

HPLC 切换波长法同时测定健脾止泻宁颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量^Δ

黄传俊^{1,2*}, 杨莉³, 梅勇^{3#}, 罗磊³, 吕珊珊³, 曾博程³, 龙涛³, 王凤³, 左娟³, 袁开超³, 唐攀³, 朱锋³, 陈波³, 谯志文³(1.湖北省中医院药事部, 武汉 430061; 2.湖北省中医药研究院, 武汉 430074; 3.重庆思科药物研究所有限公司, 重庆 401520)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)10-1324-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.10.07

摘要 目的:建立同时测定健脾止泻宁颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱切换波长法。色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈, 流动相为甲醇-0.45%磷酸溶液-三乙胺(50:49:1, V/V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 265 nm(盐酸小檗碱)、280 nm(黄芩苷), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果:盐酸小檗碱和黄芩苷检测进样量线性范围分别为 60.3~312.8 ng($r=0.9997$)、81.5~368.9 ng($r=0.9999$); 定量限分别为 0.666 8、0.774 0 ng, 检测限分别为 0.222 6、0.258 0 ng; 中间精密密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 1.0%; 加样回收率分别为 96.48%~99.30% (RSD=1.06%, $n=6$)、95.20%~99.39% (RSD=1.66%, $n=6$); 耐用性试验的 RSD 均小于 2.0%。结论:该方法操作简便, 精密密度、稳定性、重复性、准确度、耐用性均较好, 可用于健脾止泻宁颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷含量的同时测定。

关键词 健脾止泻宁颗粒; 高效液相色谱切换波长法; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 含量测定

Simultaneous Determination of Berberine Hydrochloride and Baicalin in Jianpi Zhixiening Granules by HPLC-switching Wavelength Method

HUANG Chuanjun^{1,2}, YANG Li³, MEI Yong³, LUO Lei³, LYU Shanshan³, ZENG Bocheng³, LONG Tao³, WANG Feng³, ZUO Juan³, YUAN Kaichao³, TANG Pan³, ZHU Feng³, CHEN Bo³, QIAO Zhiwen³(1. Dept. of Pharmaceutical Affair, Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan 430061, China; 2. Hubei Institute of TCM, Wuhan 430074, China; 3. Chongqing CISCO Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Chongqing 401520, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of berberine hydrochloride and baicalin in Jianpi zhixiening granules. METHODS: HPLC switching wavelength method was adopted. The determination was performed on Hypersil BDS C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.45% phosphoric acid solution-triethylamine (50:49:1, V/V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 265 nm (berberine hydrochloride) and 280 nm (baicalin). The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of berberine hydrochloride and baicalin were 60.3-312.8 ng ($r=0.9997$) and 81.5-368.9 ng ($r=0.9999$). The limits of quantitation were 0.666 8, 0.774 0 ng, and

- 求《按照传统既是食品又是中药材物质目录管理办法》(征求意见稿)意见的函(国卫办食品函[2014]975号)[EB/OL]. (2014-10-28)[2016-02-02]. <http://www.cnfood.com/news/33/160479.html>.
- [4] 楚纪明, 马树运, 李海峰. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 142-146.
- [5] DU G, ZHAO H, SONG Y, et al. Rapid simultaneous determination of isoflavones in radix puerariae using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(19): 2576-2585.
- [6] 尤春雪, 张振秋, 李峰, 等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2013, 44(5): 616-621.
- [7] 吴文杰, 邓阳, 谭桂林, 等. 一测多评法测定葛根药材中 5 种异黄酮类成分[J]. 中草药, 2017, 48(4): 777-781.
- [8] LI M, HOU XF, ZHANG J, et al. Applications of HPLC/MS in the analysis of traditional Chinese medicines[J]. *J Pharm Anal*, 2011, 1(2): 81-91.
- [9] ZHAO J, GE LY, XIONG W, et al. Advanced development in phytochemicals analysis of medicine and food dual purposes plants used in China: 2011-2014[J]. *J Chromatogr A*, 2016. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.006.
- [10] 吴文杰, 周伟娥, 张元, 等. LC-MS/MS 技术在中药化学成分分析中的应用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2735-2737.

Δ 基金项目:重庆市社会民生科技创新专项项目(No.cstc2016shmszx130065)

* 副主任药师, 硕士。研究方向:药物分析。电话:027-87748135。E-mail:574884273@qq.com

通信作者:高级工程师。研究方向:药物分析、药理学。电话:023-81660346。E-mail:631760046@qq.com

(收稿日期:2017-10-23 修回日期:2018-03-28)
(编辑:陈宏)

the limits of detection were 0.222 6, 0.258 0 ng, respectively. RSDs of intermediate precision, stability and repeatability tests were all lower than 1.0%. The recoveries were 96.48% -99.30% (RSD=1.06%, $n=6$) and 95.20% -99.39% (RSD=1.66%, $n=6$), respectively. RSDs of durability test were all lower than 2.0%. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable, reproducible, accurate and durable. It can be used for simultaneous determination of berberine hydrochloride and baicalin in Jianpi zhixiening granules.

KEYWORDS Jianpi zhixiening granules; HPLC switching wavelength method; Berberine hydrochloride; Baicalin; Content determination

健脾止泻宁颗粒系国家中药保护品种,由党参、莲子、白扁豆、黄连、黄芩、金银花、山楂、车前子(盐炙)、建曲、干姜等10味中药材组合而成^[1],具有清热除湿、抗炎镇痛^[2]、促消化、促吸收、止泻^[3-4]、增强免疫功能^[5]和改善肠道微生态环境^[6]等功效,临床上用于治疗小儿脾虚湿热型急性腹泻^[7]、小儿迁延性腹泻病(脾虚湿热证)^[8]、溃疡性结肠炎^[9]。该药现行国家药品标准^[10]含量测定项中仅以薄层色谱法(TLC)扫描测定黄连有效成分盐酸小檗碱的含量。方中黄连有效成分盐酸小檗碱对细菌有明显的抑制作用^[11];黄芩有效成分为黄酮类化合物,其中黄芩苷含量较高,具有多种生物活性,且有抑菌、抑制病毒的作用^[12]。本研究以高效液相色谱(HPLC)切换波长法同时测定健脾止泻宁颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量,以期为提高该制剂的质量标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030型HPLC仪(包括在线脱气机、二元高压泵、自动进样器、二级管阵列检测器、LabSolutions色谱工作站)、UV-2450型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);CP225D型电子分析天平、BS124S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

健脾止泻宁颗粒(重庆希尔安药业有限公司,批号:170101、170501、170901,规格:3 g/袋);盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:86.7%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201318,纯度:93.3%)均购于中国食品药品检定研究院; N,N -二甲基甲酰胺(DMF)、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

色谱柱:Hypersil BDS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.45%磷酸溶液-三乙胺(50:49:1, $V/V/V$);流速:1.0 mL/min;检测波长:265 nm(盐酸小檗碱)、280 nm(黄芩苷);柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液的制备

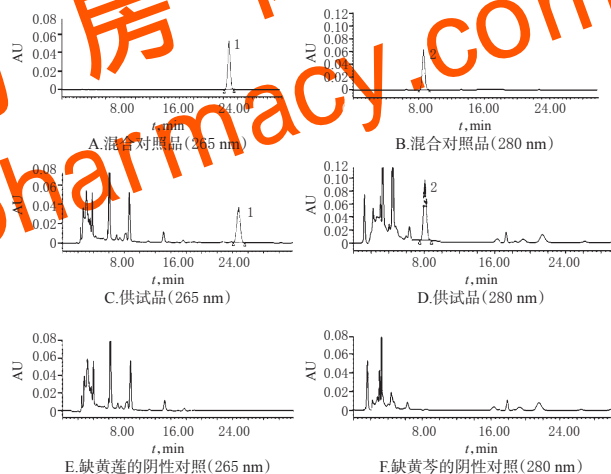
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱、黄芩苷对照品各适量,精密称定,加DMF 5 mL,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)处理5 min,加甲醇稀释制成盐酸小檗碱、黄芩苷质量浓度均约为300 μ g/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品0.6 g,研细,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加DMF 5 mL,超声处理5 min,放冷,加甲醇稀释定容至50 mL,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过后,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按健脾止泻宁颗粒处方和工艺分别制备缺黄连、缺黄芩的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。结果,在265 nm波长处,盐酸小檗碱色谱峰与其他色谱峰呈基线分离,理论板数以盐酸小檗碱峰计大于4 000,分离度大于3.0;在280 nm波长处,黄芩苷色谱峰与其他色谱峰呈基线分离,理论板数以黄芩苷峰计大于6 000,分离度大于2.0。



注:1.盐酸小檗碱;2.黄芩苷
Note: 1. berberine; 2. baicalin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 专属性试验

取上述混合对照品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。结果,在与盐酸小檗碱或黄芩苷对照品保留时间相同处,阴性对照无色谱峰干扰,表明专属性良好。

2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以盐酸小檗碱和黄芩苷进样量(x , ng)为横坐标、

峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得盐酸小檗碱和黄芩苷回归方程分别为 $y=52\ 647x+930.8(r=0.999\ 7)$ 、 $y=59\ 742x-154.9(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,盐酸小檗碱和黄芩苷检测进样量线性范围分别为60.3~312.8、81.5~368.9 ng。

2.6 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。当信噪比为10:1时,得盐酸小檗碱和黄芩苷定量限分别为0.666 8、0.774 0 ng;当信噪比为3:1时,得盐酸小檗碱和黄芩苷检测限分别为0.222 6、0.258 0 ng。

2.7 中间精密度试验

由不同分析人员于不同时间,精密称取样品(批号:170501),共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样,记录峰面积并计算含量,结果见表1。

表1 中间精密度试验结果(n=12)

人员	编号	盐酸小檗碱			黄芩苷		
		含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %
分析人员甲	1	5.74			5.32		
	2	5.71			5.31		
	3	5.76			5.27		
	4	5.79			5.21		
	5	5.77			5.33		
	6	5.76			5.34		
分析人员乙	7	5.74	5.73	0.89	5.36	5.32	0.91
	8	5.77			5.41		
	9	5.60			5.32		
	10	5.68			5.34		
	11	5.72			5.32		
	12	5.74			5.30		

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:170501)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24、48 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗碱和黄芩苷峰面积的RSD分别为0.90%、0.70%(n=8),表

表3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of durability tests

色谱条件	具体条件	盐酸小檗碱			黄芩苷		
		含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %
色谱柱	Hypersil BDS C ₁₈	5.71	5.74	1.12	5.31	5.32	1.15
	Wondasil C ₁₈	5.69			5.39		
	Hypersil ODS C ₁₈	5.81			5.27		
流动相	甲醇-0.45%磷酸溶液-三乙胺(50:49:1, V/V/V)	5.71	5.75	0.75	5.31	5.35	0.75
	甲醇-0.45%磷酸溶液-三乙胺(48:51:1, V/V/V)	5.76			5.39		
	甲醇-0.45%磷酸溶液-三乙胺(51:48:1, V/V/V)	5.79			5.35		
流速	1.0 mL/min	5.71	5.74	0.44	5.31	5.36	0.84
	0.9 mL/min	5.76			5.36		
	1.1 mL/min	5.73			5.40		
柱温	30 °C	5.71	5.72	0.27	5.31	5.34	0.47
	25 °C	5.74			5.36		
	35 °C	5.72			5.34		

明供试品溶液在室温下放置12 h内基本稳定。

2.9 重复性试验

精密称取样品(批号:170501)适量,共6份,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,记录峰面积并计算含量。结果,盐酸小檗碱和黄芩苷含量平均值分别为5.73、5.36 mg/g, RSD分别为0.25%、0.60%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:170501)适量,共6份,分别加入对照品溶液(盐酸小檗碱:1.756 mg/mL,黄芩苷:1.624 mg/mL)各1 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收试验结果(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, %
盐酸小檗碱	0.305 0	1.747 7	1.756	3.474 6	98.34	98.02	1.06
	0.306 5	1.756 2	1.756	3.488 4	98.64		
	0.309 5	1.773 4	1.756	3.517 1	99.30		
	0.290 4	1.664 0	1.756	3.369 4	97.12		
	0.302 7	1.734 5	1.756	3.428 7	96.48		
	0.311 1	1.782 6	1.756	3.507 5	98.23		
黄芩苷	0.305 0	1.634 8	1.624	3.235 1	98.54	97.57	1.66
	0.306 5	1.642 8	1.624	3.238 1	98.23		
	0.309 5	1.658 9	1.624	3.233 0	99.30		
	0.290 4	1.556 5	1.624	3.155 6	96.00		
	0.302 7	1.622 3	1.624	3.168 4	95.20		
	0.311 1	1.667 5	1.624	3.260 2	98.07		

2.11 耐用性试验

2.11.1 改变色谱柱 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件以不同色谱柱[Hypersil BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Wondasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Hypersil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记录峰面积并计算含量,详见表3。结果,盐酸小檗碱和黄芩苷含量平均值分别为5.74、5.32 mg/g, RSD分别为1.12%、1.15%,表明本色谱条件在一定色谱柱变动情况下耐用。

2.11.2 改变流动相 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件以不同流动相[甲醇-0.45%磷酸溶液-三乙胺比例(*V/V/V*)分别为50:49:1、48:52:1、52:48:1]进样测定,记录峰面积并计算含量,详见表3。结果,盐酸小檗碱和黄芩苷含量平均值分别为5.75、5.35 mg/g, RSD均为0.75%,表明本色谱条件在一定流动相变动情况下耐用。

2.11.3 改变流速 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件以不同流速(1.0、0.9、1.1 mL/min)进样测定,记录峰面积并计算含量,详见表3。结果,盐酸小檗碱和黄芩苷含量平均值分别为5.74、5.36 mg/g, RSD分别为0.44%、0.84%,表明本色谱条件在一定流速变动情况下耐用。

2.11.4 改变柱温 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件以不同柱温(30、25、35 ℃)进样测定,记录峰面积并计算含量,详见表3。结果,盐酸小檗碱和黄芩苷含量平均值分别为5.72、5.34 mg/g, RSD分别为0.27%、0.47%,表明本色谱条件在一定柱温变动情况下耐用。

2.12 样品含量测定

取3批样品内容物各适量,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,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 4 Content determination results of samples ($n=3$, mg/g)

批号	盐酸小檗碱	黄芩苷
170101	5.71	5.31
170501	5.74	5.36
170901	5.81	5.21

3 讨论

预试验中,笔者以盐酸小檗碱和黄芩苷对照品溶液在190~400 nm波长范围内进行扫描,结果显示盐酸小檗碱在265 nm波长处有最大吸收,黄芩苷在280 nm波长处有最大吸收。因此,确定盐酸小檗碱测定波长为265 nm、黄芩苷的测定波长为280 nm。

在样品提取方法上,笔者分别考察了盐酸-甲醇溶液(1:100, *V/V*)超声处理20 min、70%乙醇溶液超声处理30 min以及加DMF超声处理5 min。结果,第一种提取方法提取黄芩苷含量较低,第二种方法提取盐酸小檗碱含量较低,而采用DMF提取超声处理对2种成分

的提取效果均较好。在色谱条件的选择中,笔者分别考察了甲醇-水、甲醇-磷酸二氢钾溶液、甲醇-磷酸溶液-三乙胺等流动相系统,结果采用甲醇-0.4%磷酸溶液-三乙胺(50:49:1, *V/V/V*)为流动相时,所得目标成分与相邻峰之间的分离度好、峰形尖锐、对称性好,理论板数均大于4 000,能满足HPLC法的相关要求。

综上所述,本方法操作简便,精密度、准确度、稳定性、重复性、耐用性均较好,可用于健脾止泻宁颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷含量的同时测定。

参考文献

- [1] 兰杨, 谯志文, 唐桂英, 等. 健脾止泻宁颗粒的质量标准提高研究[J]. 中国药房, 2017, 28(18): 2568-2572.
- [2] 任香怡, 吕珊珊, 张荫杰, 等. 健脾止泻宁颗粒抗炎镇痛作用研究[C]//2013年第四届中医药现代化国际科技大会论文集, 2017: 315-320.
- [3] 周年华, 吕珊珊, 谯志文, 等. 健脾止泻宁颗粒止泻作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(2): 190-194.
- [4] 局少华, 吕珊珊, 张荫杰, 等. 健脾止泻宁颗粒促消化、促吸收作用研究[C]//2013年全国博士学术论坛论文集, 2013: 320-325.
- [5] 任香怡, 吕珊珊, 张荫杰, 等. 健脾止泻宁颗粒对免疫功能的影响[C]//四川省生理科学会第十一届学术交流会论文集, 2014: 102-108.
- [6] 陈欢, 谯志文, 杨发龙, 等. 健脾止泻宁颗粒对肠道生态的影响[C]//四川省生理科学会第十一届学术交流会论文集, 2014: 98-102.
- [7] 牛俊岩, 张磊. 健脾止泻宁颗粒治疗小儿脾虚湿热型急性腹泻60例[J]. 陕西中医, 2016, 37(1): 21-22.
- [8] 高银辉, 张磊. 健脾止泻宁颗粒治疗小儿迁延性腹泻病(脾虚湿热证)60例[J]. 中国药业, 2016, 25(4): 217-218.
- [9] 史代萌. 观察健脾止泻宁颗粒联合云南白药治疗溃疡性结肠炎的临床疗效[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(25): 150-151.
- [10] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准 WS-10941 (ZD-0941)-2002-2011Z[S]. 2011.
- [11] 李俊平, 吴春芝, 岳文, 等. 小檗碱的临床新用途及新剂型研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3154-3158.
- [12] 辛文好, 宋俊科, 何国荣, 等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-653, 659.

(收稿日期: 2018-01-19 修回日期: 2018-03-23)

(编辑: 张 静)