

HPLC 同时测定清胃黄连丸中的 4 种有效成分^①

李宝红 吴君^{②a} 邓妙丽 吴劲东

(广东医学院药学院 广东省东莞市 523808)

a(广州中医药大学中药学院 广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号 510006)

摘 要 建立同时测定清胃黄连丸中栀子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀含量的 HPLC 方法。结果表明, 栀子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀分别在 2.07—66.2 μg/mL ($r = 0.9997$)、2.72—86.9 μg/mL ($r = 0.9998$)、2.23—71.3 μg/mL ($r = 0.9998$)、2.13—68.1 μg/mL ($r = 0.9998$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 103.2% (RSD = 3.27%)、106.7% (RSD = 2.46%)、103.5% (RSD = 2.13%)、95.7% (RSD = 2.68%)。该方法简便可行、重现性好、能更好的控制清胃黄连丸的质量。

关键词 清胃黄连丸; 波长切换; 栀子苷; 黄芩苷; 小檗碱; 巴马汀

中图分类号: O657.7+2 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2011)05-2302-04

1 引言

清胃黄连丸(水丸)为由黄芩、黄连、黄柏、栀子、石膏等 14 味中药组成的复方制剂, 具有清胃泻火、解毒消肿之功效, 用于口舌生疮, 牙龈、咽喉肿痛等疾病^[1]。黄芩、黄连、黄柏、栀子均具有清热泻火解毒的功效, 是清胃黄连丸发挥药效的重要物质基础。黄芩苷为黄芩的主要有效成分, 能够镇静、降压、清除自由基、抗心律失常, 能显著促进成纤维细胞增殖, 对人牙周膜成纤维细胞具有保护作用^[2]; 以小檗碱、巴马汀为代表的生物碱为黄连、黄柏的主要有效成分^[3,4], 其中小檗碱对多种革兰氏阳性菌、阴性菌以及真菌、霉菌、病菌、原虫、线虫具有抑制杀灭作用, 巴马汀化学结构和功效类似于小檗碱, 也具有广谱抗菌作用; 栀子苷为栀子的主要有效成分^[5], 具有显著降低谷丙转氨酶, 消退黄疸, 增进食欲和恢复肝功能的作用。笔者认为, 栀子苷、黄芩苷、小檗碱、巴马汀是清胃黄连丸的重要药效物质基础。为了更好的控制该药品的内在质量, 保证临床用药的安全、有效, 本研究选择栀子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀作为清胃黄连丸的质控指标, 采用紫外波长切换的方法对 4 个成分进行同时测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪(四单元数码梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、VWD 检测器, 美国沃特斯公司); Mettler Toledo AX205 十万分之一天平(上海普林斯顿生物科技有限公司); BP121S 万分之一天平(德国塞多利斯公司); KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

① 2008 年广东省科技计划项目(83041)

② 联系人, 手机: (0) 13450487936; E-mail: 625468162@qq.com; gdmcli@126.com

作者简介: 李宝红(1968—), 男, 山西省孟县人, 副研究员, 在读博士, 主要从事药物载体与控制释放的研究工作。

收稿日期: 2010-11-03; 接受日期: 2010-12-01

黄芩苷 (110737-200712)、小檗碱 (110739-200812)、巴马汀 (110767-200712) 和 梔子苷 (110738-200711) 均购于中国药品生物制品检定所;5 批清胃黄连丸为市售品种;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。实验用水为超纯水。

2.2 混合对照品储备液的制备

准确称取黄芩苷 6.13mg、小檗碱 6.27mg、巴马汀 7.69mg、梔子苷 5.81mg,溶于 10mL 甲醇溶液中,得混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取清胃黄连丸,研细,准确称取 3.0g,置于 50mL 具塞锥形瓶中,准确加无水甲醇 50mL,密塞,称重,超声提取 20min,放至室温,称重并用无水甲醇补足减失重量,摇匀,过 0.45μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 实验方法

色谱条件: 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈(4.6×150mm, 5μm, 美国安捷伦公司); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 三乙胺水溶液(磷酸调 pH 至 3.0), 梯度洗脱(0min, 18% A; 6min, 23% A; 11min, 35% A; 15min, 40% A); 检测波长: 0—6min 为 238nm, 6—12min 为 280nm, 12min 后为 345nm; 流速为 1.0mL/min; 柱温为 35℃; 进样量: 10μL。在此色谱条件下各成分分离良好,对照品及供试品溶液色谱图见图 1。

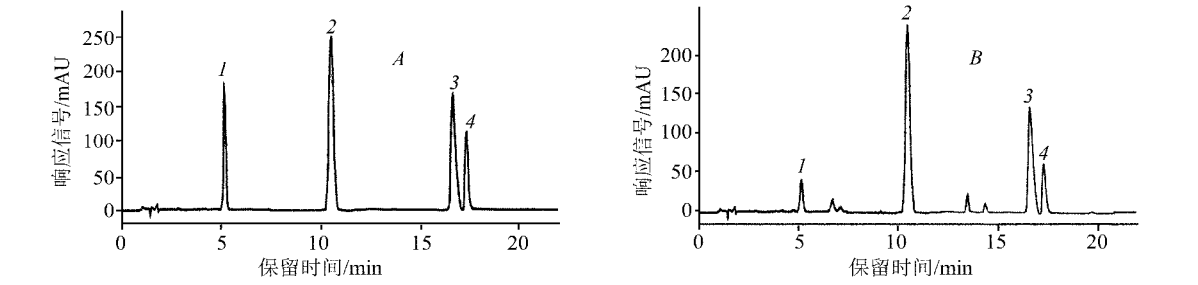


图 1 混合对照品储备液(A) 和供试品溶液(B) HPLC 色谱图
1——梔子苷; 2——黄芩苷; 3——小檗碱; 4——巴马汀。

3 结果与讨论

3.1 线性关系考察

准确移取混合对照品储备液 1.0mL 至 10mL 容量瓶中,加入甲醇定容,摇匀。采用逐级稀释法配制黄芩苷浓度为 2.716、5.431、10.86、21.73、43.45、86.90μg/mL; 小檗碱浓度为 2.228、4.456、8.913、17.83、36.65、71.30 μg/mL; 巴马汀浓度为 2.128、4.256、8.513、17.03、34.05、68.10 μg/mL; 梔子苷浓度为 2.069、4.138、8.276、16.55、33.10、66.21μg/mL 的系列混合对照品溶液。在“2.4”节的色谱条件下进样 10μL,测定峰面积。以各对照品浓度为横坐标(x),以峰面积为纵坐标(y)作线性回归,结果见表 1。

表 1 梔子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀的回归方程及线性范围

化学成分	回归方程	线性范围(μg/mL)	相关系数 r
梔子苷	y= 24414x - 8849.6	2.07—66.2	0.9997
黄芩苷	y= 72894x - 12538	2.72—86.9	0.9998
小檗碱	y= 75339x - 18419	2.23—71.3	0.9998
巴马汀	y= 73155x - 16304	2.13—68.1	0.9998

3.2 精密度实验

取同一混合对照品储备液,连续进样 6 次,测定峰面积。栀子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.40%、0.41%、0.43%,结果表明仪器的精密度良好。

3.3 稳定性实验

取同一供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、10、12h 进样 10μL,测定峰面积。栀子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀峰面积的 RSD 分别为 0.18%、0.29%、0.31%、0.28%,表明供试品溶液在 12h 内基本稳定。

3.4 重现性实验

取同一批号清胃黄连丸粉末(1004241)约 3.0g,准确称取 6 份,按 2.3 节制备供试品溶液,依法测定,计算含量。栀子苷、黄芩苷、小檗碱和巴马汀峰面积的 RSD 分别为3.32%、2.35%、2.24%和 2.24%,结果表明方法的重现性良好。

3.5 回收率实验

取同一批号清胃黄连丸粉末(1004241)约 0.8g,准确称取 6 份,分别置于 50mL 具塞锥形瓶瓶中,准确加入 0.324mg/mL 栀子苷对照品溶液 2.9mL、1.11mg/mL 黄芩苷对照品溶液3.9mL、0.648mg/mL 小檗碱对照品溶液 3.1mL 和 0.438mg/mL 巴马汀对照品溶液 1.6mL,按 2.3 节制备供试品溶液,依法测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 加样回收率测定结果					(n= 6)
成分	样品原含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
黄芩苷	4.32	4.30	8.91	106.7	2.46
小檗碱	2.02	2.00	4.09	103.5	2.13
巴马汀	0.74	0.70	1.41	95.7	2.68
栀子苷	0.95	0.94	1.92	103.2	3.27

3.6 样品的测定

取不同批号的清胃黄连丸,研细,取约 1.5g,按 2.3 节制备供试品溶液,在 2.4 节色谱条件下测定,每批号平行操作两份。以外标法计算清胃黄连丸中各成分的含量,结果见表 3。

表 3 清胃黄连丸含量测定结果					(mg/g, n= 2)
批号	黄芩苷	小檗碱	巴马汀	栀子苷	
0907041	4.01	2.01	0.71	0.91	
0907241	4.12	1.92	0.72	0.89	
0908151	4.16	1.91	0.69	0.88	
0908171	4.11	2.08	0.74	0.92	
0908181	3.98	1.94	0.73	0.94	

3.7 检测波长的确定

小檗碱和巴马汀的最大吸收波长为 345nm,黄芩苷的最大吸收波长为 280nm,栀子苷的最大吸收波长为 238nm。为了达到检测灵敏度高、干扰小的目的,利用可变波长紫外检测器,建立了波长切换高效液相色谱法使不同化合物在各自最大吸收波长下测定,以获得最佳的检测结果。

3.8 供试品制备方法的确定

实验中对影响样品提取效率的主要因素:提取溶剂浓度(50% 甲醇、75% 甲醇、无水甲醇)、提取时间(10、20、30min)和提取溶剂的用量(25、50、100mL),进行了单因素考察。结果表明:无水甲醇

25mL 超声提取 20min 的提取效果较好, 故本实验采用 25mL 无水甲醇作为提取溶剂, 超声提取 20min。

4 结论

本文采用 HPLC-VWD 检测器, 利用监测器波长切换的功能, 对清胃黄连丸中多类化合物进行同时测定, 该方法简便可行、重现性好, 具有较好的推广价值。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国 2010 版药典 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010. 444.
[2] 张喜平, 田华, 程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状[J]. 中国药理学通报, 2003, 11(4): 289—291.
[3] 吴敏, 王阶. 黄连有效成分小檗碱抗动脉粥样硬化机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 18(4): 212—213.
[4] 王萌. 常用中药川黄柏和黄连化学成分及生物活性比较研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
[5] 张占军, 汪丽娅, 王忠等. 黄芩苷、栀子苷及其配伍治疗局灶脑缺血大鼠药效评价及作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 11(9): 145—149.

Simultaneous Determination of Four Active Compounds
in Qingwei Huanglian Pill by HPLC

LI Bao-Hong WU Jun^a DENG Miao-Li WU Jin-Dong

(School of Pharmaceutical, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, P. R. China)
^a(School of Tradition Chinese Medicine, Guangzhou University of T. C. M., Guangzhou 510006, P. R. China)

Abstract A method for simultaneous determination of geniposide, baicalin, berberine and palmatin in Qingwei Huanglian pill b HPLC was established. There were good linear relationship between concentration and peak area in the range of 2.07—66.2μg/mL for geniposide($r = 0.9997$), 2.72—86.9μg/mL for baicalin($r = 0.9998$), 2.23—71.3μg/mL for berberine($r = 0.9998$), 2.13—68.1μg/mL for palmatin($r = 0.9998$), respectively. The average recover of geniposide, baicalin, berberine and palmatin were 103.2%(RSD= 3.27%), 106.7%(RSD= 2.46%), 103.5%(RSD= 2.13%) and 95.7%(RSD= 2.68%), respectively. This method is simple with good reproducibility, and could be used for quality control of Qingwei Huanglian pill.

Key words Qingwei Huanglian Pill; Switching Wavelength; Geniposide; Baicalin; Berberine; Palmatin

欢迎有敬业精神的同志自荐为本刊编委

本刊编委产生的方式有三种: 自荐、推荐和聘请, 自荐是本刊提倡的方式。凡不计报酬、乐意献身于科技期刊出版事业、基本具有副高级以上技术职称、对本刊有所贡献的同志, 都可以自荐为本刊编委。

自荐者, 请将本人简历发至 《光谱实验室》编辑部电子邮箱: gps_s@periodicals.net.cn

《光谱实验室》编辑部