

HPLC 法测定炎可宁胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚

古炳明¹, 郭伟魁¹, 郑珊珊², 宋 伟^{3*}

1. 梅州市食品药品监督管理局, 广东 梅州 514011

2. 嘉应学院, 广东 梅州 514015

3. 武汉大学人民医院 药学部, 湖北 武汉 430060

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定炎可宁胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。方法 以 Supelco Discovery C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 280 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量为 0.8 mL/min, 进样量 10 μL。结果 6 种成分在各自线性范围内关系良好 ($r^2 \geq 0.999$), 平均加样回收率 99.0%~105.1%, RSD 1.41%~2.36%。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于炎可宁胶囊的质量控制。

关键词: 炎可宁胶囊; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)08-1590-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.08.007

Determination of berberine hydrochloride, baicalin, rhein, emodin, chrysophanol, and emodin methyl ether in Yankening Capsules by HPLC

GU Bing-ming¹, WU Wei-kui¹, ZHENG Shan-na², SONG Wei³

1. Meizhou Institute for Food and Drug Control, Meizhou 514011, China

2. Jiaying University, Meizhou 514015, China

3. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of berberine hydrochloride, baicalin, rhein, emodin, chrysophanol, and emodin methyl ether in Yankening Capsules. **Methods** The Supelco Discovery C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the chromatographic column with mobile phase of methanol - 0.1% phosphoric acid aqueous solution in gradient elution. The detection wavelength was set at 280 nm. The flow rate was 0.8 mL/min and the column temperature was 30 ℃. **Results** The six components had a good relationship within their respective linear ranges ($r^2 \geq 0.999$). The average recovery rate of sample addition was 99.0% — 105.1%, and the RSD was 1.41% — 2.36%. **Conclusion** The method is simple, accurate, reproducible, and can be used for the quality control of Yankening Capsules.

Key words: Yankening Capsules; berberine hydrochloride; baicalin; rhein; emodin; chrysophanol; emodin methyl ether; HPLC

炎可宁胶囊由大黄、黄连、黄柏、板蓝根、黄芩 5 味中药组成, 具有清热泻火、消炎止痢的功效, 临床多用于治疗急性扁桃体炎、急性乳腺炎、中耳炎、肠炎、细菌性痢疾等。炎可宁胶囊的现行标准仅有理化鉴别, 对黄芩苷进行测定^[1]。文献报道采用超高效液相色谱法同时测定炎可宁胶囊中盐酸黄柏碱、黄芩苷、大黄素和大黄酚^[2], 但目前在国内药品检验机构仍以 HPLC 为主, 使该研究的适用

性有限。因此本研究拟采用 HPLC 法同时测定炎可宁胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 6 种成分, 以更全面、方便地对炎可宁胶囊的质量进行控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AB204-N 型万分之一电子分析天平 (梅特勒 - 托利多公司); Sartorius BP 211D 十万分之一电子分

收稿日期: 2021-06-03

作者简介: 古炳明, 主管中药师, 硕士, 主要从事药品检验与质量标准研究。E-mail: 214948130@qq.com

*通信作者: 宋 伟, 博士, 研究方向为医院药学与药物质量控制。E-mail: lianzi87@whu.edu.cn

析天平(赛托利斯公司); LC-2030C3D 型液相色谱仪(日本岛津公司); ULUP-I-10T 型纯水/超纯水机(西安优普仪器设备有限公司); KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

大黄酚(批号 110796-201621, 质量分数以 99.2%计)、大黄酸(批号 110757-201607, 质量分数以 99.3%计)、大黄素(批号 110756-201512, 质量分数以 98.7%计)、大黄素甲醚(批号 110758-201610, 质量分数以 98.6%计)、黄芩苷(批号 110715-201821, 质量分数以 95.4%计)、盐酸小檗碱(批号 110713-201212, 质量分数以 86.7%计)对照品均购自于中国食品药品研究院。炎可宁胶囊(云南白药集团股份有限公司, 规格 0.3 g/粒, 批号 190101; 江西新远健药业有限公司, 规格 0.3 g/粒, 批号 190904; 江西南昌桑海制药厂, 规格 0.3 g/粒, 批号 20190702)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 Supelco Discovery C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱(0~25.00 min, 40%甲醇; 25.01~50.00 min, 40%~85%甲醇; 50.01~60.00 min, 85%~40%甲醇), 检测波长为 280 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量为 0.8 mL/min, 进样量 10 μL。

2.2 对照品储备液的制备

精密称取大黄素、大黄酸、大黄素甲醚对照品各 10 mg, 分别置于 100 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释到刻度, 即得; 精密称取黄芩苷、盐酸小檗碱对照品各 10 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释到刻度, 即得; 精密称取大黄酚对照品 10 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

分别精密吸取各对照品储备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 制成含大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、盐酸小檗碱、黄芩苷 50、10、10、100、100 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取炎可宁胶囊 10 粒, 取内容物研细, 精密称取 0.5 g, 置 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 70%甲

醇, 超声处理 30 min, 用甲醇补充损失的质量滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 阴性对照溶液的制备

按处方比例称取大黄、黄芩、板蓝根适量, 依生产工艺制成缺黄柏、黄连的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制得缺黄柏、黄连的阴性样品溶液。按处方比例, 称取黄柏、黄连、黄芩、板蓝根适量, 依生产工艺制成缺大黄阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制得缺大黄的阴性样品溶液。按处方比例, 称取黄柏、黄连、大黄、板蓝根适量, 依生产工艺制成缺黄芩阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制得缺黄芩的阴性样品溶液。

2.6 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和各阴性对照溶液 10 μL, 进样测定, 结果供试品色谱图中呈现与盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品保留时间相对应的色谱峰且有较好的分离度, 且阴性样品溶液对目的色谱峰无干扰, 见图 1。

2.7 线性关系考察

分别精密吸取各对照品储备液 0.60、0.80、1.00、1.20、1.40、1.60 mL, 分别置于同一 10 mL 量瓶中, 分别进样测定, 记录各自的峰面积。以峰面积对进样量进行线性回归, 得回归方程, 见表 1。

2.8 精密度试验

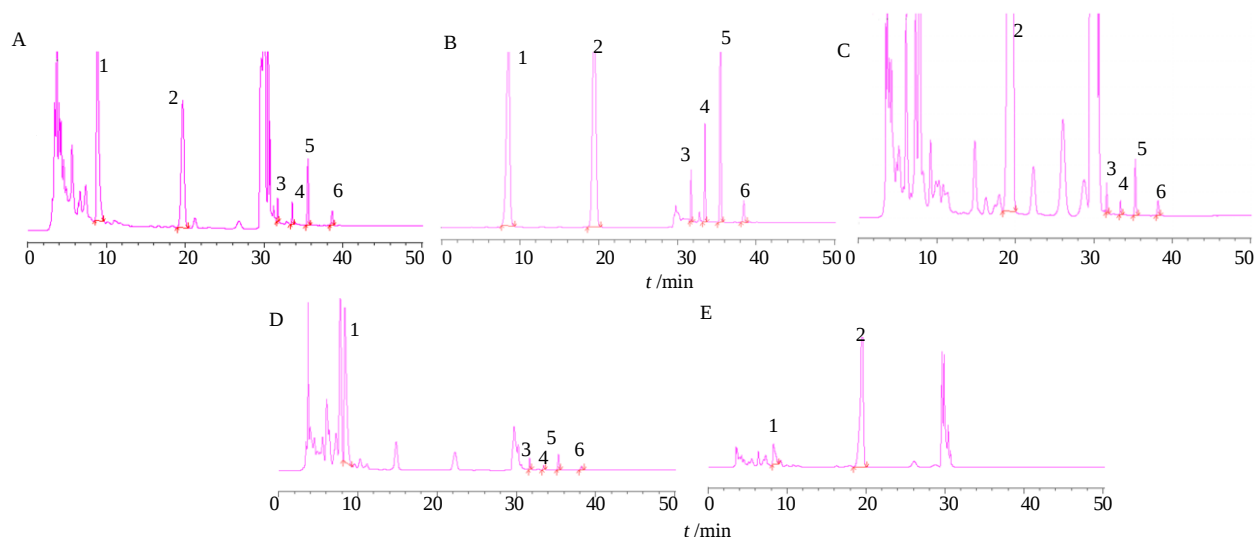
取混合对照品溶液, 连续进样 6 针, 记录各自的峰面积, 根据峰面积计算得盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 0.25%、0.38%、0.36%、0.34%、0.32%、0.52%。

2.9 重复性试验

取批号 190101 炎可宁胶囊样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样测定峰面积, 计算得盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的 RSD 值分别为 1.18%、1.15%、1.01%、0.86%、1.29%、0.94%。

2.10 稳定性试验

取批号 190101 炎可宁胶囊样品, 制备供试品溶液, 在 0、2、4、8、24 h 分别进样测定, 记录峰面积, 计算得盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 0.68%、0.19%、0.91%、1.32%、0.57%、1.39%。



1-盐酸小檗碱 2-黄芩苷 3-大黄酸 4-大黄素 5-大黄酚 6-大黄素甲醚
1-berberine hydrochloride 2-baicalin 3-rhein 4-emodin 5-chrysophanol 6-emodin methyl ether

图 1 炎可宁胶囊供试品 (A)、混合对照品 (B)、缺黄柏和黄连阴性样品 (C)、缺黄芩阴性样品 (D) 和缺大黄阴性样品 (E) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Yankening Capsules test product (A), mixed reference substances (B), negative sample without *Phellodendri Cortex* and *Rhizoma Coptidis* (C), negative sample without *Scutellariae Radix* (D), and negative sample without *Rhei Radix et Rhizoma* (E)

表 1 6 种成分线性关系
Table 1 Linear relationship of six components

成分	回归方程	r^2	线性范围/ μg
盐酸小檗碱	$Y=3\,660.3\,X+10\,535.0$	0.999 8	0.099 4~1.518 7
黄芩苷	$Y=4\,427.5\,X+9\,635.2$	0.999 9	0.098 8~1.490 1
大黄酸	$Y=2\,321.7\,X-1\,169.7$	0.999 9	0.010 2~0.150 6
大黄素	$Y=5\,254.9\,X-3\,314.0$	0.999 8	0.010 4~0.151 0
大黄酚	$Y=2\,921.6\,X+4\,145.3$	0.999 9	0.052 9~0.773 6
大黄素甲醚	$Y=1\,567.0\,X+23\,831.0$	0.999 2	0.012 1~0.151 8

2.11 回收率试验

取 6 份批号 190101 炎可宁胶囊样品,精密称取约 0.25 g,分别精密加入混合对照品溶液(分别含盐酸小檗碱 51.09 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 47.33 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酸 16.03 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素 15.71 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酚 23.94 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚 13.96 $\mu\text{g/mL}$) 1.0 mL,制备供试品溶液,进样测定各成分的峰面积,计算得盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 105.10%、100.10%、95.90%、99.00%、99.01%、102.05%,

RSD 值分别为 1.41%、2.14%、2.36%、2.21%、2.15%、1.65%。

2.12 样品的测定

取 3 个不同厂家生产的炎可宁胶囊,分别制备供试品溶液,进样测定,根据标准曲线法计算各成分的质量分数,结果见表 2。由表中数据可知,不同厂家生产的炎可宁胶囊产品中盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄蒽醌类成分的含量差异较大。由于现行标准中没有相关质量控制要求,炎可宁胶囊的质量难以达到规范统一。

表 2 炎可宁胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚测定结果 ($n=6$)Table 2 Determination of berberine hydrochloride, baicalin, rhein, emodin, chrysophanol, and emodin methyl ether in Yankening Capsules ($n=6$)

批号	质量分数/(mg g ⁻¹)					
	盐酸小檗碱	黄芩苷	大黄素	大黄酚	大黄酸	大黄素甲醚
20190702	7.57	2.30	0.13	1.13	0.17	0.53
190901	12.80	2.53	0.06	0.20	0.36	0.10
190904	5.03	1.17	0.30	1.50	0.50	0.57

3 讨论

3.1 流动相选择的考察

本研究曾参照高洪琳等^[3]的色谱条件进行分析,结果显示色谱峰的状态不稳定且各色谱峰的分度度较低。参考姜范成等^[4]测定炎可宁片中盐酸小檗碱的含量时所采用的色谱条件,以乙腈-0.1%磷酸溶液(50:50)为流动相进行色谱分析,结果盐酸小檗碱和黄芩苷对照品分别出现 2 个色谱峰且两者在此色谱条件下的保留时间十分相近,无法有效分离,后续在此基础上通过改变流动相的比例和体积流量后达到较好的分离效果。

3.2 检测波长的考察

通过 DAD 分析显示蒽醌类在 254 nm 处有最大吸收,盐酸小檗碱在 345 nm 处有最大吸收、黄芩苷最大吸收波长为 280 nm,在 280 nm 时各色谱峰峰形均较佳,塔板数在 3 000 以上,故选择 280 nm 最为检测波长。

3.3 提取方法的考察

本研究对比了超声和回流两种提取工艺及不同提取时间、不同溶剂体积分数对各有效成分提取

率的影响。结果表明最佳提取条件为 70%甲醇超声提取 30 min,既能满足提取率的要求,又能节省时间和资源能耗。

本研究采用 HPLC 法同时测定炎可宁胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚,方法简便准确,重复性好,可用于炎可宁胶囊的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理总局国家药品标准 YBZ12082005-2009Z-2 [S]. 2009.
- [2] 张建华, 苏 晶, 陈 卓. 超高效液相色谱法测定炎可宁胶囊中 4 组分含量 [J]. 中国药业, 2017, 26(17): 17-20.
- [3] 高洪琳, 刘小兵, 肇鑫宇, 等. RP-HPLC 法同时测定炎可宁片中 6 种成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(11): 885-890.
- [4] 姜范成, 季 雪, 于远洋, 等. HPLC 法测定炎可宁片中盐酸小檗碱的含量 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(27): 94-95.

[责任编辑 解学星]