

HPLC法同时测定香连化滞丸中7种成分的含量

周军*,张蕾,张莱,王杰(天津市药品检验所,天津 300070)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)06-0840-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.06.39

摘要 目的:建立同时测定香连化滞丸中芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸和厚朴酚7种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Porshell 120 SB C₁₈,流动相为90%乙腈(A)-5%乙腈(含0.1%磷酸,B)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30℃,进样量为3 μl,检测波长分别为芍药苷230 nm(0~10.0 min)、橙皮苷283 nm(10.1~13.0 min)、黄芩苷277 nm(13.1~14.4 min)、巴马汀(以盐酸巴马汀计)和小檗碱(以盐酸小檗碱计)265 nm(14.5~20.0 min)、甘草酸(以甘草酸铵计)250 nm(20.1~25.0 min)、厚朴酚290 nm(25.1~60.0 min)。结果:芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)和厚朴酚的检测进样量线性范围分别为0.013 88~0.694 5、0.039 93~1.996 8、0.070 08~0.389 3、0.006 48~0.324 0、0.010 52~0.526 2、0.008 816~0.440 7、0.007 224~0.361 2 μg ($r \geq 0.999 5$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;平均加样回收率分别为97.47%~102.88%、102.06%~102.81%、97.91%~100.80%、97.53%~101.60%、97.54%~100.68%、96.23%~99.00%、97.91%~101.44%,RSD分别为1.91%、0.25%、1.25%、1.66%、1.15%、1.11%、1.36%($n=6$)。结论:该方法简单、快速、准确,可用于香连化滞丸的质量控制。

关键词 香连化滞丸;芍药苷;橙皮苷;黄芩苷;巴马汀;小檗碱;甘草酸;厚朴酚;含量测定

Contents Determination of 7 Ingredient in Xianglian Huazhi Pill by HPLC

ZHOU Jun, ZHANG Lei, ZHANG Mo, WANG Jie(Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of paeoniflorin, hesperidin, baicalin, palmatine, berberine, glycyrrhizic acid, magnolol in Xianglian huazhi pill. METHODS: HPLC was conducted on the column of Agilent Porshell 120 SB-C18 with mobile phase of 90% acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid 5% aqueous acetonitrile (B) (gradient elution) at a flow rate 1.0 ml/min, the column temperature was 30℃, the injection volume was 3 μl, and the detection wavelength was 230 nm for paeoniflorin (0-10.0 min), 283 nm for hesperidin (10.1-13.0 min), 277 nm for baicalin (13.1-14.4 min), 265 nm for palmatine and berberine (14.5-20 min), 250 nm for glycyrrhizic acid (20.1-25.0 min) and 290 nm for magnolol (25.1-60.0 min). RESULTS: The linear range was 0.013 88-0.694 5 μg for paeoniflorin, 0.039 93-1.996 8 μg for hesperidin, 0.070 08-0.389 3 μg for baicalin, 0.006 48-0.324 0 μg for palmatine(counted by palmatine hydrochloride), 0.010 52-0.526 2 μg for berberine(counted by berberine hydrochloride), 0.008 816-0.440 7 μg for glycyrrhizic acid(counted by ammonium glycyrrhizinate) and 0.007 224-0.361 2 μg for magnolol ($r \geq 0.999 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; average recoveries were 97.47% -102.88% (RSD=1.91%, $n=6$), 102.06% -102.81% (RSD=0.25%, $n=6$), 97.91% -100.80% (RSD=1.25%, $n=6$), 97.53% -101.60% (RSD=1.66%, $n=6$), 97.54% -100.68% (RSD=1.15%, $n=6$), 96.23% -99.00% (RSD=1.11%, $n=6$) and 97.91% -101.44% (RSD=1.36%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the quality control of Xianglian huazhi pill.

KEYWORDS Xianglian huazhi pill; Paeoniflorin; Hesperidin; Baicalin; Palmatine; Berberine; Glycyrrhizic acid; Magnolol; Content determination

[5] Vinodhini R, Narayanan M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish cyprinus carpio (Common carp)[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2008, 5(2):179.

[6] Soylak M, Tuzen M. Coprecipitation of gold(Ⅲ), palladium(Ⅱ) and lead(Ⅱ) for their flame atomic absorption spectrometric determinations[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152(2):656.

[7] Tavakoli L, Yamini Y, Ebrahimzadeh H, et al. Development of cloud point extraction for simultaneous extraction and determination of gold and palladium using ICP-OES[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152(2):737.

[8] Wońska S, Godlewska-Żyłkiewicz B. Determination of plat-

inum and palladium in road dust after their separation on immobilized fungus by electrothermal atomic absorption spectrometry[J]. *Spectrochim Acta Part B Atomic Spectroscopy*, 2011, 66(7):522.

[9] Sharma RK, Pandeya A, Gulatia S, et al. Adholeya. An optimized procedure for preconcentration, determination and on-line recovery of palladium using highly selective diphenyldiketone-monothiosemicarbazone modified silica gel[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 209/210:285.

[10] 王超,张平,王刚.石墨炉原子吸收光谱法测定阿伐斯汀中残留钼元素[J]. *安徽医药*, 2009, 13(8):890.

[11] 周浩,成砚萍,崔艳,等.原子吸收分光光度法测定法罗培南钠中的钼[J]. *中外医疗*, 2012(5):61.

*副主任药师,硕士。研究方向:中药分析与质量控制。电话:022-23513806。E-mail:happy76dragon.com@aliyun.com

(收稿日期:2015-02-03 修回日期:2016-01-16)
(编辑:周 箐)

香连化滞丸是临床治疗腹泻的常用中成药,由黄连、黄芩、陈皮、麸炒枳实、醋青皮、姜厚朴、甘草、炒白芍、木香、炒槟榔、当归、滑石共12味中药组成,具有清热利湿、行血化滞的功效,用于大肠湿热所致的痢疾,症见大便浓血、里急后重、发热腹痛^[1]。该药处方中黄连、黄芩为君药;陈皮、枳实、青皮、厚朴、木香、槟榔为臣药;白芍、当归、滑石为佐药;甘草为使药。其中,白芍养血调经,敛阴止汗,柔肝止痛,平抑肝阳;枳实破气消积,化痰除痞;陈皮理气健脾,燥湿化痰;青皮疏肝破气,消积化滞;黄芩清热燥湿,泻火解毒,止血,安胎;黄连清热燥湿,泻火解毒;甘草补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和诸药;厚朴燥湿消痰,下气除满^[2]。香连化滞丸质量标准收载于《中国药典》2010年版第二增补本,含量测定项下仅要求测定黄连中盐酸小檗碱的含量。本试验建立高效液相色谱(HPLC)法同时测定白芍、陈皮、青皮、枳实、黄芩、黄连、厚朴、甘草8种药材中的主要有效成分芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸和厚朴酚的含量,旨在为控制和提高香连化滞丸的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括四元泵、紫外可变波长检测器(VWD)、自动进样器、Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);XS205型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);AS20500A型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

芍药苷对照品(批号:110736-201036,纯度:96.5%)、橙皮苷对照品(批号:110721-201014,纯度:95.1%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201117,纯度:91.7%)、盐酸巴马汀对照品(批号:110732-200506)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:86.7%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-201116,纯度:93.1%)、厚朴酚对照品(批号:110729-200412,纯度:96.5%)均购自中国食品药品检定研究院;香连化滞丸(天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂,批号:E416001、4160004、4160008、4160012,规格:6g/丸);制备阴性样品所用药材均为市售,并经我所吴贵华副主任药师鉴定;乙腈、甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);磷酸(分析纯,天津赢达稀贵化学试剂有限公司);水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Porshell 120 SB C₁₈(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm);流动相:90%乙腈(A)-5%乙腈(含0.1%磷酸,B),梯度洗脱(0~45 min, 5%→80% A; 45~50 min, 80%→95% A; 50~51 min, 95%→5% A; 51~60 min, 5% A);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量:3 μl;检测波长:芍药苷为230 nm(0~10.0 min)、橙皮苷为283 nm(10.1~13.0 min)、黄芩苷为277 nm(13.1~14.4 min)、巴马汀(以盐酸巴马汀计)和小檗碱(以盐酸小檗碱计)为265 nm(14.5~20.0 min)、甘草酸(以甘草酸铵计)为250 nm(20.1~25.0 min)、厚朴酚为290 nm(25.1~60.0 min)。在此色谱条件下,芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)和厚朴酚的保留时间分别为7.28、11.81、14.02、14.70、14.95、23.44、34.10 min,分离度均大于1.5,理论板数按小檗碱(以盐酸小檗碱计)峰计算应不低于15 000,且样品中其他成分对上述7种成分的测定无干扰。色谱见图1。

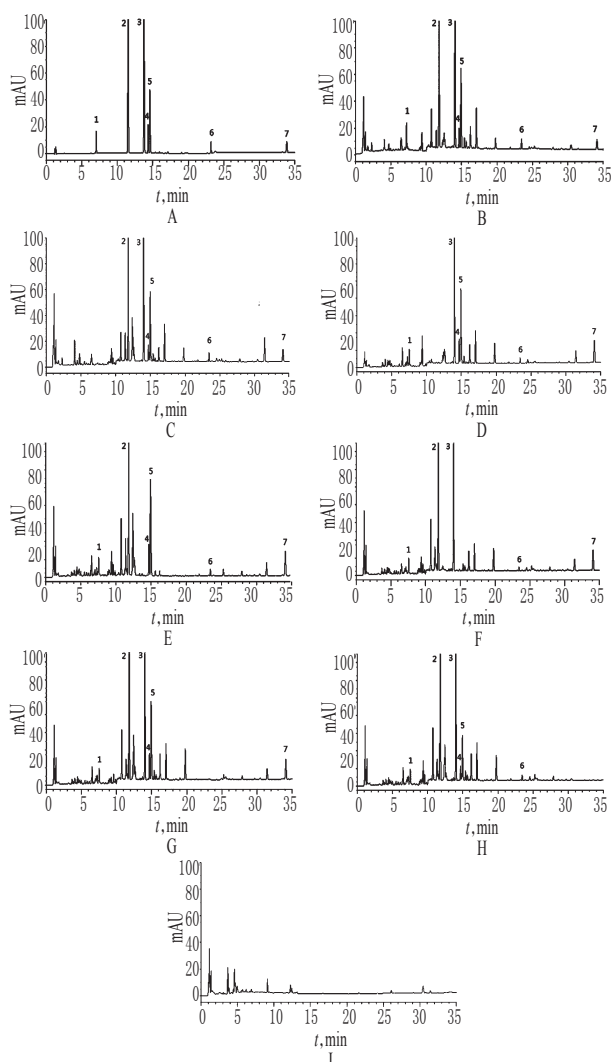


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺白芍的阴性对照;D.缺陈皮、青皮和枳实的阴性对照;E.缺黄芩的阴性对照;F.缺黄连的阴性对照;G.缺甘草的阴性对照;H.缺厚朴的阴性对照;I.缺白芍、陈皮、青皮、枳实、黄芩、黄连、甘草、厚朴的阴性对照;1.芍药苷;2.橙皮苷;3.黄芩苷;4.巴马汀(以盐酸巴马汀计);5.小檗碱(以盐酸小檗碱计);6.甘草酸(以甘草酸铵计);7.厚朴酚

Fig 1 HPLC chromatogram

A.reference substances; B.test sample; C.negative control without *Paeonia lactiflora*; D.negative control without *Citrus reticulata*, *Citrus reticulata* and *Aurantii Fructus Immature*; E.negative control without *Scutellaria baicalensis*; F.negative control without *Coptis chinensis*; G.negative control without *Glycyrrhiza uralensis*; H.negative control without *Magnolia officinalis*; I.negative control without *Paeonia lactiflora*, *Citrus reticulata*, *Citrus reticulata*, *Aurantii Fructus Immature*, *Scutellaria baicalensis*, *Coptis chinensis*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Magnolia officinalis*; 1.paeoniflorin; 2.hesperidin; 3.baicalin; 4.palmatine (counted by palmatine hydrochloride); 5.berberine (counted by berberine hydrochloride); 6.glycyrrhizic acid (counted by ammonium glycyrrhizinate); 7. magnolol

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、甘草酸铵和厚朴酚对照品适量,精密称定,用甲醇制成每1 ml分别含芍药苷22 μg、橙皮苷200 μg、黄芩苷117 μg、盐酸巴马汀10 μg、盐酸小檗碱24 μg、甘草酸铵19 μg

和厚朴酚 15 μg 的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,剪碎,精密称取 0.5 g,置于锥形瓶中,加入甲醇 50 ml,超声(功率:300 W,频率:50 kHz)处理 30 min后,置水浴上加热回流 30 min,放冷,滤过,残渣加甲醇重复回流提取 2次,滤过,残渣及滤纸用适量甲醇洗涤,合并滤液及洗涤液,减压浓缩至干,残渣加甲醇溶解并转移至 25 ml量瓶中,加甲醇定容,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 按处方及工艺制备分别不含白芍、陈皮(青皮、枳实)、黄芩、黄连、甘草、厚朴和上述 8种药材均不含的阴性样品,再分别按“2.2.2”项下方法操作,即得。

2.3 线性关系考察

精密称取芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、甘草酸铵和厚朴酚对照品各适量,用甲醇制成每 1 ml 分别含芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、甘草酸铵、厚朴酚 0.231 5、0.665 6、0.389 3、0.108 0、0.175 4、0.146 9、0.120 4 mg 的混合对照品溶液 I。分别精密吸取上述混合对照品溶液 I 5.0、2.5、1.0、0.5、0.2 ml,置于不同的 10 ml量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液 II、III、IV、V、VI。分别精密吸取上述 6 个质量浓度的混合对照品溶液各 3 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。分别以各自的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)、厚朴酚的回归方程分别为 $y = -1.696 0 + 1 301.4x (r = 0.999 9)$ 、 $y = 7.967 4 + 1 855.1 x (r = 0.999 8)$ 、 $y = 10.530 0 + 3 691.2x (r = 0.999 6)$ 、 $y = 1.024 1 + 4 304.8x (r = 0.999 8)$ 、 $y = 35.856 0 + 4 997.4 x (r = 0.999 5)$ 、 $y = 3.362 1 + 787.9x (r = 0.999 8)$ 、 $y = 4.431 6 + 1 606.9x (r = 0.999 6)$ 。结果表明,芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)、厚朴酚检测进样量线性范围分别为 0.013 88~0.694 5、0.039 93~1.996 8、0.070 08~0.389 3、0.006 48~0.324 0、0.010 52~0.526 2、0.008 816~0.440 7、0.007 224~0.361 2 μg。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6次,记录峰面积。结果,芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.52%、0.69%、0.87%、1.13%、0.90%、0.75%、0.98% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:4160012)适量,分别于放置 0、2、4、8、12、18、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.58%、0.85%、0.98%、1.75%、1.28%、1.26%、1.75% (n=7),表明供试品溶液在 24 h 内较稳定。

2.6 重复性试验

取同一供试品溶液(批号:4160012)适量,剪碎,精密称取 0.5 g,共 6 份,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含量。结果,芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)、厚朴酚含量分别为 1.33、10.51、3.92、0.34、1.23、0.96、0.66 mg/g, RSD 分别为 1.62%、0.75%、

0.84%、1.78%、1.36%、0.92%、1.89% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取同一供试品(批号:4160012)适量,剪碎,精密称取 0.25 g,共 6 份,分别精密加入供加样回收率试验用的混合对照品溶液 50 ml(含芍药苷 3.94 μg/ml、橙皮苷 52.30 μg/ml、黄芩苷 20.10 μg/ml、盐酸巴马汀 1.62 μg/ml、盐酸小檗碱 4.72 μg/ml、甘草酸铵 4.41 μg/ml、厚朴酚 3.61 μg/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 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
芍药苷	0.334 9	0.347 2	0.690 3	102.36	101.06	1.91			
	0.333 7	0.347 2	0.672 1	97.47					
	0.335 3	0.347 2	0.684 8	100.66					
	0.336 9	0.347 2	0.688 1	101.15					
	0.344 1	0.347 2	0.701 3	102.88					
	0.334 3	0.347 2	0.687 9	101.84					
	橙皮苷	2.642 8	2.615 0	5.328 0			102.69	102.50	0.25
		2.633 3	2.615 0	5.312 9			102.47		
		2.658 6	2.615 0	5.340 5			102.56		
		2.667 0	2.615 0	5.336 0			102.06		
		2.715 3	2.615 0	5.403 9			102.81		
		2.631 2	2.615 0	5.308 8			102.39		
黄芩苷	0.986 6	1.005 0	1.970 6	97.91	99.17	1.25			
	0.983 0	1.005 0	1.972 4	98.44					
	0.987 7	1.005 0	1.981 3	98.86					
	0.992 5	1.005 0	1.980 8	98.34					
	0.995 6	1.005 0	2.007 1	100.65					
	0.985 0	1.005 0	1.998 0	100.80					
	巴马汀(以盐酸巴马汀计)	0.085 4	0.081 0	0.164 4			97.53	98.56	1.66
		0.085 1	0.081 0	0.164 3			97.78		
		0.085 9	0.081 0	0.168 2			101.60		
0.086 2		0.081 0	0.166 6	99.26					
0.087 8		0.081 0	0.166 9	97.65					
0.085 1		0.081 0	0.164 1	97.53					
小檗碱(以盐酸小檗碱计)		0.310 3	0.236 1	0.543 6	98.81	99.05	1.15		
		0.310 7	0.236 1	0.548 4	100.68				
	0.312 2	0.236 1	0.547 5	99.66					
	0.313 1	0.236 1	0.548 0	99.49					
	0.318 8	0.236 1	0.550 4	98.09					
	0.308 9	0.236 1	0.539 2	97.54					
	甘草酸(以甘草酸铵计)	0.241 8	0.220 4	0.458 4	98.28			97.85	1.11
		0.241 0	0.220 4	0.459 2	99.00				
		0.242 1	0.220 4	0.456 6	97.32				
		0.243 3	0.220 4	0.461 4	98.96				
0.244 0		0.220 4	0.458 5	97.32					
0.240 8		0.220 4	0.452 9	96.23					
厚朴酚		0.166 7	0.180 6	0.347 7	100.23	99.68	1.36		
		0.166 1	0.180 6	0.342 9	97.91				
	0.166 9	0.180 6	0.345 6	98.96					
	0.168 2	0.180 6	0.351 4	101.44					
	0.171 3	0.180 6	0.349 1	98.48					
	0.166 4	0.180 6	0.346 1	99.49					

2.8 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,按外标法计算样品含量,结果见表 2。

表2 样品含量测定结果($n=2$, mg/丸)Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=2$, mg/pill)

待测成分	样品			
	E416001	4160004	4160008	4160012
芍药苷	10.18	2.64	11.00	7.98
橙皮苷	46.82	38.67	36.01	63.06
黄芩苷	21.04	20.43	23.35	23.52
巴马汀(以盐酸巴马汀计)	1.58	1.63	2.06	2.04
小檗碱(以盐酸小檗碱计)	6.27	6.40	7.27	7.38
甘草酸(以甘草酸铵计)	1.39	2.16	1.55	5.76
厚朴酚	6.93	2.34	1.00	3.60

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本试验采用规格为100 mm×4.6 mm、粒径为2.7 μm的色谱柱,可以方便地在普通HPLC仪上使用,与常用的5 μm色谱柱相比,提高了分离效果,减少了分析时间,节约了有机溶剂,极大地提高了工作效率。

3.2 提取方法考察

由于样品为大蜜丸,并且7种待测成分的含量及溶解度相差较大,经试验发现仅一次不能提取完全,因此采用多次提取法提取。经比较,采用甲醇加热回流提取3次,可将上述成分提取完全;同时,本品为大蜜丸,为了防止部分样品不能完全散开,影响提取效果,故在回流提取前增加超声处理的步骤。

3.3 流动相的选择

本试验曾对多种流动相系统进行了考察,以乙腈-0.1%磷酸进行梯度洗脱,结果样品色谱中巴马汀(以盐酸巴马汀计)色谱峰与杂质峰分离较差;以乙腈-0.1%磷酸(含0.1%十二烷基硫酸钠)进行梯度洗脱,结果样品色谱中巴马汀(以盐酸巴马汀计)和小檗碱(以盐酸小檗碱计)色谱峰的保留时间大幅度增加,而巴马汀(以盐酸巴马汀计)与杂质峰的分离效果仍不理想;以乙腈-0.1%磷酸(含0.1%三乙胺)进行梯度洗脱,结果样品色谱中黄芩苷和橙皮苷色谱峰与杂质峰分离较差^[3-6]。最终,采用90%乙腈-含0.1%磷酸的5%乙腈水溶液为流动相,结果样品色谱中芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀(以盐酸巴马汀计)、小檗碱(以盐酸小檗碱计)、甘草酸(以甘草酸铵计)和厚朴酚色谱峰与杂质峰分离较好,分离度均>1.5。

3.4 检测波长的确定

芍药苷等7种成分最大吸收波长从230 nm至290 nm相差极大,因此本试验采用相关被测定成分的最大吸收波长作为检测波长:230 nm(芍药苷)、283 nm(橙皮苷)、277 nm(黄芩苷)、265 nm[巴马汀(以盐酸巴马汀计)和小檗碱(以盐酸小檗碱计)]、250 nm[甘草酸(以甘草酸铵计)]、290 nm(厚朴酚);分析时采用Agilent VWD检测器,在上述7种成分出峰的不同时间采用不同的检测波长,以达到最佳的分析效果。同时,经二极管阵列检测器分析,样品中的上述7种成分色谱峰均为纯的色谱峰。

3.5 柱温的选择

本试验曾比较不同柱温(30、35、40 ℃)条件下样品的分离情况,结果以柱温为30 ℃时样品分离较好。

3.6 进样量的确定

本试验发现,当进样量为5 μl时,样品色谱中部分色谱峰峰形较差,出现肩峰;经调整进样量,减小为3 μl或更小时,峰形较好。分析原因为粒径为2.7 μm的色谱柱承载量较5 μm色谱柱小,应该减小进样量,避免色谱柱超载。故最终选择进样量为3 μl。

3.7 耐用性试验

采用Agilent 1200、Waters e2695型HPLC仪,按本试验色谱条件,分别以Agilent Porshell 120 SB C₁₈(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm)色谱柱进行测定,结果在不同仪器中上述7种成分的分​​离效果均满意。但当使用其他色谱柱进行试验时,因为供试品中有7种待测成分,同时其他成分较多,部分待测成分的分​​离不是很理想,提示色谱条件仍有待进一步的改进。

3.8 难点分析

黄连和黄芩是处方中的君药,黄连中巴马汀与小檗碱的分离是试验中的难点,因为当调整流动相使巴马汀(以盐酸巴马汀计)与小檗碱(以盐酸小檗碱计)的保留时间逐步延长时,巴马汀(以盐酸巴马汀计)与小檗碱(以盐酸小檗碱计)的色谱峰会慢慢融合,最后会合并变成一个峰;当加入离子对试剂如十二烷基硫酸钠后,由于离子对试剂的作用可以延长生物碱类成分的保留时间,将上述两种生物碱色谱峰分开,但此时巴马汀(以盐酸巴马汀计)色谱峰与其他杂质峰的分离较差。在经过大量试验后,采用本文中的色谱条件可以很好将巴马汀(以盐酸巴马汀计)与小檗碱(以盐酸小檗碱计)色谱峰分离,分离度达到1.5以上。

综上所述,本方法简单、快速、准确,可同时测定香连化滞丸中芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸和厚朴酚的含量,适用于该制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第二增补本[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2013:57.
- [2] 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,2010:80、96、176、182、230、235、282、285.
- [3] 饶毅,魏惠珍,方海红,等.HPLC法同时测定双黄消炎片中黄芩苷、药根碱、巴马汀及小檗碱的含量[J].药物分析杂志,2008,28(4):537.
- [4] 张捷,谭生建,王欢,等.高效液相色谱法测定小儿润肺止咳口服液中橙皮苷和黄芩苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(8):1451.
- [5] 薛薇,毛菊华,王志芳.HPLC法同时测定补中益气丸中3种活性成分的含量[J].中国药房,2014,25(16):1524.
- [6] 郝乘仪,郭淑英,冯波,等.RP-HPLC法同时测定芎藭上清丸中绿原酸、盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J].药物分析杂志,2014,34(1):193.

(收稿日期:2015-02-26 修回日期:2016-01-14)

(编辑:周 箫)