

HPLC法同时测定安脑丸中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的含量

孙艳涛*(淄博市食品药品检验研究院中药检验科,山东淄博 255086)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0389-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.35

摘要 目的:建立同时测定安脑丸中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3 C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为230 nm,进样量为10 μl。结果:栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的检测进样量线性范围分别为0.041 0~0.820 0、0.037 6~0.752 0、0.095 2~1.904 0 μg($r=0.999 9$);加样回收率分别为97.31%~100.41%、98.32%~101.76%、99.16%~101.30%,RSD分别为1.10%、1.20%、0.76%($n=6$)。结论:该方法简便、准确,可用于安脑丸的质量控制。

关键词 安脑丸;栀子苷;盐酸小檗碱;黄芩苷;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Geniposide, Berberine Hydrochloride and Baicalin in Annao Pill by HPLC

SUN Yantao(Inspection Dept. of TCM, Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255086, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of geniposide, berberine hydrochloride and baicalin in Annao pill. METHODS: HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-3 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 230 nm, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.041 0-0.820 0 μg for geniposide ($r=0.999 9$), 0.037 6-0.752 0 μg for berberine hydrochloride ($r=0.999 9$) and 0.095 2-1.904 0 μg for baicalin ($r=0.999 9$), respectively; recoveries were 97.31% -100.41% (RSD=1.10%, $n=6$), 98.32% -101.76% (RSD=1.20%, $n=6$) and 99.16% -101.30% (RSD=0.76%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the quality control of Annao pill.

KEYWORDS Annao pill; Geniposide; Berberine hydrochloride; Baicalin; HPLC

安脑丸由人工牛黄、猪胆粉、黄芩、黄连、栀子、郁金等15味中药组成,收载于2010年版《中国药典》第一增补本^[1]及2015年版《中国药典》一部^[2],具有清热解毒、醒脑安神、豁痰开

窍、镇惊熄风等功效,可用于高热神昏、烦躁谵语、抽搐惊厥、中风窍闭、头痛眩晕及高血压、脑中风等症;文献报道其临床上也多用于各种热证^[3-4],且疗效确切。黄芩味苦,性寒,归肺、

3 讨论

3.1 处方与糖含量的关系

测定结果显示,国内C企业产品含糖量最高,平均为2.54 mg/ml;国内B企业和A企业平均结果分别为1.68 mg/ml和0.90 mg/ml。B企业产品批间差异显著,达到43.6%;C企业与A企业结果约为3:1,与产品处方中甜瓜籽的占比基本一致。同时发现,甜瓜籽通常含较多葡萄糖和果糖,同品种甜瓜籽的含糖量和各种糖的占比应相对固定。提示A企业与B企业甜瓜籽品种相同或接近,葡萄糖和果糖含量总和占总糖量的70%~90%,而C企业产品多数蔗糖占比高,提示C企业甜瓜籽品种可能有所不同。因此,在生产过程中应注意甜瓜籽选料的一致性和工艺的稳定性。

3.2 未来研究方向

由供试品色谱图可以看出,在保留时间30 min以后均出现未知色谱峰,推测为低聚糖,并推测其可能是具有特殊活性的功能性成分^[8],今后我们将对其分离、制备、活性等进行更为深入的研究。由于市场上此类产品较多,但大多都未对其中糖含量进行定量研究,从而未对其原料(甜瓜籽)选料和质量

控制制订标准。因此,本研究为今后对骨瓜提取物注射液中其他成分(如低聚糖)的研究提供了试验基础。

综上所述,本方法简单、快速、准确,可用于骨瓜提取物注射液中糖的测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.国家药品标准 YBH05102006[S].2006.
- [2] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第十四册[S].2003.
- [3] 国家药典委员会.国家药品标准 YBH31832005[S].2005.
- [4] 郭中平.我国生物制品质量标准体系的探讨[J].中国新药杂志,2014,23(9):994.
- [5] 孔飞飞,郭良君,谭兴起,等.骨瓜提取物致药物不良反应20例分析[J].中国新药杂志,2013,22(8):979.
- [6] 易丹,唐少龙,陆向红.21例骨瓜提取物致不良反应文献分析[J].中国药物警戒,2013,10(3):175.
- [7] 李洪玲,但建明,王琪,等.甜瓜籽营养成分分析[J].中国油脂,2004,29(10):68.
- [8] 欧阳杰湖,陈子渊,潘善庆,等.骨瓜提取物注射液的生物活性测定[J].中南药学,2013,11(2):92.

*主管中药师。研究方向:药品检验及质量控制。电话:0533-7866112。E-mail:15605339172@wo.cn

(收稿日期:2015-01-02 修回日期:2015-12-13)
(编辑:周 箐)

胆、脾、大肠、小肠经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,可用于湿温、暑湿、湿热痞满、肺热咳嗽、高热烦渴、血热吐衄、痈肿疮毒等证。黄连味苦,性寒,归心、脾、胃、肝、胆、大肠经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,可用于湿热痞满、高热神昏、心火亢盛、心烦不寐、心悸不宁、血热吐衄等证。栀子味苦,性寒,归心、肺、三焦经,具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效,可用于热病心烦、湿热黄疸、淋证涩痛、血热吐衄、目赤肿痛、火毒疮疡等证。安脑丸药典标准中只采用薄层色谱法对黄芩、黄连、栀子进行定性鉴别,而没有对其进行含量测定。因此,本试验参考相关文献^[5-10],建立了同时测定安脑丸中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷含量的方法,以为更好地控制该制剂质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪,包括DGU-20A型脱气机、SIL-20A型自动进样系统、SPD-20A型紫外检测器、CTO-20A型柱温箱、LCsolution色谱工作站(日本岛津公司);MS205DU型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KS-300E型超声波清洗器(宁波科生仪器厂)。

1.2 药品与试剂

安脑丸(哈尔滨蒲公英药业有限公司,批号:20130301、20130504、20140508);栀子苷对照品(批号:110749-201316,纯度:97.5%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200910,纯度:97.9%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201318,纯度:93.3%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸、乙醇、稀乙醇(取乙醇529 ml,加水稀释至1000 ml,即得)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:Inertsil ODS-3 C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:230 nm;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷与其他组分分离效果好,分离度均>1.5,理论板数按栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷计均不低于4 000。色谱见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Conditions of gradient elution

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	10	90
14	10	90
18	22	78
38	22	78
42	90	10
50	90	10

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取栀子苷对照品适量,置于50 ml量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为0.409 5 mg/ml的栀子苷对照品溶液;精密称取盐酸小檗碱对照品适量,置于100 ml量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为0.125 3 mg/ml的盐酸小檗碱对照品

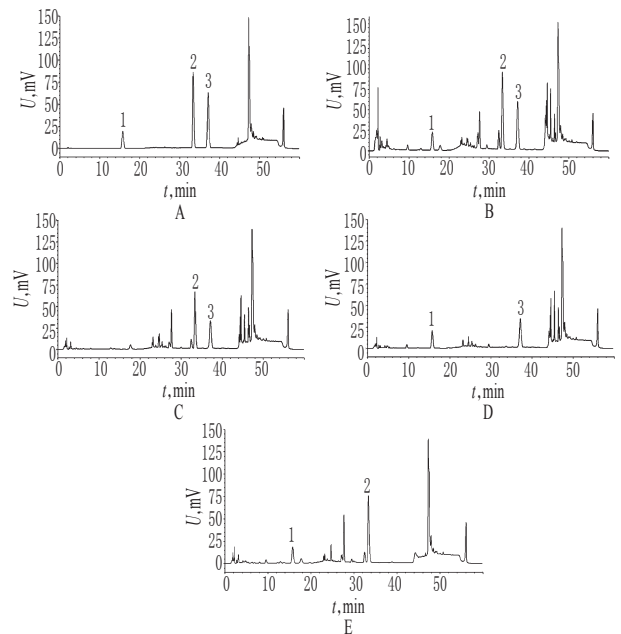


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺栀子的阴性对照;D.缺黄连的阴性对照;E.缺黄芩的阴性对照;1.栀子苷;2.盐酸小檗碱;3.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative sample without gardenia jasminoides; D.negative sample without scutellaria baicalensis; E.negative sample without baicalin; 1.geniposide; 2.berberine hydrochloride; 3.baicalin

溶液;精密称取黄芩苷对照品适量,置于100 ml量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为0.190 3 mg/ml的黄芩苷对照品溶液。再精密量取栀子苷对照品溶液1 ml、盐酸小檗碱对照品溶液3 ml、黄芩苷对照品溶液5 ml,置于同一10 ml量瓶中,加稀乙醇稀释至刻度,摇匀,即得栀子苷质量浓度为0.041 0 mg/ml、盐酸小檗碱质量浓度为0.037 6 mg/ml、黄芩苷质量浓度为0.095 2 mg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品1 g,剪碎,置于具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇50 ml,称定质量,超声处理(功率:300 W,频率:40 kHz) 60 min,放冷,再次称定质量,用稀乙醇补足缺失的质量,摇匀,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例及制备工艺分别制备不含栀子的阴性样品、不含黄连的阴性样品和不含黄芩的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法分别制备阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液各1、2、5、10、15、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得栀子苷的回归方程 $y=1\ 313\ 527.70x+214.72$ ($r=0.999\ 9$)、盐酸小檗碱的回归方程 $y=5\ 080\ 397.65x-547.41$ ($r=0.999\ 9$)、黄芩苷的回归方程 $y=1\ 800\ 647.04x+2\ 903.22$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的检测进样量线性范围分别为0.041 0~0.820 0、0.037 6~0.752 0、0.095 2~1.904 0 μg。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下

色谱条件进样测定,平行测定6次,记录峰面积。结果,栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷峰面积的RSD分别为0.33%、0.41%、0.33%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20130504)适量,分别于放置0、5、10、15、20、25、30 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷峰面积的RSD分别为0.29%、0.68%、0.39%($n=7$),表明供试品溶液在30 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品(批号:20130504)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷的含量。结果,栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的含量分别为2.565、2.487、5.447 mg/g, RSD分别为0.36%、0.97%、0.42%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:20130504)0.5 g,共6份,分别精密加入栀子苷对照品溶液3 ml、盐酸小檗碱对照品溶液10 ml、黄芩苷对照品溶液15 ml,再精密加入稀乙醇22 ml,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	称样量, 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, %
栀子苷	0.502 4	1.289	1.228	2.510	99.43	99.33	1.10
	0.503 0	1.290	1.228	2.519	100.08		
	0.501 8	1.287	1.228	2.520	100.41		
	0.502 0	1.288	1.228	2.483	97.31		
	0.501 6	1.287	1.228	2.511	99.67		
	0.502 2	1.288	1.228	2.505	99.10		
盐酸小檗碱	0.502 4	1.249	1.253	2.493	99.28	99.67	1.20
	0.503 0	1.251	1.253	2.500	99.68		
	0.501 8	1.248	1.253	2.486	99.80		
	0.502 0	1.248	1.253	2.523	101.76		
	0.501 6	1.247	1.253	2.490	99.20		
	0.502 2	1.249	1.253	2.481	98.32		
黄芩苷	0.502 4	2.737	2.854	5.611	100.70	100.16	0.76
	0.503 0	2.740	2.854	5.586	99.72		
	0.501 8	2.733	2.854	5.624	101.30		
	0.502 0	2.734	2.854	5.596	100.28		
	0.501 6	2.732	2.854	5.581	99.82		
	0.502 2	2.735	2.854	5.565	99.16		

2.8 样品含量测定

称取3批样品各适量,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,并计算其中各成分的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of contents determination of samples($n=3$)

批号	栀子苷, mg/g	RSD, %	盐酸小檗碱, mg/g	RSD, %	黄芩苷, mg/g	RSD, %
20130301	2.267	0.76	2.429	1.51	5.533	0.79
20130504	2.565	0.54	2.487	1.24	5.447	0.82
20140508	2.252	1.02	2.522	1.13	5.506	1.15

3 讨论

3.1 测定波长的选择

笔者曾取栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷对照品溶液在200~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描,结果栀子苷在238 nm波长处有最大吸收,盐酸小檗碱在228、265、345 nm波长处均有最大吸收,黄芩苷在278 nm波长处有最大吸收(在230 nm波长处吸收较强)。由于栀子苷在样品中的含量相对较低,紫外吸收相对较弱,同时兼顾盐酸小檗碱的最大吸收波长,故选择230 nm作为测定波长,这样3组分均能获得较高的灵敏度。笔者还对比了230 nm作为测定波长和选择3组分各自的最大吸收波长(238、345、278 nm)对测定结果的影响,发现测定结果无明显差异。故最终本试验选择230 nm作为测定波长。

3.2 提取溶剂和超声时间的考察

笔者考察了甲醇、乙醇、80%乙醇、稀乙醇作为提取溶剂,同时超声60 min的结果,发现稀乙醇的提取率最高,分离效果也较好,故提取溶剂选择稀乙醇。还考察了稀乙醇不同超声时间(20、40、60、80 min)的结果,发现超声处理60 min后3组分的质量浓度不再增加,故超声时间选择60 min。

综上所述,本方法简便、准确,可用于安脑丸的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 第一增补本[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 21.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 886.
- [3] 郭俊平. 安脑丸治疗各种原因引起的高热204例[J]. 中国药业, 2011, 20(24): 82.
- [4] 周晶. 安脑丸治疗急性发热的临床观察[J]. 光明中医, 2011, 26(6): 1 155.
- [5] 陶利, 王玉娟, 梁竹, 等. HPLC法测定牛黄上清片中5种成分的含量[J]. 解放军药学学报, 2014, 30(2): 138.
- [6] 唐春丽, 陆石英, 覃文慧, 等. 多波长HPLC法同时测定清胃黄连片中4种成分的含量[J]. 中药材, 2014, 37(6): 1 062.
- [7] 孙承浩, 王吉华. HPLC同时分析芎菊上清丸中7个化学成分的含量研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(7): 177.
- [8] 师永清, 康淑荷, 王爱军. HPLC法同时测定黄连双清丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、盐酸小檗碱和大黄素的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1 612.
- [9] 蒋范任, 蔡洪鲲, 周翀, 等. 反相高效液相色谱法同时测定栀子金花丸中栀子苷、小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚的含量[J]. 中南药学, 2015, 13(2): 172.
- [10] 马志英. HPLC同时测定牛黄消炎灵胶囊中3种药效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 114.

(收稿日期: 2015-09-30 修回日期: 2015-10-24)

(编辑: 刘柳)