

UPLC法测定复方黄葛降糖片中盐酸小檗碱的含量

杨玉珍*(德州市市立医院,山东德州 253012)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-3004-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.41

摘要 目的:建立测定复方黄葛降糖片中盐酸小檗碱含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(21:79, V/V),流速为0.3 ml/min,检测波长为345 nm,柱温为30 ℃,进样量为1.0 μl。结果:盐酸小檗碱检测进样量线性范围为0.008 16~0.081 6 μg($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率为97.05%~98.96%(RSD=0.66%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于复方黄葛降糖片中盐酸小檗碱含量的测定。

关键词 复方黄葛降糖片;盐酸小檗碱;超高效液相色谱法

Content Determination of Berberine Hydrochloride in Fufang Huangge Jiangtang Tablet by UPLC

YANG Yuzhen(Dezhou Municipal Hospital, Shandong Dezhou 253012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of berberine hydrochloride in Fufang huangge jiangtang tablet. METHODS: UPLC was performed on the column of Acquity UPLC BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% H₃PO₄(21:79, V/V) at flow rate of 0.3 ml/min, the detection wavelength was 345 nm, column temperature was 30℃, and the volume injection was 1.0 μl. RESULTS: The linear range of berberine hydrochloride was 0.008 16-0.081 6 μg($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility were lower than 1%; average recovery was 97.05%-98.96% (RSD=0.66%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stability and reproducible, and can be used for the quality control of Fufang huangge jiangtang tablet.

KEYWORDS Fufang huangge jiangtang tablet; Berberine hydrochloride; UPLC

复方黄葛降糖片由黄连、葛根、山茱萸、知母、山药等10味中药组方而成,具有清热养阴、健脾补气之功效,用于烦热口渴、小便黄赤者,为治疗糖尿病的临床经验方,临床疗效确切。方中黄连为君药,其主要成分为盐酸小檗碱。据文献报道,盐酸小檗碱具有抑菌、抗炎等药理作用^[1-2],此外还具有良好的降血糖作用^[3-4]。因此,笔者参考相关文献^[5-6],采用超高效液相色谱法(UPLC)测定复方黄葛降糖片中盐酸小檗碱的含量,以期为该制剂的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

H-CLASS型UPLC仪,包括PDA紫外-可见检测器、Empower化学工作站(美国Waters公司);KH-300DE型超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司);BT125D型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 药品与试剂

复方黄葛降糖片(某院制剂室提供,批号:150413、150415、150420,规格:0.3 g/片);盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200212,纯度:98%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸(21:79, V/V);流速:0.3 ml/min;检测波长:345 nm;柱温:30 ℃;进样量:1.0 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱对照品8.16 mg,置于20 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为0.408 0

mg/ml的盐酸小檗碱对照品贮备液;精密吸取上述对照品贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇制成质量浓度为0.040 8 mg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品10片,研细,取约0.1 g,精密称定,置于25 ml量瓶中,加入甲醇约20 ml,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)处理30 min,放冷,加甲醇定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按复方黄葛降糖片处方和制备工艺制备缺黄连的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,见图1。结果,理论板数以盐酸小檗碱峰计>3 000,分离度>1.5,阴性对照在盐酸小檗碱对照品出峰处无其他组分干扰,表明该方法的专属性良好。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以盐酸小檗碱进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=13\ 936\ 908x-4\ 468$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,盐酸小檗碱检测进样量线性范围为0.008 16~0.081 6 μg。

2.5 精密性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱峰面积的RSD=0.34%($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:150413)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,

*主管药师。研究方向:医院药学。E-mail:sddzyzz@163.com

记录峰面积。结果,盐酸小檗碱峰面积的RSD=0.49% (n=6),表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

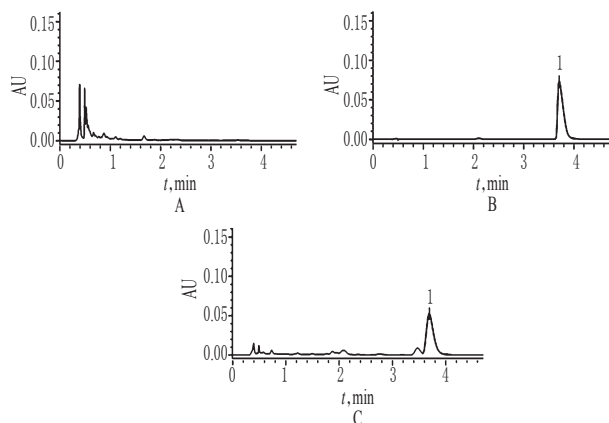


图1 超高效液相色谱图

A.阴性对照;B.对照品;C.供试品;1.盐酸小檗碱

Fig 1 UPLC chromatograms

A.negative control;B.reference substance;C.test sample; 1.berberine hydrochloride

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:150413)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,盐酸小檗碱含量平均值为8.39 mg/g, RSD=0.21% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:150413)适量,共6份,分别加入一定质量的盐酸小檗碱对照品,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 test (n=6)

称样量,g	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,%
0.0501	0.4203	0.4080	0.8163	97.05	98.35	0.66
0.0495	0.4153	0.4080	0.8175	98.59		
0.0498	0.4178	0.4080	0.8196	98.49		
0.0479	0.4018	0.4080	0.8034	98.43		
0.0475	0.3985	0.4080	0.8022	98.96		
0.0479	0.4018	0.4080	0.8041	98.59		

2.9 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并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples (n=3)

样品批号	含量,mg/g	RSD,%
150413	8.39	0.22
150415	8.43	0.31
150420	8.38	0.19

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

2015年版《中国药典》^[7]采用乙腈-磷酸盐-离子对试剂流动相系统测定黄连中盐酸小檗碱,流动相配制过程复杂,且因为添加了离子对试剂,平衡柱子的时间很长。本研究采用乙腈-0.1%磷酸的流动相,尝试在不同流动相比条件下分离盐

酸小檗碱,结果在乙腈-0.1%磷酸(21:79, V/V)条件下,盐酸小檗碱与样品中其他杂质能完全分离。该流动相配制简单易行,且分析速度快,分离效率高,每个样品在5 min之内即可完成分离和分析。此外,本研究所建立的色谱方法流速为0.3 ml/min,相比普通液相1 ml/min的流速,长达十几甚至几十分钟的分时间,很大程度上减少了流动相尤其是有机溶剂的使用,环保、高效。

3.2 检测波长的选择

对盐酸小檗碱对照品溶液在200~400 nm波长范围内进行光谱扫描,结果盐酸小檗碱在228、264、345 nm波长处均有较大吸收。考虑在345 nm波长处其他杂质干扰最小,并结合2015年版《中国药典》,最终确定检测波长为345 nm。

3.3 提取方法的考察

分别以甲醇超声与回流两种方法处理样品,结果盐酸小檗碱提取率相差不大,由于超声提取简便易行,因此选择超声提取法。接着,比较了30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇和乙醇为提取溶剂,结果表明,甲醇的提取效果最好,杂质干扰最小。最后,分别考察了超声5、15、30、45 min对提取率的影响,结果表明,超声30 min时成分已提取完全。因此,最终选择采用甲醇超声提取30 min的提取方法。

3.4 UPLC方法的比较

有关黄连中主要药效成分盐酸小檗碱的UPLC含量测定方法报道较多,陈健龙等^[8]使用了乙腈-乙酸铵-甲酸等度洗脱,色谱峰略有拖尾,且流动相配制过程较烦琐,周芙琼等^[9]使用了甲醇-磷酸梯度洗脱,分析时间长且每次运行前需平衡色谱柱,增加了耗时。本研究仅测定该制剂中盐酸小檗碱含量,采用乙腈-磷酸等度洗脱,操作简便,分析时间短。对于该制剂中多种成分的分析测定将在以后的工作中进一步研究。

综上所述,本方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于复方黄葛降糖片中盐酸小檗碱含量的测定。

参考文献

- [1] 杨勇,雷志英,吴方评,等.小檗碱的抗菌作用研究进展[J].现代生物医学进展,2010,10(9):1783.
- [2] 叶宝娜,郝满良,刘萍,等.小檗碱的抗炎作用[J].中国畜牧兽医,2007,34(5):52.
- [3] 魏敬,吴锦丹,蒋建东,等.盐酸小檗碱治疗II型糖尿病合并脂肪肝的临床研究[J].中西医结合肝病杂志,2004,14(6):334.
- [4] 岳晶晶,李萍,何庆.小檗碱改善胰岛素抵抗的机制[J].天津中医药大学学报,2013,32(3):186.
- [5] 李茂森.复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定方法改进[J].中国药业,2013,22(14):68.
- [6] 刘善新,靳光乾,王亮.三黄汤制炉甘石中盐酸小檗碱的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):107.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:303.
- [8] 陈健龙,张玉玲,肖胜利,等.UPLC法同时测定黄连与代综方中4种生物碱的含量[J].中国药房,2013,24(23):2152.
- [9] 周芙琼,夏崇才,隆红艳,等.UPLC法同时测定止痒洗剂中盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素的含量[J].中药新药与临床药理,2014,25(6):730.

(收稿日期:2015-08-24 修回日期:2015-12-31)

(编辑:张静)