

全自动在线固相萃取-高效液相色谱法 快速测定中药复方中小檗碱的含量

李玲¹, 张大伟¹, 王琳琳¹, 张艳海^{2*}

(1. 黑龙江省农垦总局总医院, 黑龙江 哈尔滨 150088;

2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201203)

[摘要] **目的:**建立在线固相萃取-HPLC 方法测定中药复方中小檗碱的含量。**方法:**通过双梯度高效液相系统中的一个泵(上样泵)实现净化,再经过阀切换将目标物从固相萃取柱中切换至分析柱中进行测定。上样泵以乙腈-500 mmol·L⁻¹醋酸铵溶液为流动相,采用硅胶基质强阳离子交换小柱(4.6 mm×50 mm,300 Å)为在线固相纯化柱,采用梯度洗脱方式进行样品净化;分析泵以乙腈-30 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾为流动相,采用 Acclaim C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)柱,柱温 35 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,UV 检测波长为 345 nm。**结果:**小檗碱在 1.24~124 mg·L⁻¹线性关系较好($r=0.999$),平均回收率 99.5%。**结论:**方法快速、简便,专属性、重复性较好,测定结果准确。

[关键词] 在线固相萃取; 高效液相色谱法; 小檗碱, 双梯度系统

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0088-03

Automated Online-SPE-HPLC for Rapid Determination of the Content of Berberine in the Chinese Traditional Medicine Compound

LI Ling¹, ZHANG Da-wei¹, WANG Lin-lin¹, ZHANG Yan-hai^{2*}

(1. Heilongjiang Agricultural Reclamation General Hospital, Harbin 150088, China;

2. Thermofisher Scientific, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for determining the content of berberine in traditional Chinese medicine with online solid phase extraction-HPLC. **Method:** Using one of the dual gradient pumps to enrich and purify the sample solution, then wash the aimed analyte into analytical column by switching the valve to another position after removing of matrix interference substance. Silica-based strong cation exchange column (300 Å, 4.6 mm×50 mm) was used as online-SPE column with a mobile phase consisting of acetonitrile-500 mmol·L⁻¹ ammonium acetate in a gradient elution. Acclaim C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used as analytical column with a mobile phase of acetonitrile-30 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. UV detection wavelength was set up at 345 nm. **Result:** There is a good linear relationship ($r = 0.999$) within the concentration range of 1.24-124 mg·L⁻¹. The average recovery was 99.5%. **Conclusion:** This method was simple, fast and has a better speciality. The results of determination were reliable and reproducible by validating for accuracy, precision and reproducibility.

[Key words] online solid phase extraction; HPLC; berberine; dual gradient system

小檗碱又称黄连素,是一种常见的异喹啉生物碱,存在于小檗科等 4 个科 10 个属的多种植物中,

[收稿日期] 20120215(019)

[第一作者] 李玲,主管中药师,从事中药药理研究, Tel: 15945157760, E-mail: liling9812@126.com

[通讯作者] *张艳海,工程师,从事中药化学和仪器分析, Tel:021-58957001, E-mail: Yanhai.zhang@thermofisher.com

具有较强的抗菌活性,常作为中药复方的活性成分和主要质量评价的指标性成分。关于盐酸小檫碱的含量测定方法文献报道较多,早期较多采用分光光度法和薄层扫描法,随着近年来仪器技术的发展,毛细管电泳法^[1-2]和高效液相色谱法^[3]应用较多。在2010年版《中国药典》一部^[4]中,也多采用高效液相色谱法,以磷酸盐缓冲溶液和离子对试剂作为流动相;对于基质过于复杂的中药,如黄连上清丸和导赤丸等,样品常需经过氧化铝柱的净化处理。在线柱切换的方法作为一种自动程度较高的前处理方法,在中药小檫碱的分析中未见报道。本文选取了黄连上清丸、导赤丸、知柏地黄丸、牛黄上清丸、黄连羊肝丸、颈复康颗粒和保健品洁阴洗液等样品,采用在线固相萃取法进行了分析,测定了其中小檫碱的含量。

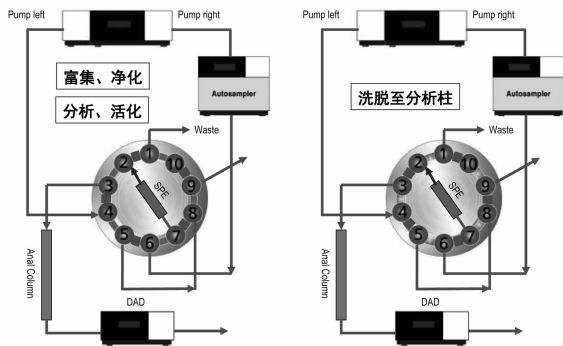


图1 全自动在线固相萃取流路示意

1 仪器与试剂

双三元液相色谱系统(赛默飞世尔公司,美国),配置6通道真空脱气机SRD3600,双梯度分析型色谱泵DGP3600,自动进样器WPS3000TSL,柱温箱TCC-3000(配有一个十通阀),二极管阵列检测器DAD3000,变色龙色谱管理软件Chromleon 6.8 SR9。

醋酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈、甲醇(色谱级,Fisher公司),去离子水(18.2 MΩ,Millipore纯水机),盐酸小檫碱(批号110713-200911,供含量测定用,中国药品生物制品检定所)。固相萃取柱为Venusil 300-SCX(4.6 mm × 50 mm, 5 μm,天津博纳艾捷尔科技),分析柱为Acclaim C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm,美国赛默飞世尔公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

仪器的右泵为上样泵,在线固相萃取柱采用Venusil 300-SCX硅胶基质的强阳离子交换柱,采用梯度洗脱方式,流动相A为水,B为乙腈,C为500 mmol·L⁻¹的醋酸铵溶液,梯度洗脱程序及

十通阀切换时间见表1。阀流路连接示意图见图1,仪器的左泵为分析泵,分析柱采用Acclaim C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-磷酸二氢钾(30 mmol·L⁻¹)50:50为流动相,两个泵流速均为1 mL·min⁻¹,柱温35℃,检测波长345 nm。

表1 在线固相萃取梯度洗脱程序及阀切换时间

t/min	上样泵			阀	
	A%	B%	C%	t/min	位置
0	100	0	0	0	1~2
3.0	100	0	0	18.5	10~1
3.1	0	100	0	19.2	1~2
6.0	0	100	0		
6.1	100	0	0		
9.0	100	0	0		
9.1	0	0	100		
15.0	0	0	100		
15.1	40	40	20		
25.0	40	40	20		
36.1	100	0	0		
40.0	100	0	0		

2.2 对照品溶液制备

精密称取盐酸小檫碱对照品6.2 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解制成每1 mL含0.124 mg盐酸小檫碱的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备

取本品大蜜丸或片,剪碎,取1 g,精密称定,置具塞的锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合溶液10 mL,密塞,称定质量,置50℃水浴中加热15 min,取出,超声处理30 min。再称定质量,用甲醇补足减失的质量。精密量取适量的提取液,加入同体积的水,按1:1稀释。摇匀,滤过,取续滤液即得。精密量取洁阴洗液样品,加盐酸-甲醇(1:100)混合溶液,按1:1稀释,滤过,取续滤液即得。

2.4 线性关系考察

分别精密量取盐酸小檫碱对照品溶液100,200,500,1 000,5 000 μL至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配成不同质量浓度的系列对照品溶液,进样10 μL,以峰面积为横坐标(Y),以盐酸小檫碱浓度为横坐标(X)进行线性回归,得到线性回归方程 $Y = 0.3817X - 0.1004$ ($r = 0.9998$),结果表明盐酸小檫碱在1.24~124 mg·L⁻¹呈良好的线性关系。

2.5 精密度考察

取盐酸小檫碱的对照品溶液(0.124 g·L⁻¹),连续进样6次,结果RSD 0.66%,仪器精密度较好。

2.6 重复性和稳定性试验

取导赤丸样品6份,每份1 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法制备样品,进样10 μL,结果测得其中小檫碱的平均含量

2.12 mg·g⁻¹, RSD 0.382%, 表明方法的重复性较好。取同一份样品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 计算色谱峰面积的 RSD, 结果 RSD 1.25%, 表明样品溶液稳定性较好。

2.7 加样回收率试验 取导赤丸样品 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入对照品适量, 按照样品溶液的制备方法制备样品溶液, 测定。结果平均回收率为 99.5%, RSD 2.1%。见表 2。

表 2 导赤丸小檗碱回收率试验

称样量 /mg	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
496.95	1.05	1.43	2.52	102.80	99.47	2.38
479.15	1.02	0.52	1.53	98.08		
506.20	1.07	0.99	2.04	97.98		
491.75	1.04	0.99	2.02	98.99		
502.40	1.07	0.99	2.08	102.02		
511.90	1.09	0.99	2.05	96.97		

2.8 样品含量 取导赤丸等 6 个样品, 依法制备各样品溶液, 分别精密吸取对照品和样品溶液各 10 μL, 按照上述确定的色谱条件进样分析, 测定峰面积, 按外标法定量计算。样品测定结果见表 3。样品分离色谱结果见图 2。

表 3 6 个样品中小檗碱的含量测定 (n=2)

样品名称	小檗碱	
	/mg·L ⁻¹	/mg·g ⁻¹
导赤丸	79.63	2.12
黄连上清丸	17.18	0.5
黄连羊肝丸	120.12	2.41
牛黄上清丸	55.72	1.12
颈复康颗粒	34.49	0.69
知柏地黄丸	80.84	1.6

注: 洁阴洗液样品低于定量限。

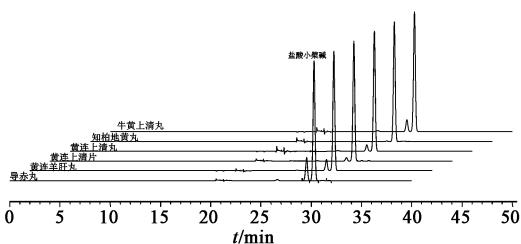
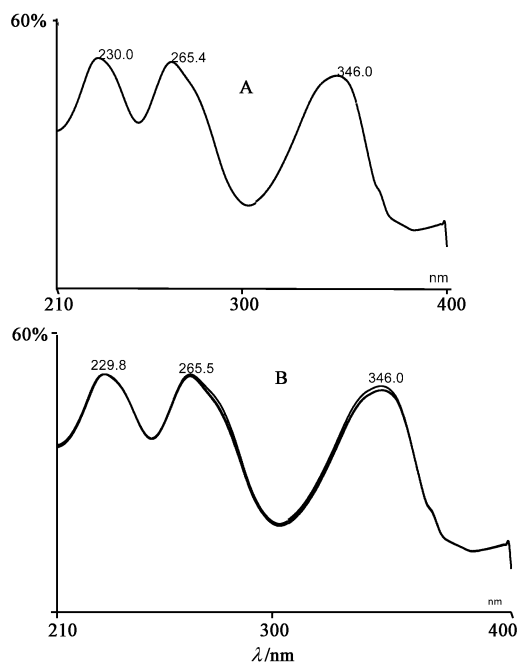


图 2 样品叠加色谱图

3 讨论

含有黄连或黄柏等小檗科植物的中药复方, 在常规分析的样品前处理过程中, 常需要经过氧化铝小柱的净化, 由于手工操作造成的人工误差因素, 含量测定结果往往存在重复性差和基质成分干扰等问题。本实验采用在线处理方法, 选择硅胶基质的强阳离子交换柱作为一维净化富集柱, 采用 C₁₈ 柱作为分析柱。结果表明 SCX 小柱对小檗碱的吸附和净



A. 小檗碱对照品; B. 黄连上清丸样品

图 3 小檗碱色谱峰紫外扫描

化作用较好, 能够去除大量基质干扰成分, 对色谱图中的小檗碱色谱峰进行 UV 的全波长扫描 (图 3) 可以看出, 方法的专属性较好。同时可以避免大量污染物进入分析柱, 对分析柱具有良好的保护作用, 延长了分析柱的使用寿命。

由于盐酸小檗碱为季铵型异喹啉生物碱类生物碱, 在色谱柱上保留较弱, 因此在常规方法分析中常需加入如十二烷基磺酸钠等离子对试剂^[5-6], 实际分析过程中较为不便。本实验采用有机相加缓冲盐水相的体系, 等度洗脱, 分离度和峰形较好, 在二维 C₁₈ 柱上保留适中, 可满足含量测定要求。

【参考文献】

- [1] 张琦, 赵困, 张新申. 高效毛细管电泳法测定清经胶囊中小檗碱含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(2): 133.
- [2] 王晓可, 毋福海. 毛细管电泳法测定栀子金花丸中盐酸小檗碱和绿原酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 86.
- [3] 许波, 埤良美. 高效液相色谱法测定增效黄连素胶囊中盐酸小檗碱和甲氧苄啶的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(1): 21.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 1066.
- [5] 叶秀金, 宋粉云. HPLC 测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 90.
- [6] 孟艳, 倪健, 姜林. RP-HPLC 测定土茯苓胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 59.

[责任编辑 顾雪竹]