

双波长 HPLC 法测定虎柏烧伤酊中 3 种有效成分

侯林中, 郭丛娟, 张熙洁, 刘晓红*

唐山市工人医院, 河北 唐山 063000

摘要: **目的** 建立虎柏烧伤酊中大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱定量测定方法。**方法** 采用 Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 265 nm (盐酸小檗碱)、306 nm (大黄素和虎杖苷), 柱温 30 ℃。**结果** 大黄素在 6.3~200.0 ng、虎杖苷在 9.6~308.0 ng、盐酸小檗碱在 5.0~160.0 ng 有良好的线性关系, 样品中大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱的平均加样回收率分别为 99.91%、99.51%和 99.16%, RSD 分别为 1.12%、0.84%和 1.17%。**结论** 本法结果准确, 精密度及重复性较好, 可作为虎柏烧伤酊的质量控制方法。

关键词: 虎柏烧伤酊; HPLC; 大黄素; 虎杖苷; 盐酸小檗碱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)20-2932-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.012

Determination of three components in Hubai Burn Tincture by HPLC under double UV wavelengths

HOU Lin-zhong, GUO Cong-juan, ZHANG Xi-jie, LIU Xiao-hong

Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To establish a method for determining the contents of emodin, polydatin, and berberine hydrochloride in Hubai Burrn Tincture. **Methods** The samples were separated on an Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column by a gradient elution using acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The eluate was detected by double wavelengths: 265 nm for berberine hydrochloride and 306 nm for emodin and polydatin. Column teperature was set at 30 ℃. **Results** The linear ranges of emodin, polydatin, and berberine hydrochloride were 6.3—200.0, 9.6—308.0, and 5.0—160.0 ng. The average recovery rates of emodin, polydatin, and berberine hydrochloride were 99.91% (RSD = 1.12%), 99.51 % (RSD = 0.84%), and 99.16% (RSD = 1.17%). **Conclusion** This method is accurate, specific, and reliable for the quality control of Hubai Burrn Tincture.

Key words: Hubai Burn Tincture; HPLC; emodin; polydatin; berberine hydrochloride

虎柏烧伤酊为唐山市工人医院自制中药制剂, 由虎杖、黄柏、松香和冰片组成, 具有清热解毒、活血定痛、收敛生肌的功效, 临床用于 I、II 度烧烫伤。为了保证制剂质量, 便于质量控制, 本研究建立了双波长同时测定虎柏烧伤酊中大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱 3 种有效成分的 HPLC 定量方法。

1 仪器与材料

美国安捷伦公司 1200 系列高效液相色谱仪, G1311A-四元泵, G1322A-脱气机, G1316A-柱温箱, G1329A 自动进样器, G1315D DAD 检测器, HPRev.B.0302 化学工作站; 摩尔纯水机; 德国

Sartorius CP225D 分析天平; 80—2 离心沉淀机, 上海手术器械厂。

对照品大黄素 (批号 110756-200110)、盐酸小檗碱 (批号 110713-200208)、虎杖苷 (批号 111575-200502) 均购自中国食品药品检定研究院; 虎柏烧伤酊样品 (批号 20131018、20131022、20131111、20131216、20131209、20131216、20131221、20140301) 由本院制剂室生产; 色谱纯乙腈, 美国天地公司 (Tedia, Ohio, America); 磷酸, 天津市北方天医化学试剂厂; 超纯水为摩尔纯水机所制。

收稿日期: 2014-05-10

作者简介: 侯林中 (1970—), 男, 主任中药师, 研究方向为中药制备工艺和质量标准研究。Tel: 15176712662 E-mail: 915580685@qq.com

*通信作者 刘晓红, 女, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 主要从事医院药学研究。Tel: 13930520000 E-mail: 13930520000@163.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm, 安捷伦公司); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 15%~30%乙腈; 5~16 min, 30%~85%乙腈; 16~18 min, 85%~15%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 265 nm

(盐酸小檗碱)、306 nm (大黄素和虎杖苷); 柱温 30 ℃; 进样量 5 μL; 理论塔板数按大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱峰计算应均不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取 4.0 mg 大黄素和 6.16 mg 虎杖苷置于 10 mL 量瓶中, 用甲

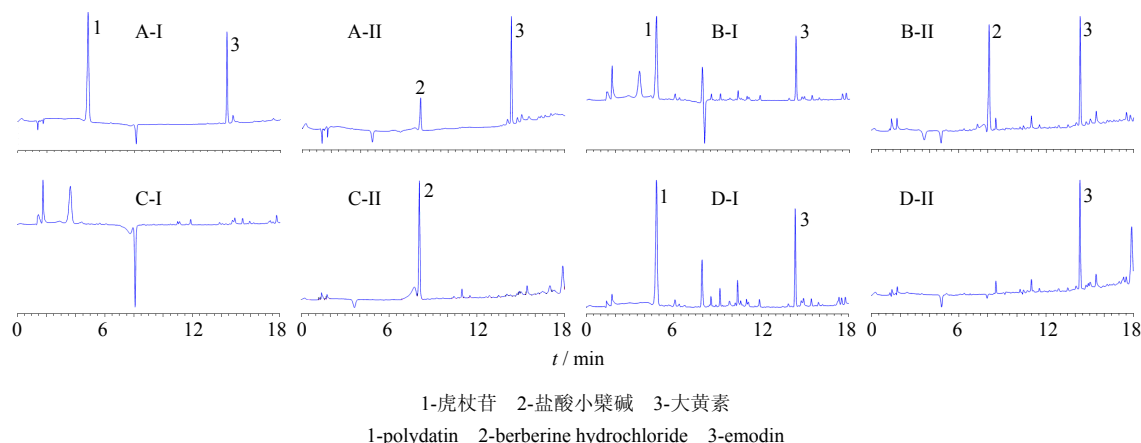


图1 混合对照品 (A)、虎柏烧伤酊样品 (B) 及阴性对照 (缺虎杖, C; 缺黄柏, D) 分别在 306 nm (I) 和 265 nm (II) 处的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixture reference substances (A), Hubai Burn Tincture sample (B), negative control without *Polygonum cuspidatum* (C), and negative control without *Golden cypress* (D) at 306 nm (I) and 265 nm (II)

醇定容, 制成大黄素和虎杖苷贮备液; 精密称取盐酸小檗碱 3.2 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 制成盐酸小檗碱贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取虎柏烧伤酊 1 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 用 0.45 μm 针筒式微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方量分别称取不含虎杖和黄柏的其他药味, 按制剂工艺制成制剂后, 同供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密量取上述贮备液适量, 用甲醇倍比稀释成系列混合标准溶液, 大黄素质量浓度为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 μg/mL; 虎杖苷质量浓度为 1.93、3.85、7.70、15.40、30.80、61.60 μg/mL; 盐酸小檗碱质量浓度为 1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 μg/mL。设定进样量为 5 μL, 以大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱峰面积为纵坐标 (Y), 大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱质量浓度为横坐标 (X)。大黄素标准曲线 $Y=15.949X+2.102$, $r=0.9999$, 线性范围为 6.3~200.0 ng; 虎杖苷标准曲线 $Y=20.15X+11.124$, $r=0.9998$, 线性范围为 9.6~308.0 ng; 盐

酸小檗碱标准曲线 $Y=15.239X+1.1896$, $r=0.9997$, 线性范围为 5.0~160.0 ng。

2.4 干扰试验

分别取缺虎杖和黄柏的阴性对照溶液, 取“2.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 设定进样序列。按“2.1”项下色谱条件操作, 记录色谱图, 供试品色谱图中, 分别与对照品色谱相应的位置上具有相同保留时间的色谱峰, 阴性样品在相应位置上无色谱峰, 表明阴性样品无干扰。

2.5 精密度试验

分别取大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱对照品溶液, 各重复进样 5 次, 测得大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.87%、0.95%、1.26%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取虎柏烧伤酊 (批号 20131221), 分别放置 2、4、6、8、14、24 h 测定峰面积 1 次, 大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 1.84%、2.06% 和 1.89%, 说明供试品溶液在 24 h 内是稳定的。

2.7 重复性试验

取虎柏烧伤酊 (批号 20131221) 适量, 按“2.2.2”

项下方法分别制备供试品溶液 6 份,在上述色谱条件下设定进样量为 5 μL ,根据峰面积按外标法计算质量浓度,结果大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱质量浓度的 RSD 分别为 1.05%、1.10%和 0.93%,表明方法重复性较好。

2.8 回收率试验

精密称取已测定大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱的样品(批号 20131221) 6 份,每份 0.5 mL,分别加入大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱对照品储备液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果平均回收率分别为 99.91%、99.51%、99.16%,RSD 分别为 1.12%、0.84%、1.17%。

2.9 样品测定

取 8 批样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定虎柏烧伤酊中大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱的量。结果见表 1。

3 讨论

本品为中药复方制剂,主要由虎杖、黄柏、松香、冰片等组成。虎杖活血通络、清热利湿;黄柏清热燥湿、泻火解毒,二者为方中主药。大黄素、虎杖苷是虎杖中主要有效成分,盐酸小檗碱是黄柏有效成分成分之一,故本法选定大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱为其测定的指标,用多组分的定量更有效地控制制剂质量,最大程度确保制剂疗效。

由于大黄素脂溶性强,参照文献方法^[1-4]时,洗脱时间较长,本法采用梯度洗脱,加快洗脱速度,节省了实验时间。

目前大多文献报道^[1-5]和《中国药典》2010 年版定量制剂中 2 个以上成分时,多分别测定,操作复杂,测定时间长。本研究采用双波长 HPLC 法同

表 1 样品定量测定结果 ($n=3$)

Table 1 Results of sample determination ($n=3$)

样品批号	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	大黄素	虎杖苷	盐酸小檗碱
20131018	218.8 $\pm$ 3.5	464.5 $\pm$ 0.2	762.4 $\pm$ 2.7
20131022	225.4 $\pm$ 4.1	470.8 $\pm$ 0.7	813.1 $\pm$ 3.4
20131111	212.5 $\pm$ 3.8	432.1 $\pm$ 0.7	788.6 $\pm$ 3.1
20131116	238.0 $\pm$ 1.9	488.1 $\pm$ 0.3	803.2 $\pm$ 1.8
20131209	239.1 $\pm$ 2.9	478.1 $\pm$ 0.6	842.4 $\pm$ 2.4
20131216	240.7 $\pm$ 2.6	488.3 $\pm$ 0.4	845.1 $\pm$ 2.1
20131221	239.4 $\pm$ 2.2	487.9 $\pm$ 0.7	840.5 $\pm$ 2.6
20140301	234.4 $\pm$ 2.1	480.1 $\pm$ 0.3	790.4 $\pm$ 2.4

时测定虎柏烧伤酊中大黄素、虎杖苷和盐酸小檗碱的量,节省测定时间,方便快捷。在双波长下无其他成分干扰,结果准确,精密性及重复性较好,可作为虎柏烧伤酊的质量控制方法。

参考文献

- [1] 蒋 晔,郝晓花,刘红菊. 非水反相液相色谱法测定三黄片中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 中草药, 2005, 36(3): 378-380.
- [2] 吴杰连,方海红. HPLC 测定利胆排石片中大黄酚、大黄素含量的不确定度评定[J]. 中国药师, 2012, 15(7): 1046-1048.
- [3] 田书霞,蒋 晔. RP-HPLC 同时测定三黄片中 4 种有效成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(3): 220-222.
- [4] 傅 予,刘庆焕,王文彤. HPLC 法测定养血生发胶囊中 5 种活性成分[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 188-190.
- [5] 杨 艳. 反相高效液相色谱法测定复方胆通胶囊中大黄酚及大黄素含量[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(1): 45-47.