

HPLC 法测定连蒲双清片中咖啡酸及盐酸小檗碱的含量

植达诗, 周颖*, 朱旭林¹ (广西玉林食品药品监督管理局, 玉林 537000; ¹ 成都中医药大学中药学院)

摘要: 采用高效液相色谱法测定连蒲双清片中咖啡酸及盐酸小檗碱含量。色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相 A: 乙腈, B: 0.5% 三乙胺水溶液 (用磷酸调 pH 值为 3.14) [0~13min (A: B= 12: 88), 13~35min (A: B= 25: 75)], 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 320nm, 进样量: 10μL。盐酸小檗碱在 148~740μg ($r=0.9996$)、咖啡酸在 1~20μg ($r=0.9995$) 范围内具有良好的线性关系, 平均回收率分别为 99.64% (RSD=0.81%)、99.45% (RSD=1.18%)。本方法准确可靠, 简单易行, 可用于连蒲双清片的含量测定。

关键词: 连蒲双清片; 咖啡酸; 盐酸小檗碱; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2008) 08-0675-03

Determination of Caffeic Acid and Berberine Hydrochloride in Lianpu Shuangqing Pian by HPLC

Zhi Dashi, Zhou Ying* and Zhu Xulin¹ (Guangxi Yulin Institute For Food And Drug Control, Guangxi 537000; ¹School of Pharmacy, Chengdu College of Traditional Medicine)

ABSTRACT Use HPLC method measurement Lianpu Shuangqing Pian double caffeic acid and berberine hydrochloride content. The assay was performed on Diamonsil C₁₈ with flow gradient A: acetonitrile, B: 0.5% chemical reagent (adjust pH to be worth to 3.14 with the phosphoric acid) 0~13min (12%A+ 88%B) 13~35min (25%A+ 75%B) current velocity: 1.0 mL · min⁻¹, the examination wave-length is 320 nm. Berberine hydrochloride was sour in 148~740 μg, caffeic acid at 1~20 μg had the good line form relation ($r=0.9997$, $r=0.9996$), the average recovery rate distinguished to 99.64%, 99.45%. This method is accurate, reliable, simple and feasible. It can be used for the determination of caffeic acid and berberine hydrochloride in Lianpu Shuangqing Pian.

KEY WORDS Lianpu Shuangqing Pian; caffeic acid; berberine hydrochloride; HPLC

连蒲双清片是生活常用药, 由盐酸小檗碱、蒲公英浸膏为主要原料制成。具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋、燥湿止痢的功效, 用于治疗肠炎痢疾、疖肿外伤发炎、乳腺炎、胆囊炎等症。蒲公英浸膏中主要含咖啡酸, 咖啡酸具有广泛的抑菌和抗病毒的活性, 有止血、镇咳、祛痰的作用。而在《卫生部药品标准》第十三册中仅用紫外分光光度法对盐酸小檗碱含量进行分析测定。高效液相色谱法有分离并同时检测的优点, 且操作方便, 专属性

强, 分析效果好。故本实验希望通过建立该制剂中咖啡酸和盐酸小檗碱的反相高效液相色谱法, 为进一步提高本制剂的质量标准提供依据。

1 仪器与试剂

LG-10AD 型高效液相色谱仪 (岛津, 包括岛津 LG-10AD 输液泵; SPD-10A vp 型紫外检测器; 威玛龙数据处理工作站); GR-202 电子分析天平 (A&D Company)。乙腈、三乙胺、甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为实验室 iv 级纯化水。

盐酸小檗碱 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110713-200208), 咖啡酸 (中国药品生物制品检定所, 批号: 885-200001), 连蒲双清片 (三门峡莘原制药有限公司, 批号: 050105, 050414, 060305), 阴性实验所用药材 (广西玉林食品药品监督管理局检验所中药室主任巫贵赞鉴定为正品)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm), 流动相: A 为乙腈, B 为 0.5% 三乙胺水溶液 (用磷酸调 pH 值为 3.14), 按表 1 进行梯度洗脱, 稳定 10min 后能够进行下一次测定; 检测波长: 320nm; 柱温: 室温; 流速: 1.0mL · min⁻¹; 进样量: 10μL。理论塔板数按盐酸小檗碱、咖啡酸计算, 都应不低于 3000。

表 1 流动相梯度洗脱配比表

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~ 13	12~ 25	88~ 75
13~ 35	25	75

2.2 供试液及对照液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 18.50mg 置 25mL 容量瓶中, 咖啡酸对照品 10mg 置 500mL 容量瓶中, 加甲醇制成 740μg · mL⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液和 20μg · mL⁻¹ 咖啡酸对照品溶液备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品 (批号: 050414) 20 片, 除去糖衣, 精密称定, 研细, 取样品细粉约 1g 精密称定, 置 150mL 具塞锥形瓶

中, 精密加入甲醇 50mL, 称定重量, 超声提取 30min (功率 150W, 频率 50KHz), 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例及制备工艺, 分别制成不含蒲公英浸膏或盐酸小檗碱的阴性样品, 并按照上述供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。结果表明阴性对照溶液无干扰, 见图 1。

2.3 线性关系考察

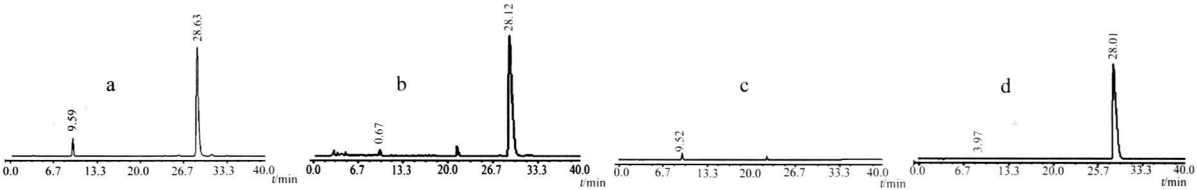
分别吸取盐酸小檗碱对照品溶液 (740μg · mL⁻¹) 2, 3, 4, 5, 6mL 置 10mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度, 制成浓度分别为 148, 222, 296, 370, 444μg · mL⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液, 分别吸取 148, 222, 296, 370, 444, 740μg · mL⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液 10μL 按上述色谱条件进样, 以对照品溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程:

$$Y = 1.3933 \times 10^4 X + 7.05892 \times 10^5 \quad r = 0.9996$$

分别吸取咖啡酸对照品溶液 (20μg · mL⁻¹) 0.5, 1, 2, 4, 5mL 置 10mL 容量瓶中加甲醇稀释至刻度, 制成浓度分别为 1, 2, 4, 8, 10μg · mL⁻¹ 咖啡酸对照品溶液, 分别吸取 1, 2, 4, 8, 10, 20μg · mL⁻¹ 咖啡酸对照品溶液 10μL 按上述色谱条件进样, 以对照品溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程:

$$Y = 9.5774 \times 10^4 X + 4.2243 \times 10^4 \quad r = 0.9995$$

结果表明盐酸小檗碱在 148~ 740μg, 咖啡酸在 1~ 20μg 的范围内具有良好的线性关系。



a. 对照品; b. 供试品; c. 阴性对照 (缺盐酸小檗碱); d. 阴性对照 (缺蒲公英浸膏); 1. 咖啡酸; 2. 盐酸小檗碱。

图 1 连蒲双清片 HPLC 色谱图

2.4 精密度试验

分别精密吸取 740μg · mL⁻¹ 的盐酸小檗碱对照品溶液以及 4μg · mL⁻¹ 咖啡酸对照品溶液 10μL, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 分别测定两者的峰面积, 计算盐酸小檗碱 RSD = 0.80%; 咖啡酸 RSD = 0.95%。

2.5 重复性试验

分别取同一批号样品 (批号: 050414) 5 份, 每份 1g, 按供试品项下制备方法进行提取处理, 进行进样分析, 每份样品连续进样 2 次, 结果盐酸小檗碱 RSD = 0.84%, 咖啡酸 RSD = 0.56%。

2.6 稳定性试验

室温条件下, 精密吸取同一批号供试品 (批号: 050414) 溶液 10μL 分别于 0, 2, 4, 8, 24h

依法进样, 测定两者的峰面积。计算盐酸小檗碱 RSD= 0.57%, 咖啡酸 RSD= 0.44%。结果表明供试品溶液在 24h 内保持含量稳定。

2.7 加样回收实验

分别取已知含量的样品 (批号: 050414) 约 0.5g 共 6 份, 精密称定, 分别置 50mL 容量瓶内, 精密加入 $370\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸小檗碱对照品溶液 4mL 共 6 份; 以及 $2\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的咖啡酸对照品溶液 1mL 共 6 份。按供试品溶液处理方法处理, 在上述色谱条件分别进行含量测定, 计算回收率, 结果盐酸小檗碱平均回收率为 99.64%, RSD= 0.81%; 咖啡酸平均回收率为 99.45%, RSD= 1.18%。具体结果见表 2、表 3。

表 2 盐酸小檗碱加样回收测定结果 (n= 6)

供试品含 有量(mg)	对照品加 入量(mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
1.7351	1.4760	3.2217	100.72		
1.7306	1.4760	3.2111	100.30		
1.7320	1.4760	3.1866	98.55	99.64	0.81
1.7344	1.4760	3.2080	99.83		
1.7351	1.4760	3.2014	99.34		
1.7351	1.4760	3.1974	99.07		

表 3 咖啡酸加样回收测定结果 (n= 6)

供试品含 有量(mg)	对照品加 入量(mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
0.00276	0.00212	0.00489	100.47		
0.00276	0.00212	0.00484	98.11		
0.00276	0.00212	0.00487	99.52	99.45	1.18
0.00277	0.00212	0.00491	100.94		
0.00277	0.00212	0.00485	98.11		
0.00277	0.00212	0.00488	99.53		

2.8 样品测定

取三门峡莘原制药有限公司生产的连蒲双清片 3 批, 按样品制备项下处理后, 在上述色谱条件下分析, 用外标法以峰面积计算, 测得盐酸小檗碱和咖啡酸含量, 结果见表 4。

表 4 不同生产批号连蒲双清片的含量 (n= 3) mg/片

批号	盐酸小檗碱含量	咖啡酸含量
050105	8.6609	0.0452
050414	8.6857	0.0455
060305	9.9460	0.0448

3 讨论

3.1 供试品提取方法的选择

进行了超声提取和回流提取方法比较, 结果在两种提取方法制备供试品中含量差异不大。考虑到

超声提取快速、简单, 提取效率高, 故选择超声提取方法。

3.2 供试品提取时间的选择

称取同一样品 (批号: 050414) 5 份各 1g, 精密称定, 按供试品项下提取处理后, 通过超声 20, 25, 30, 35, 45min 提取时间的考察, 结果提取时间为 20 和 25min 时提取并不完全, 而 30 与 35、45min 提取时间比较时出峰结果基本一致。最后采用超声 30min 提取样品。

3.3 测定波长的选择

本实验比较了 265, 270, 320, 323, 345nm 等吸收波长, 结果 320nm 为检测波长时, 盐酸小檗碱和咖啡酸峰形较好且杂质峰少, 易于检识所测成分。

3.4 流动相的选择

大量文献报道采用含盐成分的流动相来分离盐酸小檗碱和咖啡酸。而本次实验通过优化流动相系统, 选择不含盐成分的流动相 (乙腈-0.5% 三乙胺水溶液) 进行梯度洗脱, 从而减少对柱子的损伤, 并且能较好分离出盐酸小檗碱和咖啡酸。

3.5 与原方法比较

本法与《中国药典》记载的紫外分光光度法含量测定进行了比较, HPLC 法与紫外分光光度法对连蒲双清片中盐酸小檗碱含量测定结果基本一致, 但 HPLC 法具有分离咖啡酸及盐酸小檗碱并同时检测的优点, 且操作方便, 专属性强, 分析效果好, 且供试品不易流失, 为连蒲双清片质量控制和评价提供了依据。

参考文献:

[1] 卫生部药品标准 [S]. 中药成方制剂. 十三册, 1997.
[2] 李艳荣, 蒋晔, 郝福, 等. RP-HPLC 同时测定功劳去火片中栀子苷、黄芩苷及盐含量 [J]. 中成药, 2006, 28 (8): 1126.
[3] 张才煜, 孙权, 刘敬阁. 不同地区蒲公英中咖啡酸的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (9): 776.
[4] 曹现峰, 沈嘉. 黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱测定条件初探 [J]. 中成药, 2003, 25 (7): 519.
[5] 中国药典 [S]. 一部, 2005: 381, 244, 591.
[6] 张爱华, 王纯明, 伏太招, 等. HPLC 法测定蒲公英及保肝奶蓟草胶囊中咖啡酸的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2002, 18 (5): 298.
[7] 张旭东, 张淑惠, 张西茹, 等. 反向高效液相色谱法测定抗菌 2 号注射液中的咖啡酸 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20 (6): 511.