

连夏消痞胶囊的薄层色谱法鉴别及高效液相法含量测定

张梅, 赵维娟, 徐琳(北京军区临床药物研究所, 北京 100700)

摘要:目的 制定连夏消痞胶囊的质量标准。方法 用薄层色谱法鉴别黄连、生晒参、黄芩。用 HPLC 测定连夏消痞胶囊中盐酸小檗碱的含量, 采用 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈-磷酸盐缓冲液(30: 70, pH 3.0), 检测波长 345nm, 流速为 1.0mL/min, 柱温为室温。结果 ①供试品中黄连、生晒参、黄芩有效主成份与其相应的对照药材和对照标准品在薄层色谱上有相同斑点; ②盐酸小檗碱范围在 0.02~0.4 μ g 内呈良好的线性关系($r=0.9998$), 平均回收率 97.87%, RSD 为 1.68%。结论 其定性定量方法简便、准确、专属性强、重现性好, 所建立的方法可供制定连夏消痞胶囊质量标准使用。

关键词: 连夏消痞胶囊; 薄层色谱; 高效液相色谱; 盐酸小檗碱

Study on Quality Standards for Lian Xia Xiao Pi Capsule

ZHANG Mei, ZHAO Wei-juan, XU Lin(*Beijing Military Command Clinical Pharmaceutical Institute, Beijing 100700, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To build up quality standards for Lian Xia Xiao Pi capsules. **METHOD** The qualitative analyses were

作者简介: 张梅, 女, 硕士, 主任药师。近年从事中药制剂和经皮吸收制剂的开发研究。联系电话: 010-66721926, Fax: 010-84043984, E-mail: may-zh@sohu.com

carried out with Rhizoma coptidis, Radix ginseng and Radix scutellariae by TLC and qualitative analyses with Hydrochloride Berberine as an index by HPLC in LianXia Xiao Pi capsules. The HPLC system consisted of Zorbax SB-C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm). Acetonitrile-phosphoric acid buffer solution (30: 70, pH 3.0) mixture as mobile phase, with detection at 345nm. Flow rate 1.0mL/min and column temperature at room temperature. **RESULTS** The Linear range was 0.02 ~ 0.4μg ($r=0.9998$). **CONCLUSION** The results indicated that methods were simple and Sensitive with a good concentration. This Study provided a quality control method for Lian Xia Xiao Pi capsules.

KEY WORDS: LianXia XiaoPi capsules; TLC; HPLC; Berberine Hydrochloride

连夏消痞胶囊是由半夏、黄连、生晒参、黄芩、干姜、甘草、大枣和枳实八味药材组成的,依据方中诸药的有效成份的性质经适宜提取、纯化和干燥等工艺制成的有效成份提取物胶囊。其基础方来源于《伤寒论》之“半夏泻心汤”,具有健脾和胃、消除胃脾胀满的功效,方中以法半夏为主,降逆止呕;芩连苦寒泻热;干姜辛温散寒;生晒参、甘草、大枣补益脾胃,枳实散痞消积。为控制连夏消痞胶囊的质量,采用 HPLC 方法分别对其处方中的主要成份黄连、生晒参、黄芩进行了定性鉴别^[1-3]。采用 HPLC 方法对制剂中黄连的有效成份小檗碱进行了含量测定^[4]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

惠普 HP 1050 型高效液相色谱仪(美国惠普公司);ZF-1 型三用紫外分析检测仪(上海顾村光电仪器厂);定量毛细管(camag);KQ-100 型超声波清洗器(BHS-A006);层析缸(2000 年版《中国药典》要求标准)。

1.2 试剂

连夏消痞胶囊(由本所提供,批号同表 3);黄连、生晒参和黄芩对照药材,盐酸小檗碱,人参皂苷 Rg1、Re1、Rb1,黄芩苷对照品(均由中国药品生物制品鉴定所提供)。硅胶 G(薄层层析用,由青岛海洋化工厂生产);所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连的 TLC 鉴别

取本品 3 粒,内容物加甲醇 100mL 回流 1h,过滤浓缩至 10mL,作供试品溶液;按工艺制备缺黄连的样品,同法制得阴性对照溶液;取黄连药材同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 0.5mg/mL 的对照品溶液。照薄层色谱法^[1],吸取上述 4 种溶液各 1μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以苯-醋酸乙酯-异丙醇-甲醇-水(6: 3: 1.5: 1.5: 0.3)为展开剂,置氨蒸气饱和的展开缸内 15min,展开,取出,晾干,置紫外灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的黄色荧光斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同的黄色荧光斑点。

2.2 生晒参的 TLC 鉴别

取本品 4 粒(内容物 5g),用乙醚 40mL 回流 1h,滤过,挥干乙醚,残渣加甲醇 25mL,超声处理 20min,滤过,滤液浓缩至 5mL,加入中性氧化铝(100~200 目)5g,拌匀,干燥。残渣加水洗脱,滤过。滤液用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 15mL,合并正丁醇萃取液,加氨试液 30mL 充分摇匀,放置使分层。取上层液,蒸干,残渣加甲醇 1mL 溶解,作为供试品溶

液;按制剂工艺制备缺人参的样品,同法制得阴性对照溶液;另取生晒参药材同法制成对照药材溶液;再取人参皂苷 Rb1、Re、Rg1 对照品适量,加甲醇制成每 mL 各含 1mg 的混合溶液,作为对照品溶液;照薄层色谱法试验^[1],吸取上述供试品 4 种溶液 10μL,对照品溶液各 5μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇-醋酸乙酯-水(15: 22: 40: 10) 10℃以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,用 10%的硫酸乙醇溶液喷雾显色,取出后在 105℃加热至斑点显色。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,日光下分别显相同的 3 个紫色或紫红色斑点,而阴性对照品色谱无相应斑点。

2.3 黄芩的 TLC 鉴别

取本品内容物 5g,加甲醇回流 1h,过滤,浓缩至 10mL,作供试品溶液;按制备工艺制备缺黄芩的样品,同法制得阴性对照溶液;取黄芩药材 1g,同法制成对照药材溶液;另取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成 1mg/mL 对照品溶液。照薄层色谱法^[1]吸取上述 4 种溶液各 5μL,分别点于同一以含 4% 醋酸钠的羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以醋酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5: 3: 1: 1)为展开剂,预平衡 30min,展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同暗绿色的斑点。而阴性对照品色谱无相应斑点。

3 含量测定

3.1 色谱条件

Zorbax SB-C₁₈ 分析柱(250mm × 4.6mm, 5μm),流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(30: 70)(磷酸缓冲液的配制:取磷酸二氢钠 7.8g 加水溶解至 1000mL,磷酸调 pH 至 3.0)。检测波长为 345nm,流速 1.0mL/min,柱温为室温。理论塔板数按盐酸小檗碱计算不低于 3000。

3.2 供试品溶液与对照品溶液的制备

供试品溶液的制备:精密称取本品内容物 2g,置索氏提取器中,加盐酸-甲醇(1: 100)适量,加热回流提取至提取液无色,将提取液移至 100mL 容量瓶中,用盐酸-甲醇(1: 100)的混合溶液稀释至刻度,摇匀。精密量取 2mL,置 100mL 容量瓶中,用盐酸-甲醇(1: 100)稀释至刻度,摇匀。此为供试品。

阴性(空白)对照品溶液的制备:精密称取缺少黄连的连夏消痞胶囊模拟制剂(依照本制剂工艺制备而成)粉末 2g,同上法制成缺黄连的阴性对照品溶液。

对照品溶液的制备:精密称取干燥至恒重的盐酸小檗碱

标准品 10mg,置 100mL 容量瓶中,加盐酸-甲醇(1: 100)溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 1mL,置 10mL 容量瓶中,用盐酸-甲醇(1: 100)稀释于刻度,摇匀,作为对照品溶液。

3.3 线性关系考察

分别吸取上述对照品溶液 2,4,8,15,20,30,40μL,依次进样,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵座标,进样量(μg)为横座标,作线性回归,得线性方程为 $y = 233055072.20x - 1480272.98, r = 0.9998$ 。

3.4 精密度试验
取同一样品供试液 10μL,重复进样 6 次,测定峰面积积分值,RSD 为 1.07%。

3.5 阴性干扰试验

取阴性对照样品(缺黄连的本品)按样品溶液的制备和测定方法进行测定,记录色谱峰。结果表明,在与盐酸小檗碱对照品相应的位置上无干扰峰出现,说明组方中其他药味对测定结果无影响。

表 1 盐酸小檗碱的重复试验结果(n = 6)

Tab 1 The result of repeated test on Berberine hydrochloride (n = 6)

测定次数	保留时间	峰面积	含量 (mg/粒)	X	RSD (%)
1	10.29	25978714	14.73	14.15	3.49
2	10.23	26832740	14.39		
3	10.24	26986492	14.47		
4	10.24	24896502	13.35		
5	10.22	25890876	13.89		
6	10.22	26178127	14.04		

3.6 稳定性试验

取同一样品供试液和对照品溶液在 0,1,2,3,5,7h 分别

表 3 样品中盐酸小檗碱含量的测定结果(n = 4)

Tab 3 Determination result of Berberine hydrochloride in samples(n = 4)

序号	批号	样品重 (g)	峰面积	含量 (mg/g)	含量 (mg/粒)	平均值 (mg/粒)	RSD (%)
1	011015	1.9989	25574928	29.022	14.810	14.743	1.23
		2.0001	25249200	28.673	14.623		
		1.9997	25160416	28.577	14.574		
		1.9998	25888400	29.358	14.973		
2	021016	1.9899	25268096	29.693	14.847	14.742	2.42
		1.9090	26359680	29.864	14.932		
		2.1003	25016720	28.423	14.212		
		2.0001	26440944	29.951	14.976		
3	011017	2.0004	26483504	29.997	15.298	14.833	2.58
		2.0003	25234496	28.657	14.615		
		2.0011	25900224	29.371	14.979		
		2.0020	24916464	28.316	14.441		
三批含量均值						14.773 ±0.052	2.07 ±0.737

4 讨论

4.1 上述薄层色谱鉴定法均经阴性空白对照试验,结果表明,除被检药品的主成份外,制剂中的其他药物成分对主斑点无干扰,具有专属性和可行性。含量测定方法专属性强,重现性好,可作为本品的定性定量控制指标。

4.2 人参为本方中的佐药也属贵重药材,在复方中样品的前处理是在薄层鉴别中对所检成分要得到清晰点的基础。

进样 10μL(n = 2),测定峰面积积分值,RSD 分别为 1.89% 和 1.01%。

3.7 重复性试验

分别取同一批号(020115)的样品,按样品溶液的制备方法制备试验液,按样品测定法进样 6 次,计算盐酸小檗碱的含量。结果见表 1。

3.8 加样回收试验

取已知含量为每粒 14.28mg 的样品 6 份,分别加入一定量的盐酸小檗碱对照品,照样品溶液的制备方法制备试验溶液,进样 10μL,分别计算回收率,结果见表 2

表 2 盐酸小檗碱加样回收率测定结果(n = 6)

Tab 2 The result of recovery test on Berberine hydrochloride (n = 6)

样品号	含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
1	14.280	1.000	15.13	99.02	99.32	0.56
2	14.280	1.000	15.24	99.73		
3	14.280	4.000	18.33	100.27		
4	14.280	4.000	18.11	99.07		
5	14.280	8.000	22.02	98.83		
6	14.280	8.000	22.06	99.01		

3.9 样品的含量测定

取三个批号(011015,011016,011017)的制剂样品,按样品溶液的制备方法制备实验溶液,按样品测定法进样 10μL,3 次,按标准曲线法计算样品中盐酸小檗碱的含量和平均含量。结果见表 3

样品前处理中加入中性氧化铝目的是除去黄酮类、蒽醌类及其他成分的干扰;正丁醇萃取液用氨试液洗涤是为进一步除去黄酮、糖类及酸性皂苷和其他杂质成分,同时抑制人参皂苷单体间的转变,克服了常规用水洗涤容易产生乳化的现象。

4.3 含量测定方法中检测波长的选择 根据其紫外吸收,盐酸小檗碱的甲醇溶液在 225nm、270nm、331nm 处有最大吸

收,从检测灵敏度考虑也可以 225nm 检测波长,但由于本实验采用乙腈比例较大,本底吸收大,225nm 波长无法检测,270nm 波长干扰严重。采用 331nm 波长检测时虽然基线平稳,但制剂中盐酸小檗碱与其他组分不能达到完全分离,因此在选择流动相配比的同时不断变换检测波长,最终确定样品溶液在 345nm 波长处盐酸小檗碱与其他组分可达到基线分离,杂质干扰少,重现性好。

4.4 流动相采用乙腈-磷酸盐缓冲液 30: 70 的比例,使制剂中盐酸小檗碱色谱峰与其相邻的其他组分的分离度均大于 1.6,分离效果和峰形均最佳。

4.5 黄连中存在着结合成盐型和游离型两种形式的小檗碱,为了准确测定制剂中总的小檗碱的含量,采用盐酸-甲醇溶液回流提取之,使游离型成份转化为盐基型,以便测定完

全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2000 年版一部 142,149.
- [2] 吕武清. 中成药中的药材薄层色谱鉴别[M]. 北京:人民卫生出版社.
- [3] 周芝芳 林志红 清热解毒口服液质量控制研究[J] 中成药 1997;19(1):11.
- [4] 陈向阳 吴韶铭 香连丸中黄连素的 HPLC 法测定[J] 中成药 1998;20(9)15.

收稿日期:2003-06-26