

REFERENCES

- [1] JIN X Y, LI P. Analysis of the utilization of cephalosporins in our hospital [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 6(13): 1206-1207.
- [2] ZHOU Y Q, ZHANG T T. 4th generation broad-spectrum cephalosporins: Research progress in cefoselis [J]. China Pharm(中国药房), 2002, 3(12): 753-754.
- [3] HE W Z, TIAN W Q, JIN C X. Study on the compatible stability of cefoselis sulfate for injection combined with ornidazole and sodium chloride injection [J]. Strait Pharm J(海峡药理学), 2009, 21(11): 14-17.
- [4] LUO S M, TIAN W Q, HUA J Y, et al. Compatible stability of cefoselis mixed with five hemostatics [J]. Herald Med(医药导报), 2010, 29(3): 283-287.
- [5] HUA J Y, YE W H, TIAN W Q. Compatible stability of cefoselis sulfate for injection with vitamin C injection by RP-HPLC [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2011, 27(3): 210-212.
- [6] TIAN W Q, HUA J Y, ZHU Y Y, et al. Stability of cefoselis sulfate for injection in 4 kinds of transfusions [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药理学杂志), 2009, 39(3): 243-244.
- [7] JI H X, WANG Y, SHAO M Z, et al. Stability of cefoselis sulfate for injection in xylitol injection [J]. China Pharm(中国药房), 2009, 20(35): 2761-2762.
- [8] XU J F, XU S D, HE H H. Determination of content of dextran 40 glucose injection by HPLC [J]. China Pharm(中国药理学), 2004, 13(1): 57.
- [9] HUA J Y, ZHU Y Y, TIAN W Q, et al. Determination of concentration of cefoselis in human plasma by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(6): 548-550.

收稿日期: 2011-03-16

HPLC 测定三黄汤中 4 种成分含量

徐璐扬, 李中东, 刘庆丰, 施孝金*, 钟明康(复旦大学附属华山医院临床药理学研究室, 上海 200040)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定三黄汤中 4 种重要活性成分(绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀)的含量。方法 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm), 流动相为 1%醋酸甲醇溶液-1%醋酸溶液梯度洗脱; 检测波长: 329 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。结果 绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的线性范围分别为 0.5~4.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 1$), 0.5~4.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$), 0.5~12.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 3$), 0.3~4.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$)。平均回收率分别为 99.0%(RSD=1.13%), 99.3%(RSD=1.20%), 99.0%(RSD=0.27%), 99.8%(RSD=0.88%)。日内、日间 RSD 均<2%。结论 本方法准确、灵敏、重复性好, 可同时测定三黄汤中 4 种重要化学成分的含量。

关键词: 三黄汤; 高效液相色谱法; 绿原酸; 盐酸药根碱; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)12-1135-04

Determination of Four Components in Sanhuang Decoction by HPLC

XU Luyang, LI Zhongdong, LIU Qingfeng, SHI Xiaojin*, ZHONG Mingkang(Research Division of Clinical Pharmacy, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of four important active components in Sanhuang decoction. **METHODS** An Agilent C₁₈ column (4.6 mm×200 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of 1% acetic acid methanol solution-1% acetic acid by gradient dilution, at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength of 329 nm. **RESULTS** The linear calibration curves of chlorogenic acid, jatrorrhizine hydrochloride, berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride were obtained in the ranges of 0.5–4.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 1$), 0.5–4.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$), 0.5–12.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 3$), 0.3–4.0 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$), respectively. Their average recoveries ($n=3$) for the assay were 99.0%(RSD=1.13%), 99.3%(RSD=1.20%), 99.0%(RSD=0.27%) and 99.8%(RSD=0.88%), respectively. The intra- and inter-day RSDs were all less than 2.0%. **CONCLUSION** This method is accurate, sensitive and suitable for quality control of Sanhuang decoction.

KEY WORDS: Sanhuang decoction; HPLC; chlorogenic acid; jatrorrhizine hydrochloride; berberine hydrochloride; palmatine hydrochloride

作者简介: 徐璐扬, 女, 药师
Tel: (021)32120059; (021)52889381

Tel: (021)52888380 E-mail: luluxin@hotmail.com
E-mail: xiaojin_shi@online.sh.cn

*通信作者: 施孝金, 男, 硕士, 副主任药师, 硕导

三黄汤由黄芪、黄连和茵陈等中药配伍而成，用于治疗早期糖尿病、脂肪肝等代谢综合征。绿原酸是茵陈中的重要活性成分，具有抗氧化、免疫调节、降糖、利胆等多种作用。黄连含有盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀等异喹啉类生物碱，其药理作用广泛，其中抗菌、抗病毒、镇静和降糖作用是临床常用的药理作用。绿原酸和小檗碱的含量测定方法有毛细管电泳法^[1-2]、薄层扫描法^[3-4]、HPLC^[5-6]等。但同时测定绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的方法目前尚未见有报道。为了有效控制该制剂的内在质量，本试验建立了高效液相色谱法同时对三黄方中的这4种成分的含量进行测定，该方法简便易行，重复性好。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪、Waters 2487 型紫外检测器、Millennium³² 液相色谱工作站(美国 Waters 公司); 3K15 型低温高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); JL-60 超声波清洗器(上海金祺实业公司超声电子工程部); Milli-Q Academic 超纯水制造系统(美国Minipore公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号: 0753-200111)、盐酸药根碱对照品(批号: 0733-200005)、盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-200208)、盐酸巴马汀对照品(批号: 110732-200506)和内标阿魏酸对照品(批号: 110773-200611)均由中国药品生物制品检定所提供，纯度均>97%。甲醇(色谱纯)，三黄汤(院内制剂，批号: 090915, 091215, 100315)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液 精密称取绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品 10.0 mg，分别置 10 mL 量瓶中，加少量甲醇溶解并定容，分别制得每 1 mL 含 1 mg 绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的溶液作为对照品溶液。同法配制上述4种成分浓度分别为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品混合溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.2 内标溶液 精密称取阿魏酸对照品 5.0 mg 置 5.0 mL 量瓶中，加水溶解并定容，得 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液；精密吸取 125 μL 储备液置于 5 mL 量瓶，加甲醇定容，得 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作溶液，

4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.1.3 供试品溶液 精密量取三黄汤 100 μL ，加入 50% 甲醇定容至 1 mL，涡旋 30 s，在室温下超声 30 min，离心(10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，10 min，10 $^{\circ}\text{C}$)，精密量取上清液 50.0 μL ，置 5 mL 量瓶定容，即得供试品溶液。

2.1.4 阴性对照液 分别取不含茵陈或黄连的原药，以相同制剂工艺制备，按“2.1.3”项下方法(不加内标)处理，制得不含茵陈或不含黄连的阴性对照液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 200 mm，5 μm)；流动相: 1% 醋酸甲醇溶液(A)-1%醋酸(B)，梯度洗脱，见表 1；检测波长: 329 nm；流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；柱温: 36 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量: 5 μL 。

表 1 梯度洗脱表

Tab 1 The gradient table of HPLC for Sanhuang decoction

t/min	A : B
0~10	19 : 81
10~10.5	19 : 81 $\rightarrow$ 30 : 70
10.5~32	30 : 70
32~33	30 : 70 $\rightarrow$ 19 : 81
33~35	19 : 81

在此色谱条件下，取阴性对照液、对照品混合溶液和供试品溶液分别进样测定，色谱图见图 1。绿原酸、内标(阿魏酸)、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的保留时间分别约为 8, 19, 23, 29, 31 min，理论板数均>3 000，与相邻峰的分度度均>1.5。阴性对照对所测组分无干扰，即本试验条件下，绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀与其他组分分离完全。

2.3 线性曲线

分别精密量取绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀对照品溶液适量，置 5 mL 量瓶中，加入内标溶液 100 μL ，用甲醇定容，制成含绿原酸和盐酸药根碱 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，含盐酸小檗碱 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，含盐酸巴马汀 0.3, 0.6, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。按“2.2”项下色谱条件进行测定，分别以绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀与内标的峰面积比 Y 为纵坐标，浓度 C 为

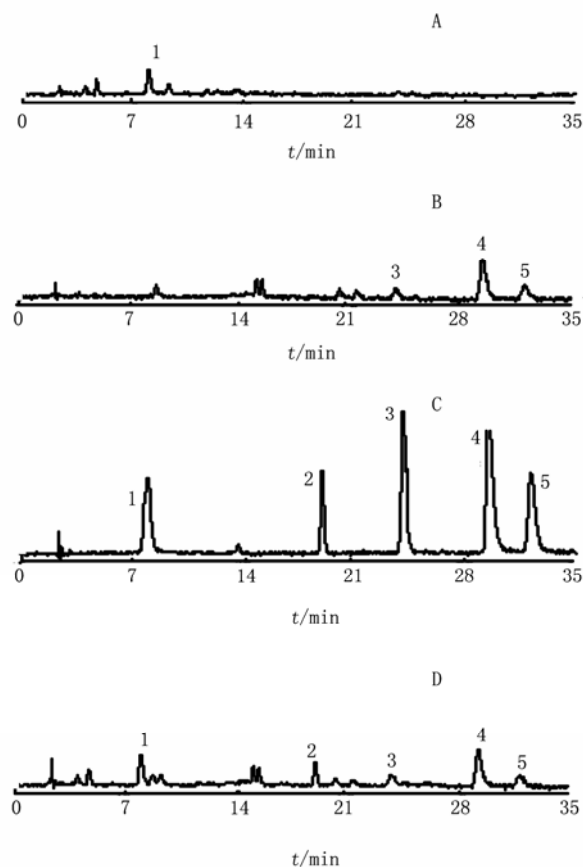


图1 高效液相色谱图

A-无黄连阴性对照品; B-无茵陈阴性对照品; C-对照品溶液; D-供试品溶液; 1-绿原酸; 2-阿魏酸; 3-盐酸药根碱; 4-盐酸小檗碱; 5-盐酸巴马汀

Fig 1 HPLC chromatograms

A-negative sample solution without *Coptis chinensis*; B-negative sample solution without *Artemisia capillaris*; C-the reference substance solution; D-sample solution; 1-chlorogenic acid; 2-ferulic acid; 3-jatrorrhizine hydrochloride; 4-berberine hydrochloride; 5-palmatine hydrochloride

横坐标, 进行线性回归, 得回归方程。绿原酸: $Y=7.54 \times 10^{-1}C+5.75 \times 10^{-2}$, $r=0.9991$; 盐酸药根碱: $Y=9.65 \times 10^{-1}C+1.34 \times 10^{-1}$, $r=0.9997$; 盐酸小檗碱: $Y=4.46 \times 10^{-1}C+1.12 \times 10^{-1}$, $r=0.9993$; 盐酸巴马汀: $Y=8.70 \times 10^{-1}C-9.12 \times 10^{-2}$, $r=0.9999$ 。结果表明绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀分别在 $0.5 \sim 4.0$, $0.5 \sim 4.0$, $0.5 \sim 12.0$, $0.3 \sim 4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ 内线性关系良好。绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的最低检测限分别为 0.3, 0.3, 0.3, $0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($S/N=5:1$)。

2.4 精密度试验

按“2.2”项下色谱条件, 用绿原酸浓度为 0.8, 1.6, $3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, 盐酸药根碱浓度为 0.8, 1.6, 3.2

$\mu\text{g mL}^{-1}$, 盐酸小檗碱浓度为 0.8, 2.4, $9.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, 盐酸巴马汀浓度为 0.5, 1.6, $3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的低、中、高浓度对照品溶液各进样 $5.0 \mu\text{L}$, 每种溶液在 1 d 内测定 5 次, 连续测定 5 d, 计算低、中、高 3 种浓度对照品溶液的日内精密度 ($n=5$) 和日间精密度 ($n=5$)。结果绿原酸低、中、高 3 种浓度的日内 RSD 分别为 0.84%, 0.18%, 0.11%, 日间 RSD 分别为 0.46%, 0.15%, 0.22%; 盐酸药根碱低、中、高 3 种浓度的日内 RSD 分别为 0.39%, 0.89%, 0.11%, 日间 RSD 分别为 0.19%, 0.64%, 0.22%; 盐酸小檗碱低、中、高 3 种浓度的日内 RSD 分别为 0.21%, 0.63%, 0.96%, 日间 RSD 分别为 0.91%, 0.90%, 0.52%; 盐酸巴马汀低、中、高 3 种浓度的日内 RSD 分别为 0.88%, 0.49%, 0.21%, 日间 RSD 分别为 0.45%, 0.34%, 0.12%。

2.5 稳定性试验

取供试品溶液, 在室温下分别于配制后 0, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 计算得绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 0.24%, 1.15%, 0.95% 和 1.25%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

按“2.1”项下方法配制绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀混合对照品溶液和内标溶液, 4°C 保存 0, 4, 8, 12, 24 h, 适当稀释后进样测定, 计算得绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和内标峰面积的 RSD 分别为 1.12%, 1.03%, 1.25%, 0.62% 和 1.22%。表明对照品溶液和内标溶液 4°C 保存, 于 24 h 内稳定。

2.6 回收率试验

精密量取三黄汤(批号: 090915) 1.0 mL , 共 9 份, 分为 3 组, 每组 3 份, 分别精密加入含低、中、高 3 种浓度的绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀对照品溶液各 0.5 mL , 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 测定含量, 计算平均回收率。结果绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀平均回收率分别为 99.0%, 99.3%, 99.0% 和 99.8%, RSD 分别为 1.13%, 1.20%, 0.27% 和 0.88%, 见表 2。

2.7 样品测定

取 3 批三黄汤样品(批号: 090915, 091215, 100315), 按“2.1”项下方法配制供试品溶液, 同时进样对照品溶液, 进样测定, 结果见表 3。

表 2 回收率测定结果

Tab 2 Recovery test of Sanhuang decoction

成分	样品 含量/ μg	加入 量/ μg	测得 量/ μg	回收 率/%	平均 回收率/%	RSD/%
绿原酸	1.958	0.400	2.330	98.8	99.0	1.13
	1.958	0.400	2.310	98.0		
	1.958	0.400	2.346	99.5		
	1.958	0.800	2.753	99.8		
	1.958	0.800	2.780	100.8		
	1.958	0.800	2.762	100.1		
	1.958	1.600	3.508	98.6		
	1.958	1.600	3.526	99.1		
	1.958	1.600	3.433	96.5		
盐酸 药根碱	0.714	0.400	1.126	101.1	99.3	1.20
	0.714	0.400	1.112	99.9		
	0.714	0.400	1.120	100.5		
	0.714	0.800	1.481	97.9		
	0.714	0.800	1.492	98.6		
	0.714	0.800	1.483	98.0		
	0.714	1.600	2.288	98.9		
	0.714	1.600	2.302	99.5		
	0.714	1.600	2.291	99.0		
盐酸 小檗碱	7.106	0.400	7.387	98.4	99.0	0.27
	7.106	0.400	7.450	99.3		
	7.106	0.400	7.400	98.6		
	7.106	1.200	8.293	99.8		
	7.106	1.200	8.151	98.1		
	7.106	1.200	8.288	99.8		
	7.106	4.800	11.779	99.0		
	7.106	4.800	11.792	99.1		
	7.106	4.800	11.736	98.6		
盐酸 巴马汀	1.699	0.250	1.967	100.9	99.8	0.88
	1.699	0.250	1.946	99.9		
	1.699	0.250	1.981	101.6		
	1.699	0.800	2.463	98.6		
	1.699	0.800	2.448	98.0		
	1.699	0.800	2.519	100.8		
	1.699	1.600	3.295	99.9		
	1.699	1.600	3.263	98.9		
	1.699	1.600	3.289	99.7		

表 3 样品的含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Determination results of Sanhuang decoction ($n=3$)

批号	含量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$			
	绿原酸	盐酸药根碱	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀
090915	1.951	0.755	8.618	1.742
091215	1.958	0.715	7.106	1.699
100315	1.972	0.760	7.174	1.662

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法

试验中针对配制供试品溶液的不同提取溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇、10%甲醇和水)及不同提取时间(15, 30, 45, 60, 90 min)分别考察。结果以 50% 甲醇超声处理 30 min, 提取效果最佳, 绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱和盐酸巴马汀的含量均较高, 杂质峰较少。

3.2 检测波长的选择

用紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 对绿原酸、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品溶液进行光谱扫描。结果显示绿原酸在 324, 327 和 329 nm 波长处均有吸收, 盐酸药根碱在 225, 265, 344 nm 处有较大吸收, 盐酸小檗碱在 228, 264, 346 nm 处均有较大吸收峰, 盐酸巴马汀在 226, 272, 344 nm 处有较大吸收, 选用 329 nm 作为检测波长可以同时测定三黄汤中的这 4 种成分, 有效避免其他组分干扰和减小基线波动。

3.3 流动相条件的选择

由于绿原酸与盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀的酸碱性以及极性相差很大, 等梯度洗脱, 总出峰时间>90 min 且易拖尾, 分离效果不理想。经大量试验, 采用梯度洗脱法, 可以改善峰形并且节省分析时间。

REFERENCES

- [1] GONG H Q, WU F H, ZHANG H Y. Determination of baicalein, wogonoside, wogonin and chlorogenic acid in Yinhuang capsules by capillary electrophoresis [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2008, 39(4): 294-296.
- [2] CAI M C, ZHOU H L, WANG Z, et al. Determination of berberine hydrochloride in the skin of trunk and branch of Cortex Phellodendron by capillary electrophoresis [J]. Xibei J Pharm(西北药学杂志), 2010, 25(4): 270-271.
- [3] TONG S S, YU J N, XU X M, et al. Determination of chlorogenic acid of Herba Artemisiae Sopariae extracts and evaluation of its antioxidant activity using TLC-bioautography [J]. China Pharm J(中国药理学杂志), 2009, 44(22): 1738-1741.
- [4] LIU F J, SUN D M, LU J H, et al. Determination of alkaloid from combination of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae by TLCS [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(1): 75-79.
- [5] HUANG X, HUANG X, HUANG J, et al. Simultaneously determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(5): 417-419.
- [6] XIAO P, LI W. Determination of berberine hydrochloride in mixture for burn and scald by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(5): 439-441.

收稿日期: 2010-10-22