HPLC法同时测定牛黄宁宫片中6种成分的含量

孙艳涛[1,2*]，宋玉红[1,2]，赵　磊[3]，于浪天[4]，王　良[1#]（1.吉林师范大学化学学院，吉林 四平　136000；2.吉林师范大学环境友好材料制备与应用省部共建教育部重点实验室，吉林 四平　130103；3.吉林省四平市食品药品检验所，吉林 四平　136099；4.中国药科大学中药学院，南京　211198）

中图分类号　R286；R927　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2017）27-3862-03
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.33

摘　要　目的：建立同时测定牛黄宁宫片中6种成分含量的方法。方法：采用高效液相色谱法。色谱柱为TC-C_{18}，流动相为甲醇-0.05%磷酸（梯度洗脱），流速为1.0 mL/min，检测波长为280 nm，柱温为25 ℃，进样量为10 μL。结果：甘草苷、盐酸小檗碱、连翘苷、黄芩苷、大黄素和大黄酚检测质量浓度线性范围分别为3.2～320 μg/mL（r=0.999 9）、8.8～880 μg/mL（r=0.999 8）、5.6～560 μg/mL（r=0.999 5）、2.0～200 μg/mL（r=0.999 9）、4.4～440 μg/mL（r=0.999 9）、2.0～200 μg/mL（r=0.999 7）；精密度、稳定性、重复性试验的RSD<6.0%；加样回收率分别为96.34%～97.25%（RSD=0.33%，n=6）、96.12%～98.06%（RSD=0.82%，n=6）、96.36%～99.09%（RSD=1.02%，n=6）、95.84%～97.32%（RSD=0.65%，n=6）、95.83%～97.92%（RSD=0.88%，n=6）、98.60%～99.65%（RSD=0.42%，n=6）。结论：该方法操作简便，精密度、稳定性、重复性好，可用于牛黄宁宫片中6种成分含量的测定。

关键词　牛黄宁宫片；高效液相色谱法；含量测定

Simultaneous Determination of 6 Components in Niuhuang Ninggong Tablets by HPLC

SUN Yantao[1,2], SONG Yuhong[1,2], ZHAO Lei[3], YU Langtian[4], WANG Liang[1]（1.College of Chemistry, Jilin Normal University, Jilin Siping 136000, China; 2.Key Laboratory of Preparation and Application of Environmental Friendly Materials, Ministry of Education, Jilin Normal University, Jilin Siping 130103, China; 3.Siping Institute for Food and Drug Control, Jilin Siping 136099, China; 4.College of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 6 components in Niuhuang ninggong tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on TC-C_{18} column with mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphate acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and the column temperature was 25 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of glycyrrhizin, berberine hydrochloride, baicalin, baicalin, emodin and chrysophanol were 3.2-320 μg/mL (r=0.999 9), 8.8-880 μg/mL (r=0.999 8), 5.6-560 μg/mL (r=0.999 5), 2.0-200 μg/mL (r=0.999 9), 4.4-440 μg/mL (r=0.999 9), 2.0-200 μg/mL (r=0.999 7), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 6.0%. The recoveries were 96.34%-97.25% (RSD=0.33%, n=6), 96.12%-98.06% (RSD=0.82%, n=6), 96.36%-99.09% (RSD=1.02%, n=6), 95.84%-97.32% (RSD=0.65%, n=6), 95.83%-97.92% (RSD=0.88%, n=6), 98.60%-99.65% (RSD=0.42%, n=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, stable and reproducible, and can be used for content determination of 6 components in Niuhuang ninggong tablets.

KEYWORDS　Niuhuang ninggong tablets; HPLC; Content determination

中成药作为一个完整的制剂，强调的是各味药材的协同作用。目前，以单一有效成分或指标成分难以真正控制中成药质量。有些中成药生产企业为了降低成本，利用药检质量标准不能完全控制所有药材的漏洞，漏加、少加药材。因此，必需建立一种快速、准确、全面分离、检测中成药中多种活性成分的方法，以便更好地监控中成药质量和用药安全[1-4]。

精神分裂症是最常见和最严重的精神疾病之一[5]。牛黄宁宫片可用于外感热病、高热神昏、惊风抽搐、肝阳眩晕、耳鸣头痛、心烦不寐及癫痫狂躁的治疗，对精神分裂症有一定的抗复发作用[6-12]。牛黄宁宫片由牛黄、蒲公英、雄黄、连翘、大黄、冰片、金银花、甘草、黄连、黄芩、钩藤、大黄磁石（煅）、玄参、葛根等27味中药材经提取加工制成，该制剂收录于《中国卫生部药品标准中药成方制剂》（WS3-B-2852-98）。原质量标准中仅有简单的显微鉴别、砷量检测和胆酸含量检测[13]。专利“一种控制牛黄宁宫片质量的方法”也仅对性状鉴别、显微及薄层色谱鉴别、三氧化二砷检验和黄芩含量测定进行了控制[14]。上述方法检测指标少，有可能导致其他组分不稳定或缺乏，难以全面准确控制药品质量。目前，有关牛

*副教授。研究方向：光谱分析和色谱分析。E-mail：1979yanzi@163.com
#通信作者：教授。研究方向：分析化学。E-mail：16421800@qq.com

中国药房网 www.china-pharmacy.com

黄宁宫片中多个活性成分含量的测定未见报道。本试验采用高效液相色谱法（HPLC）同时测定牛黄宁宫片中6种成分的含量，为全面控制该制剂的质量提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪，包括VWD检测器（美国Agilent公司）；UV-2550型紫外分光光度计（日本Shimadzu公司）；FA1104N型万分之一电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司）；SK5200H型超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）。

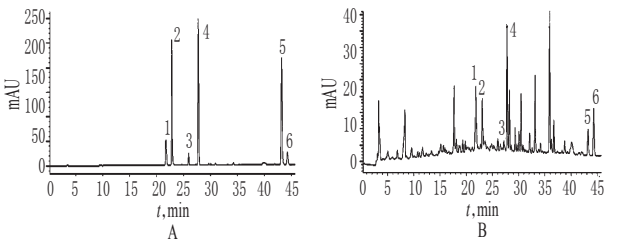
1.2 药品与试剂

牛黄宁宫片（沈阳红药制药有限公司，批号：Z21021460，规格：0.34 g/片）；大黄素对照品（批号：110756-200110，纯度：100%）、大黄酚对照品（批号：110796-201017，纯度：100%）、连翘苷对照品（批号：110821-201112，纯度：96.8%）、甘草苷对照品（批号：111610-201106，纯度：93.7%）、黄芩苷对照品（批号：110715-201318，纯度：93.3%）、盐酸小檗碱对照品（批号：110713-201212，纯度：86.7%）均购自中国食品药品检定研究院；甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：TC-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇（A）-0.05%磷酸（B），梯度洗脱（0～35 min，10%→80% A；35～55 min，80% A；55～60 min，80%→10% A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：280 nm；柱温：25 ℃；进样量：10 μL。在上述色谱条件下，理论板数以甘草苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、连翘苷、大黄素和大黄酚峰计均＞3 000；保留时间分别为21.73、23.05、25.96、27.74、43.20和44.28 min，各成分基线分离良好，详见图1。



A.混合对照品；B.供试品；1.甘草苷；2.盐酸小檗碱；3.连翘苷；4.黄芩苷；5.大黄素；6.大黄酚

A.mixed control; B.test sample; 1.glycyrrhizin; 2.berberine hydrochloride; 3.baicalin; 4.baicalin; 5.emodin; 6.chrysophanol

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取待测成分对照品各适量，分别置于5 mL量瓶中，加甲醇溶解并定容，称定质量，超声（功率：200 W，频率：59 kHz，下同）处理30 min，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，制成甘草苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、连翘苷、大黄素、大黄酚质量浓度分别为200、800、560、320、200、440 μg/mL的单一对照品溶液。分别精密量取上述单一对照品溶液适量，置于5 mL量瓶中，加甲醇定容，即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品若干，除去糖衣，用玻璃研钵研细，精密称取0.038 14 g，置于5 mL量瓶中，加甲醇溶解并定容，称定质量，超声处理45 min，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，静置24 h，滤过，即得。

2.3 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.5、1、2、4、5、6、7、8、9、10 μL，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以待测成分质量浓度（x，μg/mL）为横坐标、峰面积（y）为纵坐标进行线性回归，回归方程与线性范围见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Linear equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围，μg/mL
甘草苷	y=15.55+2 024.65x	0.999 9	3.2～320
盐酸小檗碱	y=134.78+2 687.37x	0.999 8	8.8～880
黄芩苷	y=27.99+4 679.90x	0.999 5	5.6～560
连翘苷	y=−4.55+1 341.94x	0.999 9	2.0～200
大黄素	y=−11.25+7 428.21x	0.999 9	4.4～440
大黄酚	y=−3.45+1 313.30x	0.999 7	2.0～200

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测定6次，记录峰面积。结果，甘草苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、连翘苷、大黄素、大黄酚峰面积的RSD分别为1.41%、2.80%、2.87%、2.11%、1.02%、1.45%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液（批号：Z21021460）适量，分别于室温下放置0、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，甘草苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、连翘苷、大黄素、大黄酚峰面积的RSD分别为0.76%、1.56%、2.56%、2.09%、4.96%、5.68%（n=5），表明供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品（批号：Z21021460）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。结果，甘草苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、连翘苷、大黄素、大黄酚峰面积的RSD分别为1.51%、1.46%、6.44%、2.46%、1.54%、1.98%（n=6），表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量样品（批号：Z21021460）适量，共6份，分别加入一定质量的待测成分对照品，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，

中国药房网 www.china-pharmacy.com

记录峰面积并计算加样回收率，结果见表2。

表2　加样回收率试验结果（n=6）

Tab 2　Results of recovery tests（n=6）

待测成分	取样量,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,%
甘草苷	0.292 8	0.340 1	0.327 6	0.655 7	96.34	96.74	0.33
	0.306 3	0.355 7	0.327 6	0.672 3	96.64		
	0.293 4	0.340 8	0.327 6	0.657 4	96.64		
	0.299 7	0.348 1	0.327 6	0.665 7	96.95		
	0.304 9	0.354 1	0.327 6	0.672 7	97.25		
	0.300 5	0.349 0	0.327 6	0.665 6	96.64		
盐酸小檗碱	0.256 5	0.056 5	0.051 5	0.107 0	98.06	97.74	0.82
	0.265 5	0.058 5	0.051 5	0.109 0	98.06		
	0.254 7	0.056 1	0.051 5	0.106 6	98.06		
	0.247 4	0.054 5	0.051 5	0.105 0	98.06		
	0.261 5	0.057 6	0.051 5	0.107 1	96.12		
	0.247 8	0.054 6	0.051 5	0.105 1	98.06		
黄芩苷	0.213 2	0.099 6	0.110 0	0.207 6	98.18	98.18	1.02
	0.220 7	0.103 1	0.110 0	0.209 1	96.36		
	0.256 4	0.119 8	0.110 0	0.228 8	99.09		
	0.223 9	0.104 6	0.110 0	0.212 6	98.18		
	0.216 0	0.100 9	0.110 0	0.208 9	98.18		
	0.218 5	0.102 1	0.110 0	0.211 1	99.09		
连翘苷	1.757 2	0.340 9	0.336 2	0.664 1	96.13	96.73	0.65
	1.766 5	0.342 7	0.336 2	0.664 9	95.84		
	1.801 0	0.349 4	0.336 2	0.675 6	97.03		
	1.795 4	0.348 3	0.336 2	0.673 5	96.73		
	1.795 4	0.348 3	0.336 2	0.675 5	97.32		
	1.748 5	0.339 2	0.336 2	0.666 4	97.32		
大黄素	0.272 5	0.044 2	0.048 0	0.091 2	97.92	97.57	0.88
	0.281 8	0.045 7	0.048 0	0.092 7	97.92		
	0.254 6	0.041 3	0.048 0	0.088 3	97.92		
	0.290 4	0.047 1	0.048 0	0.094 1	97.92		
	0.284 8	0.046 2	0.048 0	0.092 2	95.83		
	0.285 5	0.046 3	0.048 0	0.093 3	97.92		
大黄酚	0.254 5	0.289 1	0.285 0	0.571 1	98.95	99.24	0.42
	0.246 8	0.280 4	0.285 0	0.561 4	98.60		
	0.254 5	0.289 1	0.285 0	0.573 1	99.65		
	0.264 0	0.299 9	0.285 0	0.582 9	99.30		
	0.249 7	0.283 7	0.285 0	0.566 7	99.30		
	0.250 4	0.284 5	0.285 0	0.568 5	99.65		

2.8　样品含量测定

取样品适量，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，记录峰面积并计算样品含量。结果，样品中甘草苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、连翘苷、大黄素、大黄酚含量平均值分别为1.161 4、0.220 3、0.467 2、0.194 0、0.162 2、1.136 0 mg/g（n=3）。

3　讨论

3.1　检测波长的选择

通过紫外分光光度计对大黄酚、大黄素、甘草苷、连翘苷、黄芩苷和盐酸小檗碱进行测定，发现上述几种成分在280 nm波长处均有较好的紫外吸收，故采用280 nm作为检测波长。

3.2　流动相的选择

预试验中笔者分别选用甲醇-水（70∶30，V/V，等度洗脱）、甲醇-水（梯度洗脱）、甲醇-0.05%磷酸溶液（梯度洗脱）、乙腈-水（80∶20，V/V，等度洗脱）、甲醇-0.05%磷酸溶液（梯度洗脱）作流动相。结果显示，流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液（梯度洗脱）时，色谱峰能够很好地分离，且峰形较好，可有效地缩短分析时间，满足分析要求。

综上所述，本方法操作简便，精密度、稳定性、重复性好，可用于牛黄宁宫片中6种成分含量的测定。

参考文献

[1] 郑翔，尹松鹤.药品检验的质量控制以及措施[J].生物技术世界，2015，12(6)：275-276.

[2] 陈艳.浅析药品质量检验方法及其评价[J].药物与人，2015，28(1)：379-381.

[3] 文永盛.中成药质量监管探讨[J].中国药品标准，2010，11(4)：250.

[4] 张弛，朱嘉亮，郭志鑫，等.我国药品质量分析研究的方法和策略[J].中国药事，2011，25(1)：63-64.

[5] 蒋立新，褚留杰，张瑞岭.4种抗精神病药治疗精神分裂症急性期的最小成本分析[J].中国药房，2015，26(11)：1445-1447.

[6] 杨秀双，张平鑫，张春霞，等.牛黄宁宫片联合西药治疗精神分裂症临床观察[J].中国中医药信息杂志，2008，15(4)：80-81.

[7] 巩秀芹.利培酮片联合牛黄宁宫片治疗精神分裂症临床观察[J].海南医学院学报，2012，18(11)：1672-1674.

[8] 杨伟芳，陈统献，褚文浩，等.牛黄宁宫片治疗精神分裂症65例[J].中国药业，2012，21(8)：88-89.

[9] 段德香，王萍，平军辉.牛黄宁宫片治疗躁狂发作的临床研究[J].中国中医药咨讯，2011，3(8)：187-188.

[10] 郝宝利，邱慧敏.奎硫平联合牛黄宁宫片治疗精神分裂症比较分析[J].临床心身疾病杂志，2005，11(4)：317-318.

[11] 宋昊，马建东，陈永新，等.奥氮平联合牛黄宁宫片治疗难治性精神分裂症[J].中国实验方剂学杂志，2013，19(21)：306-310.

[12] 李文国.利培酮联合牛黄宁宫片治疗精神分裂症的可行性[J].医学理论与实践，2016，29(7)：886-888.

[13] 卫生部.卫生部药品标准：中药成方制剂：第十五册[S].北京：人民卫生出版社，2002：36.

[14] 张成海，周文波，陈心，等.一种牛黄宁宫片的质量控制方法：中国，200810179211.0[P].2008-12-01.

（收稿日期：2016-10-12　修回日期：2016-12-08）

（编辑：张　静）

中国药房网 www.china-pharmacy.com