

HPLC法同时测定清胃黄连丸中5种成分的含量

毛爱丽*(鹤壁市食品药品检验所,河南鹤壁 458030)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4740-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.47

摘要 目的:建立同时测定清胃黄连丸中栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷和丹皮酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-0.3%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为238 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚检测质量浓度线性范围分别为15.36~153.6、6.56~65.6、22.74~227.4、26.06~260.6、5.57~55.7 μg/ml($r \geq 0.999 8$);精密度、准确度、重复性试验的RSD $\leq 1.0\%$;加样回收率分别为96.28%~99.38%(RSD=1.1%)、97.13%~99.48%(RSD=1.2%)、98.14%~100.25(RSD=0.7%)、97.38%~100.05%(RSD=1.0%)、96.30%~99.12%(RSD=1.2%), n 均为6。结论:该方法操作简便、重复性好,适用于清胃黄连丸中栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷和丹皮酚的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;清胃黄连丸;栀子苷;芍药苷;盐酸小檗碱;黄芩苷;丹皮酚;含量测定

Simultaneous Determination of 5 Components in Qingwei Huanglian Pill by HPLC

MAO Ai-li(Hebi Institute for Food and Drug Control, Henan Hebi 458030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of geniposide, paeoniflorin, berberine hydrochloride, baicalin and paeonol in Qingwei huanglian pill. METHODS: HPLC was performed on the column of Diamonsil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.3% phosphate (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 238 nm, column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 15.36-153.6 μg/ml for geniposide, 6.56-65.6 μg/ml for paeoniflorin, 22.74-227.4 μg/ml for berberine hydrochloride, 26.06-260.6 μg/ml for baicalin and 5.57-55.7 μg/ml for paeonol($r \geq 0.999 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were not higher than 1.0%; recoveries were 96.28%-99.38% (RSD=1.1%, $n=6$), 97.13%-99.48% (RSD=1.2%, $n=6$), 98.14%-100.25 (RSD=0.7%, $n=6$), 97.38%-100.05% (RSD=1.0%, $n=6$) and 96.30%-99.12% (RSD=1.2%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and good reproducibility, and suitable for the contents determination of geniposide, paeoniflorin, berberine hydrochloride, baicalin and paeonol in Qingwei huanglian pill.

KEYWORDS HPLC; Qingwei huanglian pill; Geniposide; Paeoniflorin; Berberine hydrochloride; Baicalin; Paeonol; Content determination

清胃黄连丸是由黄连、桔梗、甘草、栀子、黄芩、赤芍、地黄、牡丹皮、知母、黄柏等14味药材组成的中药复方制剂,具有清胃泻火、解毒消肿之功效,临床用于治疗肺胃火盛所致的口舌生疮、齿龈、咽喉肿痛^[1]。2010年版《中国药典》(一部)记载了该制剂,并对制剂中黄连、黄柏所含的盐酸小檗碱的含量测定进行了规定^[1],但仅控制单一成分的含量很难保证复方制剂的质量^[2]。为了更好地对制剂质量进行控制,笔者参阅相关文献^[3-7],选择了栀子、赤芍、黄连、黄柏、黄芩、牡丹皮6种中药材中的5种主要成分进行质量分析,为提高清胃黄连丸的质量控制提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010C型高效液相色谱(HPLC)仪,包括UV-240型分光光度计(日本岛津公司);AE 240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);SC-3610型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);FW-100型高速万能粉碎机(北京科伟永

兴仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

清胃黄连丸(山西旺龙神农药业有限公司,批号:20140706、20140908、20141110,规格:9 g/袋);盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200609,纯度:98.1%)、丹皮酚对照品(批号:110708-200506,纯度:100%);栀子苷对照品(批号:110749-201115,纯度:99.7%)、黄芩苷对照品(批号:110715-200413,纯度:100%)、芍药苷对照品(批号:110736-201337,纯度:94.9%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、磷酸为色谱纯,水为纯化水。

1.3 饮片

黄连、桔梗、甘草、栀子、黄芩、赤芍、地黄、牡丹皮、知母、黄柏、连翘、石膏、天花粉、玄参饮片均购于鹤壁市天宝医药连锁有限责任公司总店,批号:20150312)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.3%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 12% A; 10~22.5 min, 12%→14% A; 22.5~23 min, 14%→24% A; 23~38

* 主管药师。研究方向:药品分析检验。E-mail: mal2009@163.com

min, 24% A; 38~38.5 min, 24%→38% A; 38.5~55 min, 38% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 238 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μl。在上述色谱条件下进样测定, 理论板数均大于5 000, 分离度均大于1.5, 各成分基线分离良好。色谱见图1。

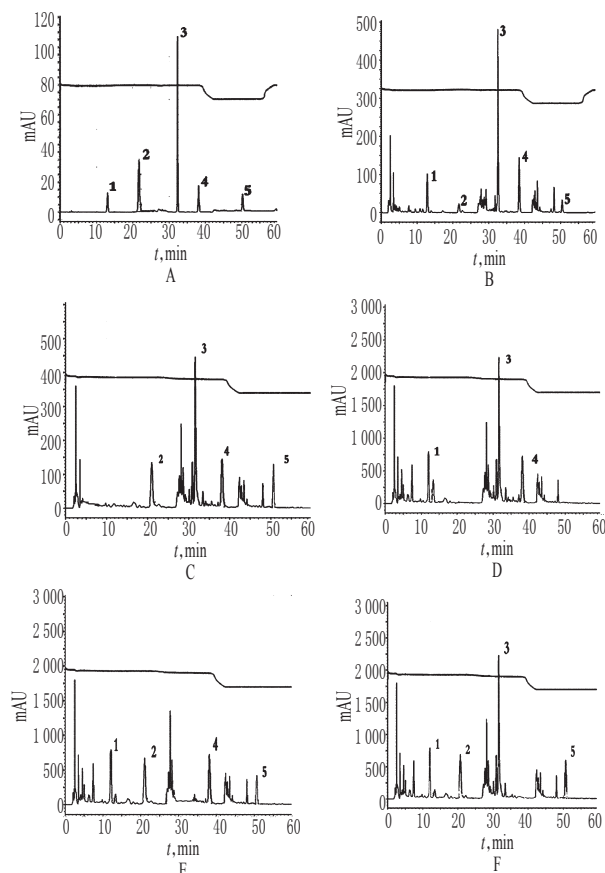


图1 高效液相色谱图

A.对照品; B.供试品; C.缺栀子的阴性对照; D.缺赤芍、牡丹皮的阴性对照; E.缺黄柏、黄连的阴性对照; F.缺黄芩的阴性对照; 1.栀子苷; 2.芍药苷; 3.盐酸小檗碱; 4.黄芩苷; 5.丹皮酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.negative control without *Gardenia jasminoides*; D.negative control without *Radix paeoniae* and *Cortex moutan*; E.negative control without *Cortex phellodendri* and *Coptis chinensis*; F.negative control without *Scutellaria baicalensis*; 1.geniposide; 2.paeoniflorin; 3.berberine hydrochloride; 4.baicalin; 5.paeonol

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品贮备液 精密称取栀子苷对照品 30.82 mg、芍药苷 13.83 mg、盐酸小檗碱对照品 46.36 mg、黄芩苷对照品 52.13 mg、丹皮酚对照品 11.14 mg, 置于同一 100 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 得栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚质量浓度分别为 0.308 2、0.138 3、0.463 6、0.521 3、0.111 4 mg/ml 的混合对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量, 粉碎, 过 3 号筛, 取细粉, 精密称取 0.5 g 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 ml, 精密称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz, 下同)提取 20 min, 密闭放置 4 h, 加热回流 30 min, 放冷至室温, 补足减失的质量, 摇匀, 以

半径为 16 cm、3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按清胃黄连丸的处方和制备工艺分别制备缺黄柏、黄连、栀子、黄芩、赤芍、牡丹皮的单一阴性对照样品, 再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液 5.0 ml, 共 5 份, 分别置于 10、25、50、50、100 ml 量瓶中, 加流动相定容, 制成系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列混合对照品溶液各 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚回归方程分别为 $y=15\ 209x-1\ 157$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=13\ 377x-166\ 507$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=38\ 995x-53\ 991$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=13\ 526x-16\ 417$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=20\ 310x-3\ 885$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明, 栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚检测质量浓度线性范围分别为 15.36~153.6、6.56~65.6、22.74~227.4、26.06~260.6、5.57~55.7 μg/ml。

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, 栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.5%、0.6%、0.3%、0.4%、0.5% ($n=6$), 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: 20140706)适量, 分别于放置 0、2、4、8、12 h 时进样测定, 记录峰面积。结果, 栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.8%、0.7%、0.6%、1.0% ($n=5$), 表明供试品溶液在 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: 20140706)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, 记录峰面积。结果, 栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.7%、0.4%、0.5%、0.7% ($n=5$), 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取样品(批号: 20140706)适量, 共 6 份, 分别加入一定质量的对照品, 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, 计算样品含量, 并计算加样回收率, 结果见表 1。

2.8 样品含量测定

取 3 批样品各适量, 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, 计算样品含量, 结果见表 2。

3 讨论

笔者取栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚对照

表1 加样回收试验结果(n=6)

Tab 1 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, %
栀子苷	0.251 2	1.542 4	1.229 1	2.745 5	97.88	97.57	1.1
	0.251 0	1.541 1	1.229 1	2.739 8	97.53		
	0.250 9	1.540 5	1.536 4	3.067 3	99.38		
	0.250 6	1.538 7	1.536 4	3.017 9	96.28		
	0.250 3	1.536 8	1.843 7	3.338 8	97.74		
	0.250 4	1.537 5	1.843 7	3.318 3	96.59		
芍药苷	0.251 1	0.657 9	0.525 0	1.168 5	97.26	98.24	1.2
	0.250 6	0.656 6	0.525 0	1.166 5	97.13		
	0.215 0	0.563 3	0.656 2	1.213 1	99.02		
	0.250 9	0.657 4	0.656 2	1.309 5	99.37		
	0.251 3	0.658 4	0.787 5	1.441 8	99.48		
	0.250 4	0.656 0	0.787 5	1.421 4	97.20		
盐酸小檗碱	0.250 6	2.323 1	1.819 2	4.123 3	98.96	99.08	0.7
	0.251 3	2.329 6	1.819 2	4.114 9	98.14		
	0.250 8	2.324 9	2.274 0	4.586 0	99.43		
	0.250 7	2.324 0	2.274 0	4.573 7	98.93		
	0.250 9	2.325 8	2.728 7	5.020 9	98.77		
	0.251 0	2.326 8	2.728 7	5.062 3	100.25		
黄芩苷	0.250 6	2.611 3	2.085 2	4.671 8	98.82	98.63	1.0
	0.250 4	2.609 2	2.085 2	4.680 4	99.33		
	0.250 8	2.613 3	2.606 5	5.151 5	97.38		
	0.250 3	2.608 1	2.606 5	5.215 8	100.05		
	0.251 0	2.615 4	3.127 8	5.667 8	97.59		
	0.251 4	2.619 6	3.127 8	5.705 0	98.64		
丹皮酚	0.251 5	0.558 3	0.445 6	0.990 0	96.88	97.77	1.2
	0.250 6	0.556 3	0.445 6	0.985 4	96.30		
	0.252 0	0.559 4	0.557 0	1.108 5	98.58		
	0.252 4	0.560 3	0.557 0	1.112 4	99.12		
	0.250 1	0.555 2	0.668 4	1.203 7	97.02		
	0.250 6	0.556 3	0.668 4	1.216 1	98.71		

表2 样品含量测定结果(n=4, mg/g)

Tab 2 Results of contents determination of samples (n=4, mg/g)

批号	栀子苷	芍药苷	盐酸小檗碱	黄芩苷	丹皮酚
20140706	6.14	2.62	9.27	10.42	2.22
20140908	6.09	2.73	9.22	10.93	2.06
20141110	6.32	2.73	9.36	10.70	2.19

品各适量,分别用甲醇溶解,在分光光度计200~400 nm波长处扫描,结果5种成分的最大吸收各不相同,分别在238、230、229、278、275 nm 波长处。其中,在238 nm 波长处为栀子苷的最大吸收,而且其他成分在该波长处均有较好的吸收,故选择238 nm 为测定波长。

笔者对不同的提取溶剂、提取方法、提取时间、提取溶剂体积的测量依次进行考察。结果表明,以甲醇为溶剂,先超声提取20 min,冷浸4 h后再加热回流30 min可提取完全,效果

最佳。

由于待测成分多,本试验采用梯度洗脱方法,分别选择甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸盐溶液,并参照有关文献^[8-11],经过优化洗脱条件,最终选择了峰形与分离效果均好的乙腈-0.3%磷酸系统。

赤芍和牡丹皮均含有丹皮酚、芍药苷^[3],笔者以HPLC法测定为总丹皮酚、芍药苷含量;黄连、黄柏中均含盐酸小檗碱^[1],试验中所测盐酸小檗碱为总盐酸小檗碱含量。

综上所述,该方法操作简便、重复性好,适用于清胃黄连丸中栀子苷、芍药苷、盐酸小檗碱、黄芩苷、丹皮酚的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:1 120.
- [2] 徐晓峰. 中药质量标准控制的研究进展[J]. 湖北中医药大学学报, 2001, 3(4):25.
- [3] 许明, 宋新波, 张丽娟, 等. TLC、HPLC法测定清胃黄连丸中芍药苷、芒果苷含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(11):227.
- [4] 胡远艳, 田建平. 清胃黄连片中盐酸小檗碱、药根碱、巴马汀的含量测定[J]. 广州化工, 2012, 40(16):122.
- [5] 李宝红, 吴君, 邓妙丽, 等. HPLC同时测定清胃黄连丸中的4种有效成分[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5):2 302.
- [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] 黄玉芝, 房娟娟, 李金, 等. 高效毛细管电泳法测定清胃黄连丸中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业, 2011, 20(19):20.
- [8] 姚帅, 杨跃华, 刘岩, 等. RP-HPLC同时测定大卫颗粒中绿原酸、黄芩苷、连翘苷、黄芩素和汉黄芩素的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7):1 253.
- [9] 张梅, 任爱农, 杨玉兰, 等. HPLC波长切换法同时测定清清颗粒中9个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1):29.
- [10] 郝乘仪, 朱鹤云, 冯波, 等. HPLC法测定芍菊上清颗粒中4种成分的含量[J]. 中药材, 2014, 37(3):515.
- [11] 彭明丽, 赵冠人, 温筱煦. HPLC法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(6):837.

(收稿日期:2015-05-07 修回日期:2015-07-08)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊, 欢迎投稿、订阅