度及电压的选择

理论上讲,柱长对样品分离度及柱效的影响不大,但是柱长越长,电流越小,产生的热量也越少,可以应用较高的电压,得到较高的柱效和分离度。但柱长太长,分析时间也变长,在考察过 40, 50 和 60 cm 的毛细管柱后综合考虑各种因素,最终选择内径为 75 μm ,总长度为 60 cm 的毛细管柱。

电压是控制分离度和分析时间的重要因素。在上述最佳缓冲体系中,分别以电压 10, 20 和 30 kV 对保留时间和峰面积进行考察。运行电压的高低主要影响分离度和和分析时间,在低电压时,分离度增大,但延长了分离时间,且部分峰出现展宽现象;高电压时,理论上会使电流增大产生了大的焦耳热,这些热量不能及时散失,反而影响分离效率和分离度,甚至产生气泡导致峰形变异或运行失败,但本实验表明对复方导赤丸待测物而言,30 kV 时分离速度快,分离效率高,运行稳定。

3.4 检测波长的选择

对盐酸小檗碱对照品进行全波长扫描,发现其在 260 和 366 nm 处均有最大吸收,本仪器配置单

一滤光片,最接近波长为 254 nm,并且为增加两种方法的可比性统一选择 254 nm 作为检测波长。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 717.
- [2] XIAO P, LI W S. Determination of berberine hydrochloride in mixture for burn and scold by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(5): 439-441.
- [3] TETSUO M, KAZUHIKO S, MITSU HARU O, et al. Simultaneous determination of berberine, palmatine and coptisine in crude drugs and oriental pharmaceutical preparation by ion pair high performance liquid chromatography [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 30(1): 354-357.
- [4] QIU X X, WU Z Y, CHEN B L. Analysis of berberine-type alkaloids in Rhizoma Coptidis and Chinese patent medicinals by micellar chromatography [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1986, 21(6): 458-464.
- [5] WEN X X, LIU D H, YU C H, et al. Determination of berberine hydrochloride in *Coptis chinensis* Franch. and Xianglian pills by thin layer chromatograph-fluorescence spectrophotometry method [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2008, 15(10): 53-54.
- [6] LIAN S Z H, MA C H, LIU D F, et al. Research of the quality control of Daochi pills [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 1989, 11(11): 10-12.
- [7] WU G Q, ZHOU F Y. Determination of berberine from Daochi pills by TLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1999, 24(7): 412-413.

收稿日期: 2010-10-09