

# HPLC法同时测定白蒲黄片中5种成分的含量

崔俊凤\*,于志华,刘晓鹏(滨州市食品药品检验检测中心,山东滨州 256600)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-3007-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.36

**摘要** 目的:建立同时测定白蒲黄片中白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agela Technologies Venusil XBP C<sub>18</sub>(L),流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长为203 nm(白头翁皂苷B<sub>1</sub>)和323 nm(咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱检测进样量线性范围分别为0.081 41~8.141 μg( $r=0.999\ 8$ )、0.018 71~1.871 μg( $r=0.999\ 4$ )、0.037 33~3.733 μg( $r=0.999\ 2$ )、0.028 85~2.885 μg( $r=0.999\ 6$ )、0.027 58~2.758 μg( $r=0.999\ 7$ );定量限分别为0.009、0.006、0.008、0.011、0.013 ng,检测限分别为0.030、0.020、0.025、0.034、0.036 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.39%~102.34%(RSD=1.81%, $n=6$ )、96.77%~98.92%(RSD=0.85%, $n=6$ )、97.38%~103.72%(RSD=2.46%, $n=6$ )、96.73%~102.01%(RSD=2.22%, $n=6$ )、96.47%~101.07%(RSD=1.61%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于白蒲黄片中白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法;白蒲黄片;白头翁皂苷B<sub>1</sub>;咖啡酸;黄芩苷;盐酸巴马汀;盐酸小檗碱;含量

## Simultaneous Determination of 5 Components in Baipuhuang Tablets by HPLC

CUI Junfeng, YU Zhihua, LIU Xiaopeng (Binzhou Center for Food and Drug Control, Shandong Binzhou 256600, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of pulchinenoside B<sub>1</sub>, caffeic acid, baicalin, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in Baipuhuang tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination of Agela Technologies Venusil XBP C<sub>18</sub>(L) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05 mol/L monopotassium phosphate (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelengths were set at 203 nm (pulchinenoside B<sub>1</sub>) and 323 nm (caffeic acid, baicalin, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride). The column temperature was set at 30 ℃, and the sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 0.081 41-8.141 μg for pulchinenoside B<sub>1</sub>( $r=0.999\ 8$ ), 0.018 71-1.871 μg for caffeic acid ( $r=0.999\ 4$ ), 0.037 33-3.733 μg for baicalin ( $r=0.999\ 2$ ), 0.028 85-2.885 μg for palmatine hydrochloride ( $r=0.999\ 6$ ) and 0.027 58-2.758 μg for berberine hydrochloride ( $r=0.999\ 7$ ). The limits of quantitation were 0.009, 0.006, 0.008, 0.011, 0.013 ng, respectively. The limits of detection were 0.030, 0.020, 0.025, 0.034, 0.036 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries were 97.39%-102.34% (RSD=1.81%, $n=$

动相。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,适用于小儿清咽颗粒中5种成分含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 117、170、352.
- [2] 国家药典委员会.卫生部药品标准中药成方制剂:第六册[S]. 1992:23.
- [3] 陈苑林,叶芳.高效液相色谱法测定小儿清咽颗粒中绿原酸的含量[J].中国中医药现代远程教育, 2009, 7(10): 40-41.
- [4] 方铁铮,黎志坚,谭银合.高效液相色谱法测定小儿清咽颗粒中哈巴俄苷的含量[J].中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8):20-22.
- [5] 胡艳红,李志浩.HPLC测定小儿清咽颗粒中靛蓝和靛玉

红的含量[J].现代仪器与医疗, 2013, 19(4):58-61.

- [6] 杨志一,王汉平.HPLC法测定小儿清咽颗粒中牛蒡苷的含量[J].中国药师, 2006, 9(1):44-45.
- [7] 张晓南,毛云宏,游燕,等.小儿清咽颗粒中青黛的薄层色谱鉴别研究[J].中国民族民间医药, 2015, 24(22):21-22.
- [8] 林世和,易艳东,肖宏,等.HPLC法同时测定白英叶中绿原酸、咖啡酸及芦丁的含量[J].中国药师, 2011, 14(1): 43-45.
- [9] 白云娥,袁鹏飞,王庆辉,等.HPLC-UV波长转换法测定玄参药材及饮片中哈巴昔与哈巴俄苷的含量[J].中国中药杂志, 2011, 36(19):2697-2702.
- [10] 李超,董自波,蒋金来,等.HPLC法测定蒲公英中菊苣酸、咖啡酸与绿原酸[J].中草药, 2015, 46(23):3577-3580.
- [11] 孙业成,李亚荣.高效液相色谱法测定利咽灵片中哈巴俄苷的含量[J].中国药师, 2007, 10(12):1223-1224.

(收稿日期:2017-01-19 修回日期:2017-04-04)

(编辑:刘柳)

\* 主管中药师。研究方向:药品检验检测和质量标准。电话:0543-8176988。E-mail:yjcsjf@163.com

6), 96.77% -98.92% (RSD=0.85%, n=6), 97.38% -103.72% (RSD=2.46%, n=6), 96.73% -102.01% (RSD=2.22%, n=6) and 96.47% -101.07% (RSD=1.61%, n=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducibility, and can be used for simultaneous determination of pulchinoside B<sub>1</sub>, caffeic acid, baicalin, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in Baipuhuang tablet.

**KEYWORDS** HPLC; Baipuhuang tablets; Pulchinoside B<sub>1</sub>; Caffeic acid; Baicalin; Palmatine hydrochlorid; Berberine hydrochloride; Content

白蒲黄片主要由白头翁、蒲公英、黄芩和黄柏4味中药材组成,具有清热燥湿、解毒凉血的功效,主要用于大肠湿热、热毒壅盛所致的痢疾、泄泻,症见里急后重、便下脓血;肠炎、痢疾见上述证候者<sup>[1]</sup>。白蒲黄片收载于2015年版《中国药典》(一部)<sup>[2]</sup>,只规定了黄芩苷的含量测定项,不能全面地控制该制剂的质量,因此笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定该制剂中4种中药材的主要成分白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Technologies-1260型HPLC仪,包括二极管阵列检测器、G1329B自动进样器、chenstation色谱工作站(美国Agilent公司);MS105型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);JK-600DH型恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:600 W,频率:45 kHz);TGL-18000-CR型高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

### 1.2 药品与试剂

白蒲黄片(哈尔滨蒲公英药业有限公司,批号:160414、160620、160812,规格:0.3 g/片);白头翁皂苷B<sub>1</sub>对照品(批号:111766-200601,纯度:100%)、咖啡酸对照品(批号:110885-201002,纯度:100%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201318,纯度:93.3%)、盐酸巴马汀对照品(批号:110732-201510,纯度:87.4%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:86.7%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agela Technologies Venusil XBP C<sub>18</sub> (L) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 15.0% A;

20~25 min, 15.0% → 23.0% A; 25~53 min, 23.0% A; 53~54 min, 23.0% → 15.0% A; 54~60 min, 15.0% A);流速:0.8 mL/min;检测波长:203 nm(白头翁皂苷B<sub>1</sub>)和323 nm(咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱);柱温:30 °C;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品各20.352 5、4.677 5、10.002 4、8.251 0、7.953 6 mg,置于同一25 mL量瓶中,加50%甲醇溶液溶解并定容,摇匀,制成白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱质量浓度分别为0.814 1、0.187 1、0.373 3、0.288 5和0.275 8 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品10片,除去糖衣,精密称定,研细,取约0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加50%甲醇溶液50 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,加50%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,在4 °C下,以半径为5 cm、8 000 r/min离心10 min,吸取上清液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺,制备缺白头翁、蒲公英、黄芩、黄柏的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

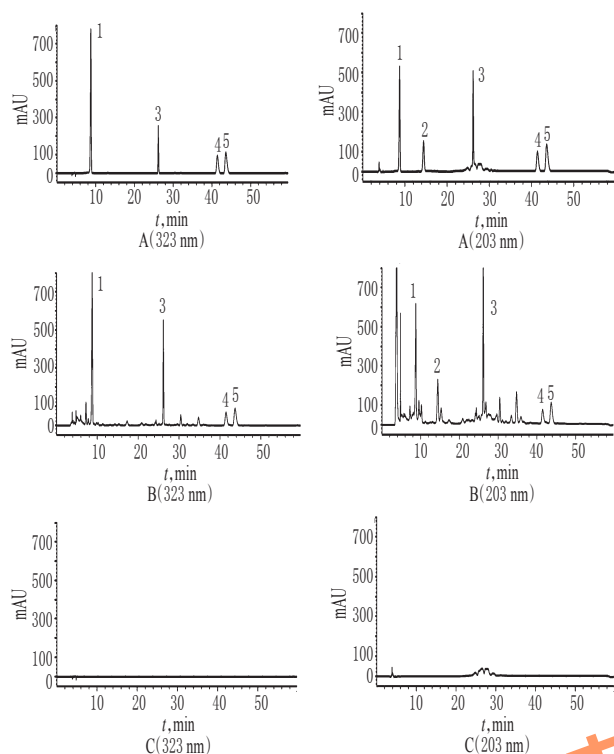
### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>2.0;对称因子在0.95~1.05,理论板数以黄芩苷峰计为147 548,保留时间为26.13 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.05、0.1、0.5、2.5、5.0 mL,分别置于5 mL量瓶中,加50%甲醇溶液定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的进样量(x, μg)为横坐

标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。



A.混合对照;B.供试品;C.阴性对照;1.咖啡酸;2.白头翁皂苷B<sub>1</sub>;3.黄芩苷;4.盐酸巴马汀;5.盐酸小檗碱

A.mixed control;B.test samples;C.negative control;1.caffeic acid;2.pulsatilla saponins B<sub>1</sub>;3.baicalin;4.palmatine hydrochloride;5.berberine hydrochloride

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
白头翁皂苷B <sub>1</sub>	y=304.88x-9.65	0.999 8	0.081 41~8.141
咖啡酸	y=3 529.21x+23.26	0.999 4	0.018 71~1.871
黄芩苷	y=6 412.41x-15.84	0.999 2	0.037 33~3.733
盐酸巴马汀	y=5 497.86x+6.75	0.999 6	0.028 85~2.885
盐酸小檗碱	y=5 837.26x+28.13	0.999 7	0.027 58~2.758

## 2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的LOQ分别为0.009、0.006、0.008、0.011、0.013 ng, LOD分别为0.030、0.020、0.025、0.034、0.036 ng。

## 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件下连续进样测定6次,记录峰面积。结果,白头

翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为0.61%、0.93%、0.67%、0.76%和0.42%(n=6),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160414)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为0.75%、0.81%、0.94%、0.83%和0.97%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

## 2.8 重复性试验

取样品(批号:160414)适量,除去糖衣,精密称定,研细,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量平均值分别为20.132 4、0.256 3、3.256 2、1.542 6、2.547 6 mg/片,RSD分别为0.57%、1.35%、0.93%、0.87%和0.97%(n=6),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取样品(批号:160414)适量,除去糖衣,精密称定,研细,共6份,各置于50 mL具塞锥形瓶中,加入一定质量的白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,除去糖衣,精密称定,研细,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

2015年《中国药典》(一部)中白头翁皂苷B<sub>1</sub>的检测波长为203 nm,咖啡酸为323 nm,黄芩苷为315 nm,而盐酸巴马汀和盐酸小檗碱在348 nm波长附近有最大吸收。后4个成分的检测波长相近,通过预试验发现,在323 nm波长处吸收均较好且干扰较少,因此最终确定本试验的检测波长为203 nm(白头翁皂苷B<sub>1</sub>)和323 nm(咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱)<sup>[2-6]</sup>。

### 3.2 流动相的选择

分别考察了甲醇-0.1%磷酸溶液<sup>[7]</sup>、乙腈-水<sup>[8]</sup>、乙腈-0.1%磷酸溶液<sup>[9]</sup>和乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶



表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
白头翁皂苷 B <sub>4</sub>	0.256 3	16.840 5	15.231 6	31.962 4	99.28	99.76	1.81
	0.251 4	16.518 6	15.231 6	32.106 6	102.34		
	0.253 8	16.676 3	15.231 6	31.684 0	98.53		
	0.258 1	16.958 8	15.231 6	32.152 3	99.75		
	0.254 7	16.735 4	15.231 6	31.569 5	97.39		
	0.255 6	16.794 5	15.231 6	32.216 5	101.25		
咖啡酸	0.256 3	0.137 5	0.148 5	0.282 3	97.51	97.90	0.85
	0.251 4	0.134 9	0.148 5	0.281 8	98.92		
	0.253 8	0.136 2	0.148 5	0.280 7	97.31		
	0.258 1	0.138 5	0.148 5	0.282 2	96.77		
	0.254 7	0.136 6	0.148 5	0.282 7	98.38		
	0.255 6	0.137 1	0.148 5	0.283 4	98.52		
黄芩苷	0.256 3	2.723 8	2.623 5	5.395 3	101.83	100.07	2.46
	0.251 4	2.671 7	2.623 5	5.249 0	98.24		
	0.253 8	2.697 2	2.623 5	5.252 0	97.38		
	0.258 1	2.742 9	2.623 5	5.387 7	100.81		
	0.254 7	2.706 8	2.623 5	5.288 8	98.42		
	0.255 6	2.716 3	2.623 5	5.437 4	103.72		
盐酸巴马汀	0.256 3	1.290 4	1.235 4	2.495 3	97.53	99.25	2.22
	0.251 4	1.265 7	1.235 4	2.520 0	101.53		
	0.253 8	1.277 8	1.235 4	2.511 0	99.82		
	0.258 1	1.299 4	1.235 4	2.494 4	96.73		
	0.254 7	1.282 3	1.235 4	2.542 5	102.01		
	0.255 6	1.286 8	1.235 4	2.496 1	97.89		
盐酸小檗碱	0.256 3	2.131 0	2.096 7	4.198 8	98.62	98.72	1.61
	0.251 4	2.090 3	2.096 7	4.135 8	97.56		
	0.253 8	2.110 2	2.096 7	4.229 3	101.07		
	0.258 1	2.146 0	2.096 7	4.227 6	99.28		
	0.254 7	2.117 7	2.096 7	4.140 4	96.47		
	0.255 6	2.125 2	2.096 7	4.208 3	99.35		

表3 样品含量测定结果(n=3, mg/片)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=3, mg/tablet)

样品批号	白头翁皂苷 B <sub>4</sub>		咖啡酸		黄芩苷		盐酸巴马汀		盐酸小檗碱	
	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %
160414	20.132 4	0.52	0.256 3	0.94	3.256 2	0.75	1.542 6	0.83	2.547 6	0.84
160620	19.452 7	0.37	0.241 5	0.97	3.102 4	0.69	1.456 3	0.91	2.462 5	0.76
160812	19.201 3	0.49	0.250 4	0.89	3.028 7	0.74	1.478 5	0.76	2.498 3	0.79

液<sup>[10]</sup>为本试验的流动相时对色谱的影响。结果, 甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时, 咖啡酸的分离度和对称性不符合要求; 乙腈-水为流动相进行梯度洗脱时, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱出现拖尾现象; 乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时, 白头翁皂苷 B<sub>4</sub>出现拖尾现象; 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相进行梯度洗脱时, 各色谱峰的分离度均较好。因此, 本试验选择乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相。

### 3.3 超声处理时间的考察

本试验还比较了超声处理时间(15、30、45 min)对提取率的影响, 结果发现, 超声处理 30 min 和 45 min 时的样品提取率相差不大, 均大于 15 min 时的样品提取率。综合考虑时间等因素, 最终确定超声处理时间为 30 min<sup>[11]</sup>。

综上所述, 本方法操作简便、结果准确、重复性好, 可用于白蒲黄片中白头翁皂苷 B<sub>4</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 金苗苗, 曹亮, 杜英峰, 等. HPLC-MS 法同时测定白蒲黄片中 7 种五环三萜皂苷类化学成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6):986-988.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 104、301-302、305、352-353、797-798.
- [3] 冯果, 刘文, 冯勇. 复方白头翁汤结肠缓释片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):81-85.
- [4] 姚志红, 王其意, 韦卓纯, 等. 超高效液相色谱法同时测定肿节风中 6 个成分的含量[J]. 分析测试学报, 2016, 35(6):641-647.
- [5] 何海雁, 张叶, 刘宏明. HPLC 法同时测定小儿解表颗粒中绿原酸、咖啡酸、葛根素、大豆苷的含量[J]. 药学研究, 2016, 35(4):214-216.
- [6] 赵焕霞, 高山. 连蒲双清片中咖啡酸含量测定的研究[J]. 中医学报, 2008, 23(5):37-38.
- [7] 杨立志, 杨瑞英, 姜雪敏. HPLC 法测定双黄连颗粒中连翘苷含量[J]. 中国药事, 2010, 24(8):754-755.
- [8] 宋丽丽, 曹颖, 李晓霞, 等. 应用 HPLC 对复方一清颗粒中黄芩苷含量测定方法的改进[J]. 实验室科学, 2015, 18(2):10-13.
- [9] 丁晴, 徐德然. HPLC 法同时测定黄柏中盐酸药根碱、盐酸巴马汀及盐酸小檗碱的含量[J]. 西北植物学报, 2004, 24(11):2143-2145.
- [10] 邓六勤, 钟鸣. RP-HPLC 法测定黄连上清片中盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(16):1514-1516.
- [11] 杨燕飞. RP-HPLC 同时测定坤泰胶囊中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量[J]. 中成药, 2010, 32(6):958-960.

(收稿日期:2016-10-28 修回日期:2017-02-24)

(编辑:刘 柳)