

安宫牛黄丸中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱含量测定研究

马群, 艾路*, 刘勇, 刘永刚
(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:建立安宫牛黄丸中同时测定栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱的 HPLC 方法。方法:色谱柱 Zorbax C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 0.5% 磷酸水溶液-乙腈, 采用线性梯度洗脱时间程序; 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C。结果:栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱平均回收率分别为 98.0%, 102%, 101%。结论:该方法简便、快速、灵敏、准确, 在同一色谱检测条件下实现多指标成分同时定量, 为安宫牛黄丸的质量评价和控制提供新的方法。

[关键词] 安宫牛黄丸; 栀子苷; 黄芩苷; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法

安宫牛黄丸是我国传统药物中最负盛名的急症用药, 源于清代温病学家吴鞠通的《温病条辨》, 是中医治疗高热症的“温病三宝”之一。安宫牛黄丸^[1]由牛黄、麝香、黄连、黄芩、栀子等药味组成。主治温病高热、神昏、中风、口眼歪斜、痰涎壅盛。该方疗效独特、临床应用广泛, 为中医抢救急重病的高效首选药^[2]。经查阅文献, 未发现对安宫牛黄丸中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱等多组成分进行质量控制的报道, 本文采用高效液相色谱法同时测定栀子、黄芩和黄连中指标性成分含量以控制制剂质量。

1 材料

岛津公司 LC-10ATyp 高效液相色谱仪, SH-MAD-ZU LC-10A 液相色谱工作站, SPD-M10A 检测器。

甲醇、乙腈 (天津四友生物医学技术开发公司色谱纯); 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯; 栀子苷 (批号 110749-200511)、黄芩苷 (批号 110715-200514)、盐酸小檗碱 (批号 110713-200208) 以上对照品均购自中国药品生物制品检定所。安宫牛黄丸 (同仁堂股份公司制药厂, 批号 501077, 4010228, 4010274)。

2 方法与结果

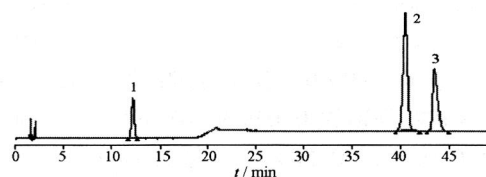
2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 流动相 A 为 0.5% 磷酸水溶液, B 为乙腈, 线性梯度洗脱时间程序见表 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷、黄芩苷

表 1 线性梯度洗脱时间程序

Na	t/min	流速 / mL · min ⁻¹	A / %	B / %
1	0.01	1.00	91.0	9.0
2	16.00	1.00	91.0	9.0
3	18.00	0.90	82.0	18.0
4	50.00	0.90	82.0	18.0
5	52.00	1.00	60.0	40.0
6	60.00	1.00	60.0	40.0

和盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成对照品溶液, 质量浓度分别为 0.020 1, 0.086 8, 0.025 2 g · L⁻¹, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得, 见图 1。



1. 栀子苷; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸小檗碱。

图 1 栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱对照品 HPLC 图

2.3 供试品溶液的制备 取本品约 0.25 g, 剪碎, 研匀, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 称重, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称重, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液, 见图 2。

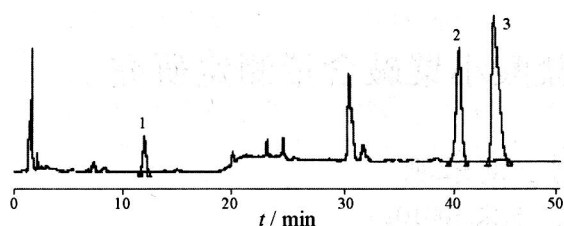
2.4 空白试验 按处方中药味的比例, 自配不含栀子、黄连和黄芩的群药, 按其工艺制成空白制剂, 以样品溶液制备方法制成空白对照溶液并测定, 见图 3, 与样品溶液色谱图比较可以发现, 在待测组分的相应位置无干扰。

2.5 线性关系考察 精密吸取栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱对照品溶液 (0.059 9, 0.086 8, 0.025 2

[收稿日期] 2009-03-26

[基金项目] 北京市科技发展项目 (H040230130710)

[通信作者] * 艾路, 副研究员。Tel: (010) 84738659, E-mail: ai9lu29@163.com



1. 栀子苷; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸小檗碱。

图 2 安宫牛黄丸样品栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱 HPLC 图

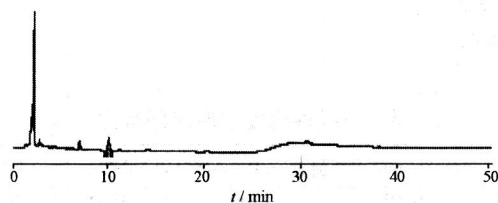


图 3 安宫牛黄丸空白样品 HPLC 图

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算得回归方程: 栀子苷回归方程 $Y = 1.13 \times 10^6 X + 1.68 \times 10^2$, $r = 0.9999$; 黄芩苷回归方程 $Y = 1.14 \times 10^7 X + 2.51 \times 10^4$, $r = 0.9999$; 盐酸小檗碱回归方程 $Y = 4.09 \times 10^7 X + 1.85 \times 10^4$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱分别在 0.059 9 ~ 0.598 5, 0.086 8 ~ 1.736 4, 0.025 2 ~ 0.504 8 μg 线性良好。

2.6 精密度试验 精密吸取安宫牛黄丸同一批号 (5014999) 供试品溶液 5 μL , 重复进样 5 次, 求得样品中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 0.91%, 0.68%, 0.87% ($n = 5$)。

2.7 稳定性试验 精密吸取安宫牛黄丸同一批号 (5014999) 供试品溶液 5 μL , 于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定, 观察供试品溶液稳定性, 样品中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.1%, 0.58%, 0.34% ($n = 6$), 说明供试品溶液 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验 按上述色谱条件对同一批样品 (5014999) 6 份, 进行测定, 求得栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱含量分别为 1.500, 6.592, 3.505 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.1%, 0.68%, 1.9% ($n = 6$)。

2.9 加样回收率试验 采用加样回收法, 精密称取

已知含量的同一批号 (批号 5014999) 的样品 0.125 g, 平行 6 份。分别精密加入栀子苷对照品溶液 ($0.192 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、黄芩苷对照品溶液 ($0.710 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和盐酸小檗碱对照品溶液 ($0.395 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1.0 mL, 测定。栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱平均回收率分别为 98.0%, 102%, 101%, RSD 分别为 1.4%, 1.0%, 1.0% ($n = 6$)。

2.10 样品测定结果 分别取 3 批样品, 依上述色谱条件进行测定, 见表 2。

表 2 安宫牛黄丸样品测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	栀子苷	黄芩苷	盐酸小檗碱
5010077	1.351	6.443	3.717
4010228	1.952	6.523	3.611
4010274	2.021	7.308	3.773

3 讨论

本实验提取溶剂的考察方法为, 分别选取甲醇、70%乙醇、95%乙醇为溶剂, 对同一样品超声提取 30 min, 比较待测化合物的峰面积, 发现采用 70%乙醇和甲醇做提取溶剂对色谱峰峰面积的影响差别不大, 考虑到乙醇无毒, 因此选择 70%乙醇作为提取溶剂; 本实验比较了超声提取、加热回流和冷浸过夜 3 种提取方法, 发现加热回流提取的色谱峰面积与超声提取的色谱峰面积差别不大, 冷浸提取的色谱峰面积较小, 考虑到超声提取简单省事, 因此选择超声提取作为样品溶液的制备方法; 本实验考察了超声 30, 60, 90 min 3 个时间点, 发现超声 30 min 可以把待测组分提取完全, 因此确定超声时间为 30 min。综上, 样品溶液的制备条件为 70%乙醇超声提取 30 min。

本实验应用 PDA 检测器对测定波长进行了考察, 发现栀子苷、黄芩苷的最大吸收不在 254 nm, 但是由于其在制剂中含量比较高并且含量范围比较稳定, 采用 254 nm 作为测定波长能够达到方法学考察的要求。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2005: 247.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知. 中药卷 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 467.

[责任编辑 周驰]