

毛细管电泳法测定栀子金花丸中盐酸小檗碱和绿原酸

王晓可, 毋福海*
(广东药学院, 广州 510224)

[摘要] 目的: 建立测定栀子金花丸中盐酸小檗碱和绿原酸含量的毛细管电泳法。方法: 采用未涂层弹性融硅石英毛细管柱(60 cm × 75 μm ID, 有效长度 52 cm); 分别以 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 + 无水乙醇(50:50) (pH 5.50)、50 mmol·L⁻¹ 硼砂溶液为运行缓冲液; 分离电压依次为 21 kV, 12 kV; 重力进样 10 s(高度 15 cm); 检测波长依次为 265 nm, 327 nm。结果: 盐酸小檗碱和绿原酸浓度分别在 11.0 ~ 44.0 mg·L⁻¹, 3.6 ~ 14.4 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系(*r* 均为 0.999 3), 平均加样回收率为 100.0%, 98.1%, 方法精密度 RSD 1.72%, 0.96% (*n* = 6)。栀子金花丸中盐酸小檗碱的平均含量 3.39 mg·g⁻¹; 绿原酸的平均含量为 0.88 mg·g⁻¹。结论: 该方法准确、灵敏、快速, 可用于栀子金花丸中盐酸小檗碱和绿原酸的质量控制研究。

[关键词] 毛细管电泳法; 栀子金花丸; 盐酸小檗碱; 绿原酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0086-04

Determination of Berberine Hydrochloride and Chlorogenic Acid in Zhizi Jinhuan by Capillary Electrophoresis

WANG Xiao-ke, WU Fu-hai*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

[Abstract] Objective: To establish the method for determination of berberine hydrochloride and chlorogenic acid in Zhizi jinhuan by capillary electrophoresis. **Method:** The separation was performed on a fused silica capillary of 60 cm × 75 μm ID (52 cm of effective length). 0.2 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄ + CH₃CH₂OH(50:50) (pH 5.50) and 50 mmol·L⁻¹ Na₂B₄O₇ were selected as the running buffers. The separation voltages were 21 kV and 12 kV, gravity injection (10 s, 15 cm). The detection wavelengths were 265 nm and 327 nm. **Result:** The concentration ranges of determination for berberine hydrochloride and chlorogenic acid were 11.0-44.0 mg·L⁻¹ and 3.6-14.4 mg·L⁻¹ with linear relationship (*r* = 0.999 3). The average recoveries were 100.0% and 98.1%, precisions of the method were 1.72% and 0.96% (RSD, *n* = 6). The average content of berberine hydrochloride was 3.39 mg·g⁻¹, chlorogenic acid was 0.88 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The method was accurate, sensitive and rapid for the quality control of Zhizi Jinhuan.

[Key words] capillary electrophoresis; Zhizi Jinhuan; berberine hydrochloride; chlorogenic acid

栀子金花丸是由金银花、栀子、大黄、黄连等 8

味药材制成的中药成方制剂, 具有清热泻火、凉血解毒之效。临床用于治疗肺胃热盛, 口舌生疮, 牙龈肿痛, 目赤眩晕, 咽喉肿痛, 吐血衄血, 大便秘结等症。系《中国药典》2010 年版一部收载的品种^[1]。黄连、黄柏、金银花作为处方中的指标成分, 均具有清热解毒、凉散风热的功效, 其主要成分分别为盐酸小檗碱和绿原酸。有文献^[2-3]报道应用 HPLC 测定栀子金花丸中盐酸小檗碱和绿原酸含量, 而采用 HPCE 测定此制剂中 2 种有效成分含量作者未见国内文献报

[收稿日期] 20100917(001)

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(5002841)

[作者简介] 王晓可, 在读硕士研究生, 研究方向: 现代仪器分析技术在药物分析中的应用 Tel: 13480278410, E-mail: wangxiaoke@126.com

[通讯作者] * 毋福海, 教授, 研究方向: 现代分析方法在中药质量控制中的应用研究, Tel: 13610124722, E-mail: fuhaiwu@163.com

道, 本试验建立了测定栀子金花丸中盐酸小檗碱和绿原酸含量的毛细管电泳法, 为更好控制栀子金花丸质量提供了依据。

1 材料

1.1 仪器 CL1030 型高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司); K-2501 紫外-可见检测器(德国 KNAUER 公司); HW-2000 型色谱工作站 2.17 版(南京千谱软件有限公司); ORION MODEL 828 型 pH 计(美国); KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司工作频率 4.5 KHz ±5%, 输出功率 400W); 未涂层弹性融硅石英毛细管柱(河北锐年永沅色谱器件有限公司)。

1.2 试剂 盐酸小檗碱对照品(批号 110713-200609); 绿原酸对照品(批号 110753-200413) 均购自中国药品生物制品检定所; 栀子金花丸(山东孔圣堂制药有限公司, 批号 090457, 090741, 090546, 规格 9/袋); 甲醇为色谱纯, 硼砂、磷酸二氢钠、无水乙醇、氢氧化钠、对硝基苯甲酸、盐酸、维生素 B₁ 均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱的测定

2.1.1 内标贮备液 精密称定维生素 B₁ 一定量, 加水制成 450 mg·L⁻¹ 的内标贮备液。

2.1.2 对照品溶液 精密称取在 100 干燥 5 h 的盐酸小檗碱对照品 11.0 mg, 置于 100 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液(盐酸小檗碱浓度为 110 mg·L⁻¹)。

2.1.3 供试品溶液 取栀子金花丸样品, 研碎, 取约 0.8 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入加入盐酸-甲醇(1 100) 25 mL, 称定质量, 60 水浴中加热 15 min, 取出, 超声处理 30 min, 室温放置过夜, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入内标贮备液 2.0 mL, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 滤膜过滤, 作为供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液 取处方组成中除黄柏和黄连外的其余成分, 制成不含黄柏和黄连的阴性对照样品, 按 2.1.3 项下的方法制成阴性对照溶液。

2.1.5 电泳条件 采用未涂层弹性融硅石英毛细管柱(60 cm × 75 μm × 52 cm); 以 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 + 无水乙醇(50 50) (pH 5.50) 为运行缓冲液; 分离电压 21 kV; 重力进样 10 s(高度 15

cm); 检测波长 265 nm; 温度室温, 湿度小于 70%; 毛细管柱在使用前依次用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液、双蒸水各冲洗 5 min, 再用运行缓冲液冲洗 5 min, 样品分析间隔用运行缓冲液平衡 2 min, 运行每 3 h 更换一次缓冲液。在此条件下, 对照品、供试品、阴性对照色谱图如图 1 所示。

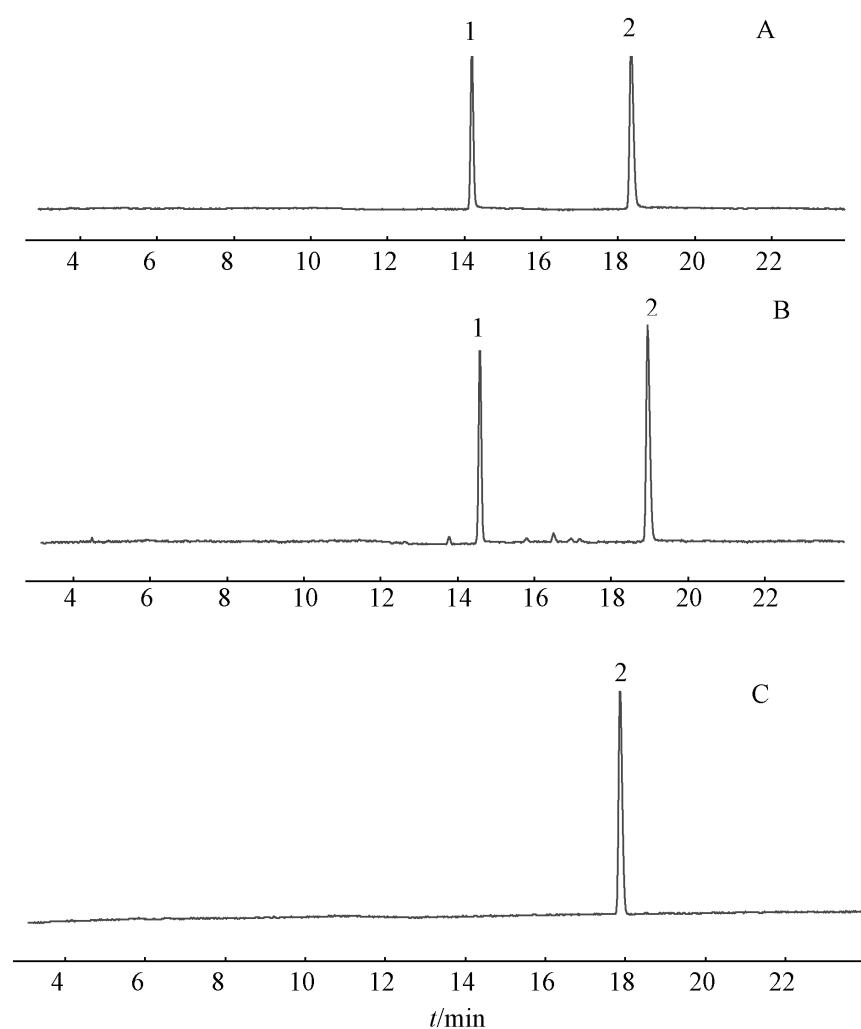


图 1 对照品(A)、栀子金花丸样品(B)、阴性对照液(C)的毛细管电泳色谱

1. 盐酸小檗碱; 2. 内标物

2.1.6 线性关系的考察 分别吸取一定量的对照品贮备液, 加甲醇稀释成盐酸小檗碱浓度为 11.0, 16.5, 22.0, 27.5, 33.0, 38.5, 44.0 mg·L⁻¹ 与内标溶液浓度均为 90 mg·L⁻¹ 的溶液。依次重力进样 10 s, 每个浓度测定 3 次以上。以对照品与内标物峰面积的比值为纵坐标(Y), 对照品溶液浓度(C)为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.0244C + 0.0197$, $r = 0.9993$ 。表明盐酸小檗碱浓度在 11.0 ~ 44.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 取浓度为 27.5 mg·L⁻¹ 的盐酸小檗碱对照品溶液, 重力进样 10 s, 连续测定 5 次, 记录峰面积。结果盐酸小檗碱的 RSD 0.78%, 表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取供试品溶液(批号 090546),

在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 分别重力进样 10 s, 记录峰面积。结果盐酸小檗碱的 RSD 1.45%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一批号(批号 090546) 栀子金花丸 6 份, 按 2.1.3 项下方法提取并测定。结果栀子金花丸中盐酸小檗碱的平均含量为 $3.39 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 1.72% ($n = 6$)。表明方法重复性良好。

2.1.10 加样回收试验 精密称取栀子金花丸样品(批号 090546) 共 6 份, 加入一定量的盐酸小檗碱对照品, 按 2.1.3 项下方法处理并测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。栀子金花丸中盐酸小檗碱的平均回收率为 100.0%, RSD 1.21%。结果表示方法准确、可靠。

表 1 栀子金花丸中盐酸小檗碱回收率试验结果($n = 6$)

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.399 8	1.355 3	1.320 0	2.689 3	101.1		
0.399 4	1.354 0	1.320 0	2.697 1	101.7		
0.399 8	1.355 3	1.320 0	2.659 8	98.9	100	1.21
0.399 9	1.355 7	1.320 0	2.673 8	99.9		
0.400 0	1.356 0	1.320 0	2.657 4	98.6		
0.399 9	1.355 3	1.320 0	2.675 4	99.9		

2.1.11 样品测定 取栀子金花丸样品 3 批, 按 2.1.3 项下方法处理后测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算样品中盐酸小檗碱的含量为 30.93, 31.09, 30.35 mg/袋。

2.2 绿原酸的测定

2.2.1 内标贮备液 精密称定对硝基苯甲酸一定量, 加 50% 甲醇制成 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标贮备液。

2.2.2 对照品溶液 精密称定绿原酸对照品 18.0 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液(绿原酸浓度为 $180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 10℃ 下保存。

2.2.3 供试品溶液 取栀子金花丸样品, 研碎, 取约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加内标贮备液 2 mL, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 滤膜过滤, 作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照液 取处方组成中除金银花的其

余成分, 制成不含金银花的阴性对照样品, 按 2.2.3 项下的方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 色谱条件 采用未涂层弹性融硅石英毛细管柱(60 cm \times 75 μm ID, 有效长度 52 cm); 以 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂为运行缓冲液; 分离电压 12 kV; 重力进样 10 s(高度 15 cm); 检测波长 327 nm; 温度室温, 湿度小于 70%; 毛细管柱在使用前依次用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液、双蒸水各冲洗 5 min, 再用运行缓冲液冲洗 5 min, 样品分析间隔用运行缓冲液平衡 2 min, 运行每 3 h 更换一次缓冲液。在此条件下, 对照品、供试品、阴性对照色谱图如图 2 所示。

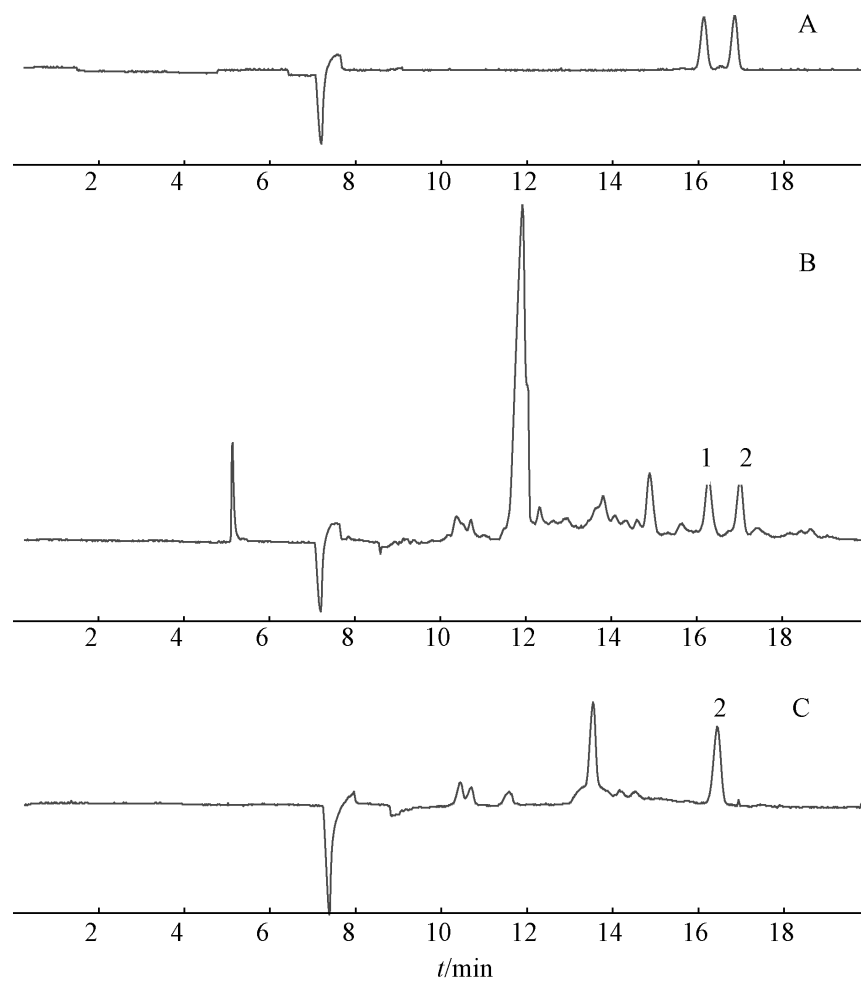


图 2 对照品(A)、栀子金花丸样品(B)、阴性对照液(C)的毛细管电泳色谱图
1. 绿原酸; 2. 内标物

2.2.6 线性关系的考察 分别吸取一定量的对照品贮备液, 加 50% 甲醇稀释成绿原酸浓度为 3.6, 5.4, 7.2, 9.0, 10.8, 12.6, 14.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与内标溶液浓度均为 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。依次重力进样 10 s, 每个浓度测定 3 次以上。以对照品与内标物峰面积的比值为纵坐标(Y), 对照品溶液浓度(C)为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 0.1134 C - 0.0223$, $r = 0.9993$ 。表明绿原酸浓度在 $3.6 \sim 14.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 取浓度为 $9.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的绿原酸对照品溶液, 重力进样 10 s, 连续测定 5 次, 记录峰面积。结果绿原酸的 RSD 1.13%, 表明仪器精密

度良好。

2.2.8 稳定性试验 取供试品溶液(批号 090741), 在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 分别重力进样 10 s, 记录峰面积并计算 RSD。结果绿原酸的 RSD 1.24%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批号(批号 090741) 栀子金花丸 6 份, 按 2.2.3 项下方法提取并测定。结果栀子金花丸中绿原酸的平均含量为 $0.88 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.96% ($n = 6$)。表明方法重复性良好。

2.2.10 加样回收试验 精密称取栀子金花丸样品(批号 090741) 共 6 份, 加入一定量的绿原酸对照品, 按 2.2.3 项下方法处理并测定, 计算加样回收率, 结果见表 3。栀子金花丸中绿原酸的平均回收率为 98.1%, RSD 0.81%。结果表示方法准确、可靠。

表 3 栀子金花丸中绿原酸回收率试验结果 ($n=6$)

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.500 0	0.440 0	0.441 0	0.870 7	97.7		
0.500 1	0.440 1	0.441 0	0.876 2	98.9		
0.500 3	0.440 3	0.441 0	0.876 9	99.0	98.19	0.81
0.500 0	0.440 0	0.441 0	0.868 7	97.2		
0.500 0	0.440 0	0.441 0	0.874 8	98.6		
0.500 0	0.440 0	0.441 0	0.869 5	97.4		

2.2.11 样品测定 取栀子金花丸样品 3 批, 按 2.2.3 项下方法处理后测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算样品中绿原酸的含量, 结果 3 批绿原酸的含量分别为 8.88, 9.45, 7.89 mg/袋。

3 讨论

3.1 提取方法的选择 依据现行标准^[1], 用 50% 甲醇做为提取溶剂, 超声提取 30 min。本实验又尝试提取时间 20, 40, 50 min。结果显示, 随着提取时间增加, 绿原酸面积增大, 但提取 40, 50 min 的效果相差甚微, 考虑各方面因素, 选择提取时间为 40 min。

3.2 内标物的选择 为克服毛细管电泳重现性差, 本方法采用内标法定量。根据内标物选择原则, 尝试用与盐酸小檗碱结构相似的维生素 B₁, 结果显示其在 265 nm 处有较大吸收, 峰型好, 而且能与目标

检测物基线分离, 所以选择了维生素 B₁ 作为内标物, 因维生素 B₁ 见光易分解, 故在测定过程中注意避光。在进行绿原酸测定时, 选取常用内标物对硝基苯甲酸、苯甲酸、对氨基苯甲酸, 结果显示对氨基苯甲酸和苯甲酸在 327 nm 波长下不出峰, 而对硝基苯甲酸出峰, 不但峰形好, 并且出峰时间与绿原酸接近, 在样品中无干扰, 故选对硝基苯甲酸作内标物。

3.3 电泳条件的选择

3.3.1 盐酸小檗碱电泳条件 由于盐酸小檗碱为碱性较强的季铵类生物碱, 故应选用弱酸性。参考文献^[5], 所得结果理想, 重复性良好。

3.3.2 绿原酸电泳条件 本实验参考文献^[5], 并比较了常用的磷酸盐、硼砂、磷酸盐-硼砂等缓冲体系及其浓度对分离结果的影响。结果发现硼砂浓度过低 ($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时基线不稳, 其分析物出峰形状较差, 绿原酸和内标物对硝基苯甲酸分不开; 硼砂浓度高时 (如 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 时间窗口增大, 分离有所改善, 但同时电流也增大, 保留时间也增加, 只有当硼砂浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 各分析物的峰形都好, 能达到基线分离, 并都能在 18 min 内完成分离测定。综合分离情况、分析时间、电流等因素考虑, 确定硼砂的浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由于本实验用的是单一硼砂溶液, 其导电性较强, 焦耳热比较高, 当电压大于 12 kV 时, 基线噪音大, 分离效率低, 因此选择 12 kV 为最佳工作电压。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 205, 879.
- [2] 张义友, 傅红, 包淑英, 等. RP-HPLC 测定栀子金花丸中绿原酸的含量[J]. 中成药, 2005, 27 (8): 附 4.
- [3] 郭小龙, 蔡敏, 陈勇, 等. 液相色谱法同时测定栀子金花丸中栀子苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2007, 29(3): 283.
- [4] 刘丹, 龚红全, 毋福海, 等. 毛细管电泳法测定拈痛丸中四种有效成分的含量[J]. 中药材, 2009, 32(2): 302.
- [5] 宋粉云, 龚红全, 林琳, 等. 毛细管电泳测定银黄胶囊及银黄颗粒中黄芩苷和绿原酸的含量[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(3): 231.

[责任编辑 顾雪竹]