

# HPLC 同时测定牛黄消炎灵胶囊中 3 种药效成分的含量

马志英\*

(西北民族大学化工学院, 兰州 730030)

**[摘要]** **目的:**建立高效液相色谱同时测定牛黄消炎灵胶囊中梔子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷 3 种药效成分含量的方法。**方法:**采用固定相为 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.8 ~ 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 双波长紫外检测。**结果:**梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷的进样量分别在 0.020 4 ~ 0.408 μg ( $r = 0.999 7$ ), 0.041 2 ~ 0.412 μg ( $r = 0.999 8$ ), 0.060 8 ~ 0.608 μg ( $r = 0.999 9$ ) 与其峰面积积分值呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 99.12%, 99.92%, 99.32%, RSD 分别为 1.77%, 1.24%, 1.63%。**结论:**方法操作简便, 准确度高, 重复性好, 专属性强, 可用于牛黄消炎灵胶囊的质量控制。

**[关键词]** 牛黄消炎灵胶囊; 双波长; 高相液相色谱; 梔子苷; 盐酸小檗碱; 黄芩苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0114-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013120114

## Determination of Three Active Components in Niu Huang Xiaoyanling Capsule by HPLC

MA Zhi-ying\*

(School of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a reversed-phase HPLC method for the determination of three active components including geniposide, berberine hydrochloride and baicalin in Niu Huang Xiaoyanling capsule. **Method:** The determination was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as the mobile phase by gradient elution at the flow rate of 0.8-1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 240 nm for geniposide and hydrochloride baicalin, 278 nm for berberine respectively. The column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The calibration curves of geniposide, berberine hydrochloride and baicalin were linear in the ranges of 0.020 4-0.408 μg ( $r = 0.999 7$ ), 0.041 2-0.412 μg ( $r = 0.999 8$ ), 0.060 8-0.608 μg ( $r = 0.999 9$ ) respectively. The average recoveries were 99.12%, 99.92% and 99.32% respectively; RSDs were 1.77%, 1.24%, 1.63% respectively. **Conclusion:** This proposed method is simple, accurate and reproducible, and suitable for the determination of the content of three analytes in Niu Huang Xiaoyanling capsule; it can be also used for quality control and evaluation of related capsule.

**[Key words]** Niu Huang Xiaoyanling capsules; reversed-phase HPLC; geniposide; berberine hydrochloride; baicalin

牛黄消炎灵胶囊由牛黄、盐酸小檗碱、黄芩、梔子、朱砂、珍珠母、郁金、雄黄、冰片、石膏、水牛角浓缩粉配制而成, 具有消炎退热、通窍、镇静、降压安神

作用, 适用于病毒性感冒、上呼吸道感染、肺炎、气管炎及其他细菌病毒感染引起的高热不退等症<sup>[1]</sup>。梔子苷(geniposide)是处方中主药梔子的主要有效成分, 具有保肝利胆、抗脑缺血损伤、降血糖、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用<sup>[2]</sup>。盐酸小檗碱(berberine hydrochloride), 具有抗痢、抗传染性原虫、调节血脂、降血糖、抗肿瘤、降血压和抗心率失常等多种药理活

**[收稿日期]** 20120530(006)

**[通讯作者]** \* 马志英, 副教授, 从事分析化学、药物分析研究,  
Tel: 0931-2938253, E-mail: mazy0707@163.com

性<sup>[3]</sup>。黄芩苷(baicalin)是处方中主药黄芩的主要有效成分,具有抗菌和抗病毒作用,表现出高效低毒的抗肿瘤活性、清除自由基及抗氧化、抗过敏、清热解热和具有一定的抗焦虑作用等作用<sup>[4-5]</sup>, 梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷含量高低直接影响牛黄消炎灵胶囊的药效。

同时测定其梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷 2 种或 3 种药效成分含量的方法未见文献报道<sup>[6]</sup>。本文建立了双波长 HPLC-UV 检测同时测定牛黄消炎灵胶囊中梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷 3 种药效成分含量的方法。

## 1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪[美国安捷伦公司,配置真空脱气机 G1322A、四元泵 G1311A、自动进样器 G1329A、二级管阵列检测器 DADG1315B、ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)], AS3120 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),梅特勒 AB204-S 型分析天平(瑞士梅特勒公司)。

梔子苷对照品(批号 110749-20010)、黄芩苷对照品(批号 110715-201016)、盐酸小檗碱对照品(批号 110713-200910)均购自中国药品生物制品检定所;牛黄消炎灵胶囊(吉林省俊宏药业有限公司,批号 20090301,规格 0.4 g/粒;哈药集团三精黑河药业有限公司批号 20081101,规格 0.4 g/粒;山西华康药业股份有限公司,批号 20090101,规格 0.4 g/粒)。乙腈(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),甲醇(分析纯,天津市光复科技发展有限公司),磷酸(分析纯,天津市百世化工有限公司),实验用水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 键合硅胶色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 15% A;流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>;10~16 min, 30% A;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>),柱温 30 ℃,检测波长 240 nm(梔子苷,盐酸小檗碱),278 nm(黄芩苷)。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取梔子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷对照品各适量,加 99.5% 甲醇 25 mL,称定质量,超声溶解 30 min,放冷至室温,再称定质量,用 99.5% 甲醇补足减失的质量,摇匀,制得梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷质量浓度分别为 408, 412, 608 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。精密吸取上述 3 种对照

品贮备液各 1.0 mL,置同一 10 mL 棕色量瓶中,加 99.5% 甲醇定容、摇匀,用孔径为 0.45 μm 的微孔过滤膜滤过,即得梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷质量浓度分别为 40.8, 41.2, 60.8 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液(I);同法可制得梔子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷质量浓度分别为 36.72, 156.6, 36.48 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液(II)。

**2.2.2 供试品溶液** 取同一批号牛黄消炎灵胶囊样品 20 粒,除去胶囊壳,置研钵中研细混合均匀,精密称定约 0.4 g,置具塞三角烧瓶中,精密加入 99.5% 甲醇 100 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷至室温,再称定质量,以 99.5% 甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.2.3 阴性对照溶液** 依照牛黄消炎灵胶囊的处方比例和生产工艺,取缺梔子、盐酸小檗碱、黄芩的阴性样品,按 2.1.2 项下方法制备阴性对照溶液。

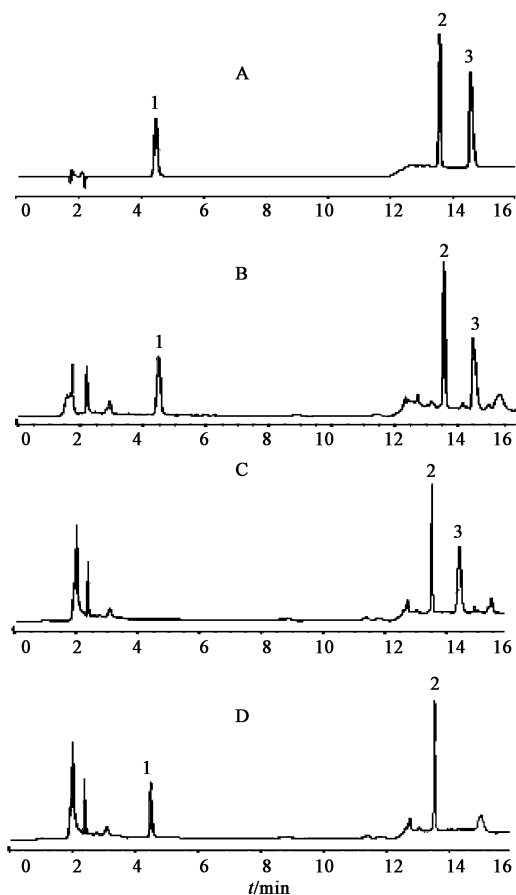
### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定分析。结果,供试品中梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷色谱峰与他们各自相邻色谱峰的基线达到分离;阴性对照溶液在对照品相应保留时间未出现色谱峰,表明其余成分对梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷的测定无干扰,色谱图见图 1, 2。

**2.3.2 线性关系考察** 精密吸取 2.2.1 项下对照品混合溶液(I) 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10 mL,分别置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得系列混合标准溶液。分别进样 10 μL,按上述色谱条件测定,以对照品质量浓度  $X$  (mg·L<sup>-1</sup>) 为横坐标,色谱峰面积积分值  $Y$  为纵坐标进行线性回归分析,得梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷回归方程分别为  $Y = 15.379X + 2.0506$  ( $r = 0.9997$ ),  $Y = 15.068X - 1.2389$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 29.12X + 10.973$  ( $r = 0.9999$ )。结果表明,梔子苷、盐酸小檗碱与黄芩苷 3 种组分的进样量分别在 0.0204 ~ 0.408, 0.0412 ~ 0.412, 0.0608 ~ 0.608 μg 与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

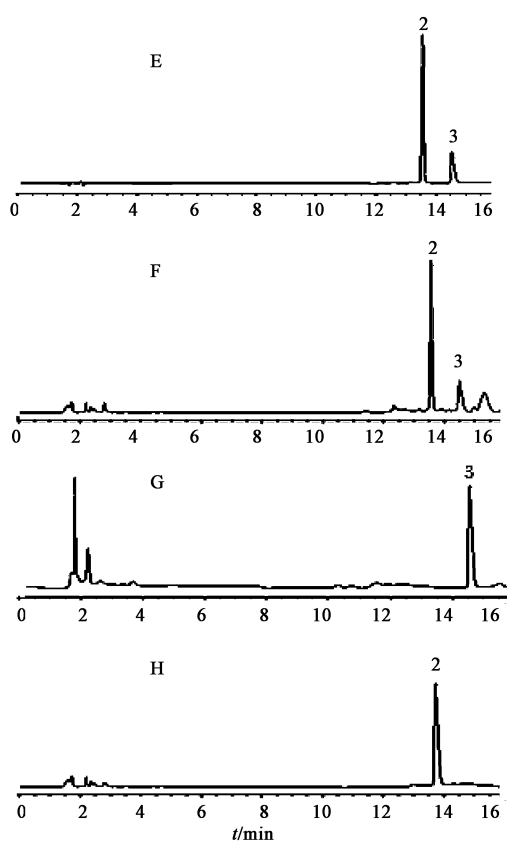
**2.3.3 精密度试验** 精密吸取对照品混合溶液 10 μL,按上述色谱条件连续进样 6 次测定,结果梔子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.37%, 0.52%, 0.56%, 可见仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批号样品(20090301) 共 6 份,分别按 2.2.2 项下制备供试品溶液方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定分析,结果



A. 对照品; B. 牛黄消炎灵胶囊样品;  
C. 缺栀子阴性样品; D. 缺盐酸小檗碱阴性样品  
1. 栀子苷; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸小檗碱

图 1 牛黄消炎灵胶囊 HPLC (240 nm)



E. 对照品; F. 牛黄消炎灵胶囊样品;  
G. 缺黄芩阴性样品; H. 缺栀子与小檗碱阴性样品;  
1. 栀子苷; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸小檗碱

图 2 牛黄消炎灵胶囊 HPLC (278 nm)

表 1 栀子苷加样回收率试验 (n=3)

样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.383 7	0.312 1	0.687 2	97.24		
0.384 5	0.312 1	0.700 0	101.1		
0.386 4	0.312 1	0.693 4	98.37		
0.384 7	0.385 6	0.773 8	100.9		
0.385 1	0.385 6	0.768 7	99.48	99.12	1.77
0.386 2	0.385 6	0.763 7	97.9 0		
0.384 5	0.462 7	0.838 2	98.05		
0.385 6	0.462 7	0.853 4	101.1		
0.385 8	0.462 7	0.838 9	97.93		

样品中栀子苷、小檗碱、黄芩苷的平均含量分别为 1.817, 7.921, 1.829  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 其 RSD ( $n=6$ ) 分别为 0.40%, 0.60%, 0.55%。表明本方法重复性良好。

**2.3.5 溶液稳定性试验** 分别精密吸取同一批号 (20090301) 的供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 按上述色谱条件测定分析, 结果栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积积分值的 RSD ( $n=6$ ) 分别为 0.85%, 0.66%, 1.4%, 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内稳定。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取已测知含量的样品 (批号 20090301, 栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷含量分别为 1.911, 7.909, 1.737  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 共 9 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 分别加入低、中、高 3 个量的混合对照品混合溶液 (II) 8.5, 10.5, 12.6 mL, 按 2.2.2 项下方法操作, 制备供试品溶液, 每个浓度 3 份, 进样分析, 结果见表 1~3。

**2.4 样品测定** 分别取 3 批样品, 按 2.2.2 项下制备供试品溶液的方法制备供试品溶液, 精密吸取对

照品溶液和供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 依 2.1 项下色谱条件测定含量, 结果见表 4。从样品含量测定结果表 4 可知, 3 个批号样品中, 批号 20081101 号牛黄消炎灵胶囊中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷含量与批号 20090101, 20090301 有明显的差异。

### 3 讨论

**3.1 样品提取试剂和方法的选择**<sup>[7-8]</sup> 用 70% 甲醇做提取剂, 采用超声波法提取实验样品成分, 并比

表 2 盐酸小檗碱加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1.588	1.331	2.930	100.8		
1.591	1.331	2.941	101.4		
1.599	1.331	2.925	99.62		
1.592	1.644	3.222	99.15		
1.594	1.644	3.256	101.1	99.92	1.24
1.598	1.644	3.211	98.11		
1.591	1.973	3.574	100.5		
1.596	1.973	3.577	100.4		
1.597	1.973	3.535	98.23		

表 3 黄芩苷加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.348 8	0.310 1	0.652 7	98.00		
0.349 5	0.310 1	0.664 9	101.7		
0.351 2	0.310 1	0.662 5	100.4		
0.349 7	0.383 0	0.729 4	99.14		
0.350 0	0.383 0	0.733 4	100.1	99.32	1.63
0.351 0	0.383 0	0.724 0	97.39		
0.349 5	0.459 6	0.801 5	98.35		
0.350 5	0.459 6	0.800 6	97.93		
0.350 7	0.459 6	0.814 5	100.9		

表 4 牛黄消炎灵胶囊中 3 种成分含量测定 (n=3) mg·g<sup>-1</sup>

批号	栀子苷		小檗碱		黄芩苷	
	含量	RSD /%	含量	RSD /%	含量	RSD /%
20081101	3.693	0.52	4.122	0.76	4.279	0.37
20090101	1.817	0.95	7.898	0.65	1.719	0.86
20090301	1.911	0.91	7.909	0.72	1.737	0.94

较了 10~90 min 超声提取法实验样品成分的量,发现超声提取样品时间 < 30 min,提取的栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的量明显少。而 30~90 min 提取的栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的量差异不明显,为提高工作效率,选择 30 min 作为超声提取实验样品成分时间。

**3.2 检测波长的选择** 应用二极管阵列检测器对供试品溶液在 200~400 nm 进行扫描得知,栀子苷在 240,254 nm 处附近有最大吸收,黄芩苷在 278,320 nm 处附近有最大吸收,盐酸小檗碱在 230,265,347 nm 处附近有最大吸收,通过对上述波长下色谱峰的比较分析,发现栀子苷在 278 nm 吸收很小,在 240 nm 吸收最大,峰形良好,基线分离无干扰,盐酸

小檗碱在 240,278 nm 处响应值均较高,但在 240 nm 处吸收比 278 nm 处高,基线分离无干扰,峰形良好,黄芩苷在 278 nm 处吸收响应值最高,基线分离无干扰,峰形良好。故为提高测定灵敏度,本文采用双波长同时测定栀子苷(240 nm)、盐酸小檗碱(240 nm)和黄芩苷(278 nm)3 种药效成分的含量。

**3.3 流动相的优化选择**<sup>[9-10]</sup> 考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-SDS 水溶液等流动相对栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱分离的影响,并考察了改性剂硼酸、磷酸二氢钾、磷酸对分析目标化合物的峰形、分离度的影响,发现以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相时,分析目标化合物的峰形对称、相邻峰的基线能达到完全分离、保留时间适中。故确定以乙腈-0.2% 磷酸为流动相,以优选的梯度洗脱条件进行分析。

[参考文献]

[1] 国家卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂第 10 册[S]. WS3-B-1899-95;北京:人民卫生出版社,1964:29.

[2] 陈雁,张现涛,张雷红,等. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(12):1.

[3] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师,2006,9(5):469.

[4] 徐玉田. 黄芩的化学成分及现代药理作用研究进展[J]. 光明中医,2010,25(3):544.

[5] 洪怡,何伟,李丹,等. 黄芩苷脂质体的制备及体外抗肿瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):29.

[6] 郑连军,冯燕华,杨金云,等. 高效液相色谱法测定牛黄消炎灵胶囊中黄芩苷含量[J]. 中国药业,2008,17(14):34.

[7] 师永清,师永花. HPLC 同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):88.

[8] 范成杰,江道峰,凌宗士. 响应面法优化黄芩中黄芩苷闪式提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):48.

[9] 汪文来,郜志宏,于智敏,等. HPLC 测定芩菱颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):116.

[10] 马志英,师永清,罗兴平. RP-HPLC 双波长法测定清热解毒胶囊中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药房,2012,23(8):748.

[责任编辑 顾雪竹]