

HPLC 测定炎可宁片中盐酸小檗碱、 黄芩苷和汉黄芩素的含量

黄燕萍*

(广西北海食品药品检验所, 广西 北海 536000)

[摘要] 目的:建立炎可宁片中盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素含量的 HPLC 测定方法。方法:采用 Shim-pack VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为甲醇-乙腈-0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH 3.0),梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 265 nm。结果:盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素的线性范围分别为 3.838 ~ 115.1 ($r = 0.9998$), 15.51 ~ 465.2 ($r = 1.0000$), 7.005 ~ 210.1 mg·L⁻¹ ($r = 1.0000$), 方法回收率均不低于 98%。结论:方法简便、准确、重复性好,能排除其他成分的干扰,可用于该制剂的质量控制的评价。

[关键词] 高效液相色谱法; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 汉黄芩素; 炎可宁片

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0097-03

Determination of Berberine Hydrochloride, Baicalin and Wogonin in Yankening Pian by HPLC

HUANG Yan-ping*

(Guangxi Beihai Institute for Food and Drug, Beihai 536000, China)

[Abstract] Objective: A HPLC method was established for the determination of berberine hydrochloride, baicalin and wogonin in Yankening Pian. **Method:** Shim-pack VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water, which was adjusted to pH3.0 by 0.1% phosphoric acid solution and triethylamine by gradient elution. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 265 nm. **Result:** The HPLC method showed a good linear relationship in the range of 3.838-115.1 mg·L⁻¹ ($r = 0.9998$) for berberine hydrochloride, 15.51-465.2 mg·L⁻¹ ($r = 1.0000$) for baicalin, 7.005-210.1 mg·L⁻¹ ($r = 1.0000$) for wogonin. Recoveries for the three components were all above 98%. **Conclusion:** The methods is simple, accurate and repeatable, which can be used for the quality control of the tablets.

[Key words] HPLC; berberine hydrochloride; baicalin; wogonin; Yankening Pian

炎可宁片为《卫生部药品标准》收载品种^[1],由黄柏、大黄、黄芩、板蓝根、黄连 5 味中药制成,具有清热泻火,消炎止痛的功效,临床用于急性扁桃腺炎、细菌性肺炎、急性结膜炎、中耳炎、疖痈瘰疬、急性乳腺炎、肠炎、细菌性痢疾及急性尿道感染。原标准无含量测定项,只有鉴别项;有文献报道^[3-5]单独或同时测定炎可宁片中盐酸小檗碱、黄芩苷的含量,

但尚未见同时测定炎可宁片中盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素 3 种成分的报道。本文参考有关文献^[2-11],建立了 HPLC 测定炎可宁片中黄柏、黄连的主要成分盐酸小檗碱、黄芩的主要成分黄芩苷和汉黄芩素的含量,方法简便、准确、重复性好。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型系列高效液相色谱仪 (Agilent 1200 LC 色谱工作站, G1322A (DEGASSER) 溶剂脱气机, G1311A (Quat Pump) 四元泵, G1329A (ALS) 自动进样器, G1314B VWD 紫外检测器); 德国赛多利斯 CP225D 型电子天平, 西班牙 COBOS AW-120 型自动电子天平, 上海必能信 SB3200WS 型超声波

[收稿日期] 20120204(013)

[通讯作者] *黄燕萍, 副主任药师, 从事食品与药品检验,
Tel: 0779-6803508, E-mail: huangyanping500@163.com

清洗器,天津市恒奥科技发展有限公司 Type HT-203A column HEATER。

盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩素对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110 713-200910, 10715-200815, 110753-200411);炎可宁片 3 批(样 1,批号 100201,贵州三仁堂药业有限公司;样 2,批号 100305,四川省三星堆制药有限公司;样 3,批号 100808,四川省三星堆制药有限公司);流动相甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

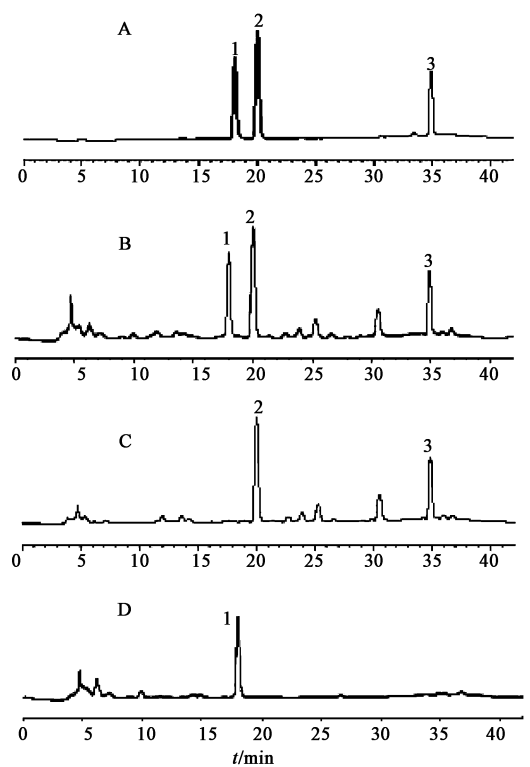
2.1 色谱条件 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-乙腈(B)-0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH 3.0)(C),其梯度见表 1;流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波长 265 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。理论板数按盐酸小檗碱计不低于 3 000。

表 1 梯度洗脱流动相比例

t/min	A/%	B/%	C/%
0	15	15	70
15	25	25	50
20	30	30	40
25	40	40	20
30	35	35	30
40	20	20	60
42	15	15	70

2.2 线性关系的考察 精密称取盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素对照品适量,以甲醇为溶剂,配制成混合对照品溶液,其中含盐酸小檗碱 0.230 4 g·L⁻¹,黄芩苷 0.930 4 g·L⁻¹,汉黄芩素 0.420 2 g·L⁻¹ 的溶液。倍比稀释法配置成系列质量浓度的溶液。进样 10 μL,测定各组分峰面积。以各组分浓度(C)横坐标,相应峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程。盐酸小檗碱 $A = 82.038 C + 9.030 3 (r = 0.999 8)$,线性范围 3.838 ~ 115.1 mg·L⁻¹;黄芩苷 $A = 33.224 C + 61.575 (r = 1.000 0)$,线性范围 15.51 ~ 465.2 mg·L⁻¹;汉黄芩素 $A = 40.881 C + 592.97 (r = 1.000 0)$,线性范围 7.005 ~ 210.1 mg·L⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片,除去包衣,精密称定,研细(过三号筛),精密称取适量(约相当于 1 片的质量),置锥形瓶中,精密称加含 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸-80% 甲醇溶液(1:100)25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 60 min,放冷,



1. 盐酸小檗碱;2. 黄芩苷;3. 汉黄芩素

图 1 混合对照品(A)、炎可宁片(B)和阴性对照(C. 缺黄柏、黄连;D. 缺黄芩)的 HPLC

再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按处方中药味的比例,分别自配不含黄柏、黄连和不含黄芩的群药,按其工艺制成阴性对照样品,再按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.5 系统适用性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液注入色谱仪,色谱图见图 1。在该色谱条件下,盐酸小檗碱峰、黄芩苷峰及汉黄芩素峰与相邻组分峰的分度均 > 1.5,理论板数按盐酸小檗碱峰计不低于 3 000,阴性样品在与对照品色谱峰相应的位置上无吸收峰,表明处方中的其他成分对测定结果无影响。

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按上述色谱条件进样,测定盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素的峰面积,重复进样 6 次,其 RSD 分别为 0.75%, 0.24%, 0.46%。

2.7 重复性试验 取同一批样品约 1 片的量共 6 份,精密称定,分别制备供试品溶液,各进样 10 μL,测定盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素的峰面积,其 RSD 分别为 1.12%, 0.23%, 0.79%。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0,

1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时进样 10 μL , 记录色谱峰面积, 计算盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素的峰面积的 RSD 分别为 0.93%, 0.41%, 0.37%。

2.9 加样回收率试验 取已测定盐酸小檗碱、黄芩苷和汉黄芩素含量的炎可宁片(批号 100201)样品 6 份, 每份约 0.5 片的量, 精密称定, 每份分别精密加入一定量的盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩素对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 2。

表 2 炎可宁片的加样回收试验 ($n=6$)

成分	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
盐酸小檗碱	0.182 3	0.702 1	0.345 6	1.053 1	101.56	101.29	2.34
	0.184 2	0.709 4	0.345 6	1.046 0	97.39		
	0.182 9	0.704 4	0.691 2	1.427 2	104.57		
	0.183 1	0.705 2	0.691 2	1.408 5	101.75		
	0.185 2	0.713 3	1.036 8	1.753 3	100.31		
	0.184 3	0.709 8	1.036 8	1.769 2	102.18		
黄芩苷	0.182 3	2.086 5	1.023 4	3.090 6	98.11	100.30	1.56
	0.184 2	2.108 3	1.023 4	3.148 8	101.67		
	0.182 9	2.093 4	2.046 8	4.146 1	100.29		
	0.183 1	2.095 7	2.046 8	4.123 1	99.05		
	0.185 2	2.119 7	3.070 2	5.260 7	102.31		
	0.184 3	2.119 4	3.070 2	5.190 3	100.35		
汉黄芩素	0.182 3	0.810 9	0.420 2	1.226 5	98.91	100.67	2.11
	0.184 2	0.819 3	0.420 2	1.241 6	100.49		
	0.182 9	0.813 6	0.840 4	1.673 3	102.30		
	0.183 1	0.814 4	0.840 4	1.668 9	101.67		
	0.185 2	0.823 8	1.260 6	2.053 4	97.54		
	0.184 3	0.819 8	1.260 6	2.119 7	103.12		

2.10 样品测定 取不同批号的炎可宁片, 按供试品溶液制备方法处理, 进行 HPLC 分析, 以外标一点法计算盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩素的含量。结果见表 3。

表 3 样品中 3 种成分含量测定 ($n=3$) mg/片

批号	盐酸小檗碱含量	黄芩苷含量	汉黄芩素
100201	1.42	4.22	1.64
100305	0.26	2.41	1.65
100808	0.35	5.06	1.88

3 讨论

3.1 流动相的选择 比较了乙腈-0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g, 再以磷酸调节 pH 4.0), 甲醇-水-磷酸(47:53:0.2), 乙腈-水-磷酸(35:65:0.2)(用三乙胺

调节 pH 3.0)等不同组成的流动相。结果发现对本制剂而言, 选择现正文所用流动相, 待测成分分离较好且峰形较佳。

3.2 最大吸收波长的选择 分别精密称取盐酸小檗碱、黄芩苷、汉黄芩素对照品适量, 加甲醇适量溶解, 在 200~400 nm 波长进行紫外可见分光光度法扫描, 盐酸小檗碱在 265, 343 nm 处有较强吸收, 黄芩苷在 276, 315 nm 波长处有最大吸收, 汉黄芩素在 275 nm 波长处有最大吸收, 由于盐酸小檗碱含量相对较低, 故选用 265 nm 为测定波长, 以提高盐酸小檗碱的检测灵敏度。

3.3 提取溶剂及方法的选择 分别用甲醇或 70% 乙醇加热回流、甲醇-盐酸(100:1)的混合溶液或 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸-80% 甲醇溶液(1:100)超声处理等进行提取考察。结果发现本实验所用溶剂及提取方法最为简便、完全。

[参考文献]

- [1] 卫生部药品标准‘中药成方制剂’第 7 册[S]. 104.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:282, 285, 286.
- [3] 袁梦哲, 李绍峰. 高效液相色谱法测定炎可宁片中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业, 2011, 20(6):35.
- [4] 伊文敏. 高效液相色谱法测定炎可宁片中黄芩苷的含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(6):69.
- [5] 夏方亮, 景艳萍, 傅勇, 等. HPLC 法同时测定炎可宁片中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J]. 中国药品标准, 2006, 7(3):43.
- [6] 韩建伟, 刘颖, 魏元锋, 等. HPLC 法测定痛经膏贴中黄芩苷和汉黄芩素含量研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(8):8.
- [7] 林冬杰, 梁威. HPLC 法测定感冒止咳糖浆中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(8):1044.
- [8] 陈佩, 张文懿, 张学良, 等. 宁夏栽培黄芩中 4 种黄酮类成分的含量比较研究[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(1):18.
- [9] 彭文, 刘兆雄. 四季三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱含量的同时测定[J]. 中国药业, 2011, 20(17):35.
- [10] 王远见, 李清, 赵娟娟, 等. HPLC 法同时测定一清颗粒中黄芩苷等 8 种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(10):807.
- [11] 谢秉湘, 李志梅. 高效液相色谱法同时测定一清颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J]. 海峡药学, 2010, 22(6):52.

[责任编辑 顾雪竹]