

黄连解毒凝胶的定量方法研究

张卫华¹, 聂其霞², 张保献^{2*}

(1. 北京因科瑞斯生物制品研究所, 北京 102209; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立黄连解毒凝胶的定量方法。方法: 采用高效液相色谱法对栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷进行含量测定; 均采用 luna C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 栀子苷流动相乙腈-水(13:87); 盐酸小檗碱流动相乙腈-0.1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄(30:70) 水溶液; 黄芩苷流动相甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)。结果: 黄连解毒凝胶中栀子苷平均含量不少于 0.4%, 平均回收率 97.21%, RSD 1.5%; 盐酸小檗碱平均含量不低于 1.2%, 平均加样回收率 99.11%, RSD 2.45%; 黄芩苷平均含量不低于黄芩苷含量不低于 1.40%, 平均加样回收率 98.74%, RSD 1.60%。结论: 该质量标准可较好控制黄连解毒凝胶质量。

[关键词] 黄连解毒; 凝胶; 栀子苷; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0056-04

Studies on the quality standard of huanglianjiedu hydrogel

ZHANG Wei-hua¹, NIE Qi-xia², ZHANG Bao-xian^{2*}

(1. Beijing Increase Biological Research Institute, Beijing 102209, China;

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Huanglianjiedu Hydrogel. **Method:** The high performance liquid chromatography was developed for the determination the contention of jasmninoidin, berberine and baicalin; Luna C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used in the determination and the mobile phase of jasmninoidin, berberine and baicalin were a mixture of acetonitrile-water(13:87), acetonitrile-0.1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄(30:70), and methanol-water-phosphoric acid(47:53:0.2) respectively. **Result:** The average content of jasmninoidin was no less than 0.4%, and the average recovery and RSD were 97.21% and 1.5% respectively; The average content of berberine was no less than 1.2%, and average recovery and RSD were 99.11% and 2.45% respectively; The average content of jasmninoidin was no less than 1.4%, and the average recovery and RSD were 98.74% and 1.6% respectively; **Conclusion:** This method can be adopted as a standard for the quality control of Huanglianjiedu Hydrogel.

[Key words] Huanglianjiedu; Hydrogel; jasmninoidin; berberine; baicalin; HPLC

黄连解毒凝胶以黄连解毒汤为原处方, 采用现代工艺对黄连解毒汤进行提取精制, 制成用于治疗胃溃疡的口服凝胶, 为更好控制黄连解毒凝胶中有效成分的含量, 建立了栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷的高效液相色谱含量测定方法^[1]。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪: Waters600 泵, Waters-486 紫外可见检测器, Millennium2010 色谱管理软件。超

声波清洗器(KQ-250E)。

磷酸氢二钾为分析纯(北京化学试剂公司), 甲醇为色谱纯(迪马公司), 乙腈(色谱纯, Fisher); 磷酸为分析纯(北京化工厂), 高纯水。

栀子苷对照品, 批号: 0749-200007, 纯度为 99.08%; 黄芩苷对照品, 批号: 0715-9909, 纯度为 98.23%; 盐酸小檗碱对照品, 批号 110713-200208, 纯度为 99.69%, 以上对照品均购于中国药品生物制品检定所。

黄连解毒凝胶, 由北京因科瑞斯生物制品研究所试制。

2 试验方法与结果

[收稿日期] 2009-06-05

[通讯作者] * 张保献, Tel: (010) 84014127; E-mail:

zhangbaoxian925@163.com

2.1 栀子苷含量测定^[2]

2.1.1 检测波长的选择 参照药典条件, 选择 238 nm 为检测波长。

2.1.2 色谱条件 色谱柱 Luna C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (13:87); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 238 nm; 柱温 30 °C; 理论板数 栀子苷峰计算应不低于 1 500, 在此条件下栀子苷峰与其它成分达到基线分离, 见图 1。

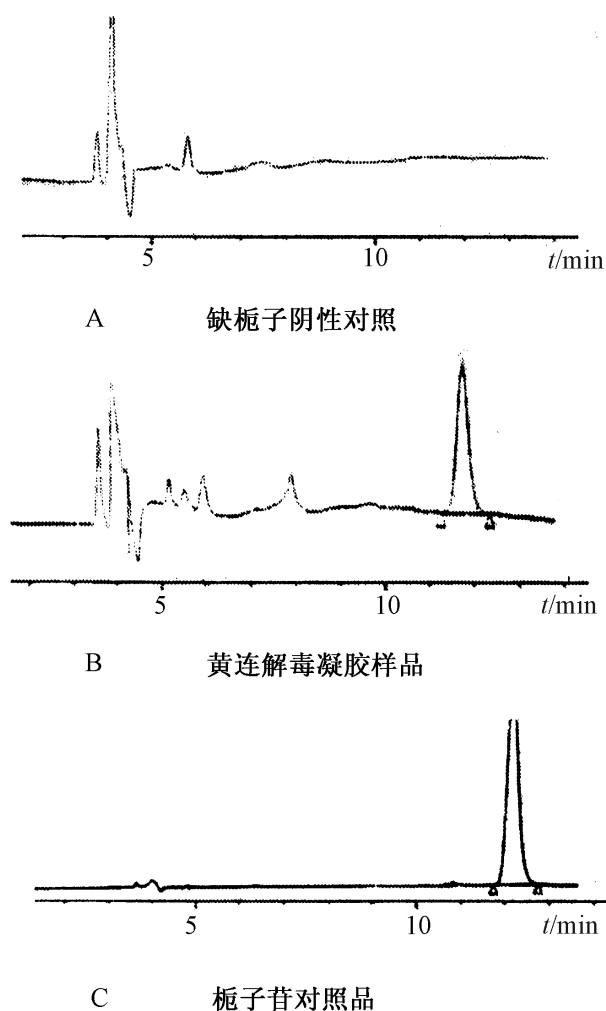


图 1 黄连解毒凝胶栀子苷 HPLC 图

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液, 即得。

2.1.4 供试品溶液的制备 取黄连解毒凝胶约 2 g 精密称定, 置蒸发皿中, 加适量硅藻土拌匀, 60 °C 烘干, 转移至锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 即得。

2.1.5 专属性考察 按处方中药味的比例, 自配不含栀子的群药, 按制剂工艺制成阴性对照制剂, 再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液, 依法测定, 结果表明阴性溶液在与栀子苷对照品相同保留时间处未见明显的色谱峰, 认为无干扰, 表明此法专属性强, 可以作为本品中栀子苷的检测方法。

2.1.6 线性关系考察 分别精密吸取 0.137 mg·mL⁻¹ 栀子苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 每个进样体积进 3 针, 测定峰面积, 以栀子苷进样量 (μg) 为

横坐标 (X), 峰面积 (Y) 为纵坐标, 作图, 得到标准曲线, 并计算回归方程为: $Y = 12\,966X + 260$ ($n = 5$), $r = 0.999\,9$ 。说明栀子苷进样量在 0.27 ~ 1.37 μg, 峰面积和进样量具有良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 同法连续进样 5 次, 测得峰面积积分值 RSD 为 0.86% ($n = 5$)。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 24, 28 h 按上述色谱条件分别测定峰面积, 结果 RSD 为 0.88%, 表明供试品溶液制备后 28 h 内测定结果稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一样品 5 份, 分别精密称定, 依照上述供试品溶液制备方法, 按照上述确定的色谱条件进行测定, 计算含量, RSD 0.42%。结果表明, 重复性较好。

2.1.10 加样回收试验 分别取 5 份样品, 精密称定, 并分别加入 2 mg 左右栀子苷对照品, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 超声 30 min, 放冷, 用甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 按上述色谱条件进行测定, 测得平均回收率 97.21%, RSD 1.5% ($n = 5$), 结果见表 1。

表 1 栀子苷加样回收率测定

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%
0.046 3	2.202 3	2.31	2.252 9	97.53
0.041 9	2.995 0	2.20	2.187 2	99.42
0.060 4	2.875 2	2.99	2.903 0	95.61
0.051 9	2.470 4	2.43	2.384 8	98.14
0.053 7	2.554 0	2.51	2.415 9	96.28

2.2 盐酸小檗碱含量测定^[3]

2.2.1 测定波长的选择 盐酸小檗碱对照品进行全波长扫描, 选择 265 nm 为检测波长。

2.2.2 色谱柱与色谱条件的选择 色谱柱 Luna C₁₈ 柱 (4.60 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ (30:70) 水溶液; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm; 柱温 30 °C; 理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 5 000, 在此条件下盐酸小檗碱与其它成分达到基线分离, 见图 2。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 100 μg 的溶液, 即得。

2.2.4 供试品溶液的制备 取黄连解毒凝胶约 2

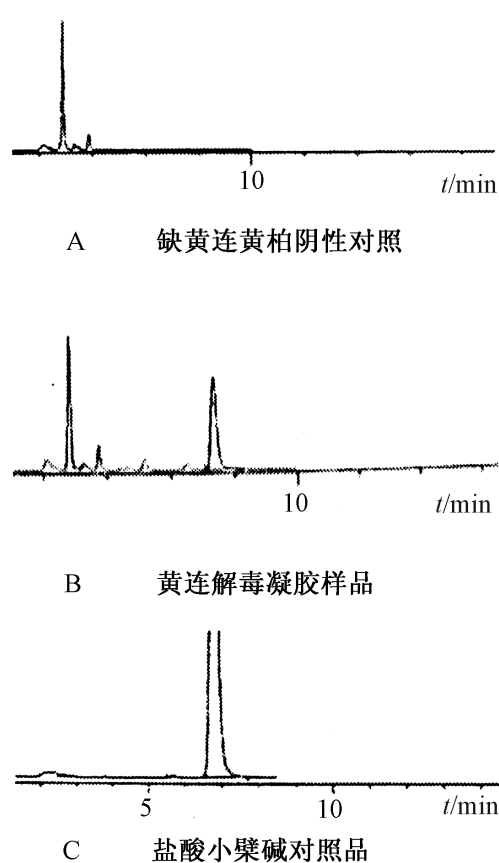


图 2 黄连解毒凝胶盐酸小檗 HPLC 图

g, 精密称定, 置蒸发皿中, 加适量硅藻土拌匀, 60 烘干, 转移至锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀。精密量取 1 mL 上清液, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.5 专属性考察 按处方中药味的比例, 自配不含黄连黄柏的群药, 按制剂工艺制成阴性对照制剂, 再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液, 依法测定, 结果表明阴性溶液在与盐酸小檗碱对照品相同保留时间处未见明显的色谱峰, 认为无干扰, 表明此法专属性强, 可以作为本品盐酸小檗碱的检测方法。

2.2.6 线性关系的考察 分别精密吸取 0.100 7 mg·mL⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液 2、4、6、8、10 μL, 注入高效液相色谱仪, 每个体积进 3 针, 测定峰面积, 得线性回归方程: $Y = 5\,208X - 73$ ($r = 0.999\,9$), 说明在 0.26 ~ 1.3 μg 峰面积和进样量有良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 同法连续进样 5 次, 测得峰面积积分值 RSD 1.01% ($n = 5$)。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、6、24、28 h 按上述色谱条件分别测定峰面积, 结果 RSD 1.1%, 表明供试品溶液制备后 28 h 内测定结果稳定。

2.2.9 重复性实验 取同一样品 5 份, 分别精密称

定, 依照上述供试品溶液制备方法, 按照上述确定的色谱条件进行测定, 计算含量, RSD 0.73%。结果表明, 重复性较好。

2.2.10 加样回收率 分别取 5 份样品, 精密称定, 并分别加入 13 mg 左右盐酸小檗碱对照品, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 超声 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀。精密量取 1 mL 上清液, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。按上述色谱条件进行测定, 测得平均回收率 99.11%, RSD 2.45% ($n = 5$), 见表 2。

表 2 盐酸小檗碱加样回收率测定

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%
0.068 2	15.140 4	13.21	12.974 0	98.21
0.056 0	12.432 0	10.42	10.313 6	98.97
0.070 5	15.651 0	14.15	14.155 4	100.04
0.057 3	12.720 6	12.72	13.038 2	102.48
0.065 4	14.518 8	14.09	13.504 5	95.84

2.3 黄芩苷含量测定^[4]

2.3.1 检测波长的选择 参照药典, 选择 280 nm 为检测波长。

2.3.2 色谱条件 色谱柱 Luna C₁₈ 柱 (4.60 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水-磷酸 (47 53 0.2); 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm; 柱温 30 ; 理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 2 500, 在此条件下黄芩苷峰与其它成分达到基线分离, 见图 3。

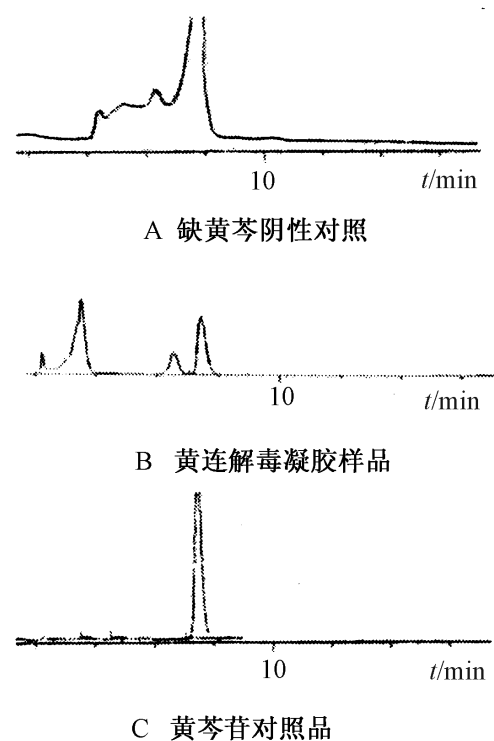


图 3 黄连解毒凝胶黄芩 HPLC 图

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 123 μg 的溶液。

2.3.4 供试品溶液的制备 取黄连解毒凝胶约 2 g 精密称定,置蒸发皿中,加适量硅藻土拌匀,60 烘干,转移至锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀。精密量取 1 mL 上清液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3.5 专属性考察 按处方中药味的比例,自配不含黄芩的群药,按制剂工艺制成阴性对照制剂,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液,依法测定,结果表明阴性溶液在与黄芩苷对照品相同保留时间处未见明显的色谱峰,认为无干扰,表明此法专属性强,可以作为本品黄芩苷的检测方法。

2.3.6 线性关系的考察 分别精密吸取 92 μg/mL 的黄芩苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL,注入高效液相色谱仪,每个体积进 3 针,测定峰面积,得回归方程 $Y=257\ 628X-134\ 718(n=5)$, $r=0.999\ 7$,说明黄芩苷在 0.18 ~0.92 μg 峰面积和进样量有良好的线性关系。

2.3.7 精密度实验 精密吸取同一对照品溶液,同法连续进样 5 次,测定峰面积测得峰面积积分值 RSD 0.86% ($n=5$)。

2.3.8 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 24, 28 h 按上述色谱条件分别测定峰面积,结果 RSD 0.58%,表明供试品溶液制备后 28 h 内测定结果稳定。

2.3.9 重复性实验 取同一样品 5 份,分别精密称定,依照上述供试品溶液制备方法,按照上述确定的色谱条件进行测定,计算含量,RSD 0.67%。结果表明,重复性较好。

表 3 黄芩苷加样回收率测定

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%
0.052 3	12.729 8	11.12	11.231 2	101.00
0.043 6	10.612 2	9.87	9.794 0	99.23
0.045 7	11.123 4	9.99	9.677 3	96.87
0.038 9	9.468 3	8.97	8.873 1	98.92
0.048 9	11.902 3	10.03	9.798 3	97.69

2.3.10 加样回收率 取 5 份样品,分别精密称定,并分别加入 9 mg 左右盐酸小檗碱对照品,置 100 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,超声 30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀。精密量取 1 mL

上清液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。按上述色谱条件进行测定,测得平均回收率 98.74%,RSD 1.60% ($n=5$),结果见表 3。

2.4 3 批样品含量测定

表 4 3 批样品质量分数

No.	小檗碱	黄芩苷	栀子苷
1	1.52	1.62	0.53
2	1.50	1.59	0.55
3	1.48	1.60	0.52

3 讨论

黄连解毒口服凝胶以高分子水凝胶辅料作为基质,属于水性凝胶。由于高分子自身性质,水性凝胶在有机溶剂中易聚团,从而不易把待测成分提取完全,造成测定不准确。黄连解毒口服凝胶中 3 个待测成分在含水较高的系统中易发生沉淀反应,也不能对该制剂进行稀释处理,因此采用黄连解毒口服凝胶和硅藻土拌匀,60 烘干,再进行不同样品制备方法的考察及方法学考察,最后取得黄连解毒口服凝胶中栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷含量测定方法,可较好控制黄连解毒口服凝胶的质量。

对黄连解毒凝胶中栀子苷、盐酸小檗碱、黄芩苷进行了含量测定和一系列方法学考察。分别依次选用 20% 甲醇、甲醇、流动相为提取溶剂进行考察,结果表明用以上 3 个成分用甲醇提取效果最佳,故选定甲醇为提取溶剂。分别依次考察了超声、冷浸、回流提取 3 种提取方法,结果表明选择超声提取即可达到提取率要求,随后分别对超声提取时间进行了选择,最后确定超声提取时间均为 30 min。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000: 248.
- [2] 王廷海 巩士周. 清热解毒口服液中栀子苷的含量测定[J]. 山东医药工业, 2001, 20(4): 13.
- [3] 赵陆华, 蔡星瀛. HPLC 法测定黄连, 黄柏及其中成药中小檗碱型生物碱的含量[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(2): 82.
- [4] 沈嘉, 吴秋媚. HPLC 法比较不同工艺制备的黄连解毒汤及日本汉方黄连解毒汤中黄芩苷含量[J]. 中草药, 1999, 30(2): 102.