

HPLC法同时测定金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素的含量^Δ

黄传俊^{1,2*},梅勇^{3#},杨莉³,罗磊³,曾博程³,龙涛³,袁开超³,谯志文³,陈小雪³(1.湖北省中医院药事部,武汉 430061;2.湖北省中医药研究院,武汉 430074;3.重庆思科药物研究所有限公司,重庆 401520)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)12-1621-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.12.09

摘要 目的:建立同时测定金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil BDS C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺(50:30:19:1, V/V/V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为265 nm(盐酸小檗碱)、280 nm(黄芩苷)、322 nm(蛇床子素),柱温为30℃,进样量为10 μL。结果:盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素检测进样量线性范围分别为80~800 ng($r=0.999\ 8$)、60~600 ng($r=0.999\ 9$)、60~600 ng($r=0.999\ 6$);定量限分别为80、60、60 ng,检测限分别为24、20、20 ng;中间精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%;加样回收率分别为97.4%~98.3%(RSD=0.33%, $n=6$)、98.4%~99.6%(RSD=0.42%, $n=6$)、96.9%~99.0%(RSD=0.92%, $n=6$);耐用性试验的RSD均小于1.2%。结论:该方法操作简便、准确,精密性、稳定性、重复性、耐用性好,可用于金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素含量的同时测定。

关键词 金蝉止痒胶囊;高效液相色谱法;盐酸小檗碱;黄芩苷;蛇床子素;含量测定

Simultaneous Determination of the Content of Berberine Hydrochloride, Baicalin and Osthole in Jinchan Zhiyang Capsules by HPLC

HUANG Chuanjun^{1,2}, MEI Yong³, YANG Li³, LUO Lei³, ZENG Bocheng³, LONG Tao³, YUAN Kaichao³, QIAO Zhiwen³, CHEN Xiaoxue³ (1. Dept. of Pharmaceutical Affair, Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan 430061, China; 2. Hubei Institute of TCM, Wuhan 430074, China; 3. Chongqing CISCO Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Chongqing 401520, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of the content of berberine hydrochloride, baicalin and osthole in Jinchan zhiyang capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed in Hypersil BDS C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid-three triethylamine (50:30:19:1, V/V/V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 265 nm (berberine hydrochloride), 280 nm (baicalin) and 322 nm (osthole). The column temperature was set at 30℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of berberine hydrochloride, baicalin and osthole were 80-800 ng($r=0.999\ 8$), 60-600 ng($r=0.999\ 9$), 60-600 ng($r=0.999\ 6$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The limits of quantitation were 80, 60, 60 ng, respectively, and the limits of detection were 24, 20, 20 ng, respectively. The recovery rates were 97.4%~98.3%(RSD=0.33%, $n=6$), 98.4%~99.6%(RSD=0.42%, $n=6$) and 96.9%~99.0%(RSD=0.92%, $n=6$), respectively. RSDs of durability tests were all lower than 1.2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, precise, stable, reproducible and durable. It can be used for simultaneous determination of berberine hydrochloride, baicalin and osthole in Jinchan zhiyang capsules.

KEYWORDS Jinchan zhiyang capsules; HPLC; Berberine hydrochloride; Baicalin; Osthole; Content determination

金蝉止痒胶囊为纯中药制剂^[1],由金银花、黄柏、黄芩、蛇床子、栀子、苦参、龙胆、白芷、白鲜皮、蝉蜕、连翘、地肤子、地黄、青蒿、广藿香、甘草等16味中药材组方而成,具有镇静、抗过敏、抗炎、解热、抑菌、利尿、解毒等作用^[2]。药理研究表明,该药对模型动物非免疫性接触性

荨麻疹症状改善作用明显,并对多种原因导致的模型小鼠皮肤瘙痒症状具有良好的止痒作用^[3-4]。临床研究显示,该药治疗神经或内分泌等因素引起的瘙痒^[5]、慢性荨麻疹^[6]、湿热型肛周湿疹^[7]及其他各类湿热型湿疹^[8]等疗效显著。该药处方中黄柏、黄芩、蛇床子与其清热、解毒、止痒功效关系密切,因此保证上述药材有效成分的含量,是保证产品质量的关键。而该药现行标准^[9]中只测定了盐酸小檗碱的含量。尽管现有文献^[1,10-11]报道了用高效液相色谱法(HPLC)分别测定中药制剂中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素的含量,但相关方法耗时长,不

Δ基金项目:重庆市青年科技人才培养计划项目(No.cstc2014kjrc-qncr10005)

*副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。E-mail:574884273@qq.com

#通信作者:高级工程师。研究方向:新药研发及药理学。E-mail:631760046@qq.com

利于快速检测。本课题组采用HPLC法同时测定金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素的含量,旨在为该制剂质量标准的提高提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030型HPLC仪,包括在线脱气机、二元高压泵、自动进样器、二极管阵列检测器、LabSolutions色谱工作站和UV-2450型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);CP225D型电子分析天平、BS124S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

金蝉止痒胶囊(重庆希尔安药业有限公司,批号:170901、170902、170903,规格:0.5 g/粒);盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:86.7%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201318,纯度:93.3%)、蛇床子素对照品(批号:110822-201406,供含量测定用)均购于中国食品药品检定研究院;*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺(50:30:19:1, V/V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:265 nm(盐酸小檗碱)、280 nm(黄芩苷)、322 nm(蛇床子素);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

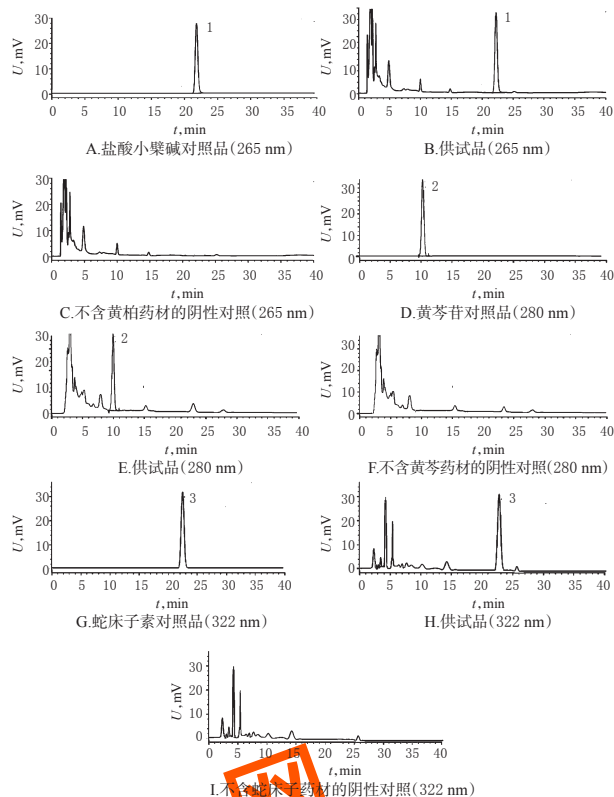
2.2.1 对照品溶液 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加DMF 5 mL,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)处理5 min,加甲醇制成质量浓度为400 μg/mL的盐酸小檗碱对照品溶液。取黄芩苷对照品适量,精密称定,加DMF 5 mL,超声处理5 min,加甲醇制成质量浓度为300 μg/mL的黄芩苷对照品溶液。取蛇床子素对照品适量,精密称定,加DMF 5 mL,超声处理5 min,加甲醇制成质量浓度为300 μg/mL的蛇床子素对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品内容物适量,研细,取约0.25 g,精密称定,置于50 mL量瓶中,加DMF 5 mL,超声处理5 min,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按金蝉止痒胶囊处方和工艺分别制备缺黄柏、黄芩、蛇床子的单一阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成单一阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,理论板数以盐酸小檗碱、黄芩苷、蛇床子素计均高于4 000,分离度均大于2.0。



注:1.小檗碱;2.黄芩苷;3.蛇床子素

Note: 1. berberine; 2. baicalin; 3. osthole

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,阴性对照在与各待测成分保留时间相同处无色谱峰出现,表明本方法专属性良好。

2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成系列单一对照品溶液。精密量取上述系列单一对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(*x*, ng)为横坐标、峰面积(*y*)为纵坐标进行线性回归,得盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素回归方程分别为 $y=49\ 853x+630$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=36\ 457x+230$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=37\ 654x+985$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素检测进样量线性范围分别为80~800、60~600、60~600 ng。

2.6 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素定量限分别为80、60、60 ng,检测限分别为24、20、20 ng。

2.7 中间精密度试验

取样品内容物细粉(批号:170901)约0.25 g,由不同分析人员于不同日期按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积并计算含量,结果见表1。结果显

示,盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素峰面积的RSD分别为1.10%、0.94%、0.73% ($n=6$),表明本方法中间精密度良好。

表1 中间精密度试验结果($n=12$)

Tab 1 Results of intermediate precision measurement($n=12$)

分析人员	序号	盐酸小檗碱			黄芩苷			蛇床子素		
		含量,mg/粒	平均值,mg/粒	RSD,%	含量,mg/粒	平均值,mg/粒	RSD,%	含量,mg/粒	平均值,mg/粒	RSD,%
分析人员甲	1	1.140			0.244			0.213		
	2	1.120			0.244			0.214		
	3	1.120			0.241			0.214		
	4	1.130			0.245			0.218		
	5	1.110			0.247			0.215		
	6	1.120	1.13	1.10	0.245	0.245	0.94	0.213	0.215	0.73
分析人员乙	7	1.120			0.246			0.216		
	8	1.150			0.241			0.213		
	9	1.140			0.246			0.213		
	10	1.110			0.249			0.214		
	11	1.120			0.244			0.215		
	12	1.130			0.246			0.216		

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:170901)7份,分别于室温下放置0、2、4、6、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,盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素峰面积的RSD分别为0.80%、0.90%、0.90% ($n=7$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.9 重复性试验

精密称取样品内容物细粉(批号:170901)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,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,盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素含量平均值分别为1.12、0.24、0.21 mg/粒,RSD分别为0.92%、0.80%、0.79% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品内容物细粉(批号:170901)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的单一对照品溶液各适量,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。

2.11 耐用性试验

2.11.1 色谱柱考察 取样品内容物细粉(批号:170903)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,并按“2.1”项下色谱条件[色谱柱分别为Hypersil BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Wondasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Hypersil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,色谱柱一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.11.2 流动相考察 取样品内容物细粉(批号:170903)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,并按“2.1”项下色谱条件(流动相甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶

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, %
盐酸小檗碱	0.125 5	0.274 4	0.271 2	0.540 1	98.0	97.8	0.33
	0.124 5	0.278 9	0.271 2	0.542 1	97.4		
	0.126 9	0.284 3	0.271 2	0.543 6	98.3		
	0.125 4	0.280 9	0.271 2	0.540 9	98.1		
	0.124 6	0.279 1	0.271 2	0.543 2	98.0		
	0.125 9	0.282 0	0.271 2	0.541 1	97.5		
黄芩苷	0.125 5	0.060 2	0.061 4	0.121 5	99.6	98.7	0.42
	0.124 5	0.059 8	0.061 4	0.121 2	98.6		
	0.126 9	0.060 9	0.061 4	0.122 3	98.7		
	0.125 4	0.060 2	0.061 4	0.121 6	98.4		
	0.124 6	0.059 8	0.061 4	0.121 2	99.2		
	0.125 9	0.060 4	0.061 4	0.121 8	98.1		
蛇床子素	0.125 5	0.052 7	0.050 2	0.102 1	99.0	97.8	0.92
	0.124 5	0.052 3	0.050 2	0.099 6	96.9		
	0.126 9	0.053 3	0.050 2	0.101 1	97.3		
	0.125 4	0.052 7	0.050 2	0.102 1	99.0		
	0.124 6	0.052 3	0.050 2	0.099 8	97.1		
	0.125 9	0.052 9	0.050 2	0.100 9	97.5		

液-三乙胺的体积比分别为48:30:20:2、50:30:19:1、51:30:18:1)进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,流动相一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.11.3 流速考察 取样品内容物细粉(批号:170903)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,并按“2.1”项下色谱条件(流速分别为0.9、1.0、1.1 mL/min)进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,流速一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.11.4 柱温考察 取样品内容物细粉(批号:170903)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,并按“2.1”项下色谱条件(柱温分别为25、30、35 ℃)进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,柱

表3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of durability tests

项目	分项	盐酸小檗碱			黄芩苷			蛇床子素		
		含量, mg/粒	平均值, mg/粒	RSD, %	含量, mg/粒	平均值, mg/粒	RSD, %	含量, mg/粒	平均值, mg/粒	RSD, %
色谱柱	Hypersil BDS C ₁₈	1.124	1.128	0.47	0.246	0.244	1.03	0.216	0.217	0.80
	Wondasil C ₁₈	1.126			0.241			0.216		
	Hypersil ODS C ₁₈	1.134			0.244			0.219		
流动相	甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺(48:30:20:2, V/V/V/V)	1.124	1.124	0.31	0.246	0.246	0.41	0.216	0.217	0.96
	甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺(50:30:19:1, V/V/V/V)	1.127			0.245			0.219		
	甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺(51:30:18:1, V/V/V/V)	1.120			0.247			0.215		
流速	0.9 mL/min	1.124	1.126	0.51	0.241	0.244	1.08	0.217	0.216	0.71
	1.0 mL/min	1.132			0.246			0.216		
	1.1 mL/min	1.121			0.245			0.214		
柱温	25 °C	1.122	1.127	0.57	0.244	0.245	0.41	0.218	0.216	1.17
	30 °C	1.124			0.246			0.216		
	35 °C	1.134			0.245			0.213		

温一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.12 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=3, mg/粒)

Tab 4 Content determination of samples (n=3, mg/capsule)

批号	盐酸小檗碱	黄芩苷	蛇床子素
170901	1.12	0.24	0.21
170902	1.16	0.25	0.22
170903	1.13	0.22	0.23

3 讨论

在样品提取方法上,本课题组分别考察了用盐酸-甲醇(1:100, V/V)超声处理20 min、70%乙醇溶液超声处理30 min和DMF超声处理5 min的提取效果。结果表明,样品采用盐酸-甲醇(1:100, V/V)超声处理后,盐酸小檗碱色谱峰峰形较好,但黄芩苷和蛇床子素峰形较差;采用70%乙醇溶液超声处理后,黄芩苷和蛇床子素色谱峰峰形较好,但盐酸小檗碱峰形较差;采用DMF超声处理后,3种待测成分色谱峰峰形均较好。因此,选用DMF作为提取溶剂。

在色谱条件的选择中,笔者分别考察了甲醇-水、甲醇-磷酸二氢钾溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液-三乙胺、甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺作为流动相对结果的影响。结果表明,以甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液-三乙胺(50:30:19:1, V/V/V/V)为流动相时,盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素色谱峰分别在265、280、322 nm波长处与相邻峰之间分离度好,峰形尖锐、对称性好,理论板数均大于4 000,各项参数能满足HPLC法的相关要求。

综上所述,本方法操作简便、准确,精密度、稳定性、

重复性、耐用性好,可用于金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素含量的同时测定。

参考文献

- [1] 贾琳,江龙.金蝉止痒胶囊质量标准分析与研究[J].中国医药导报,2017,14(22):42-46.
- [2] 谭正怀,荒凉越,李吉珍,等.金蝉止痒冲剂的药理研究[J].中成药,1993,15(6):25-26.
- [3] 陈晓雪,胡勇,谯志文,等.金蝉止痒胶囊抗过敏作用的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2013,8(11):1121-1123,1144.
- [4] 徐汉,吕珊珊,徐世军,等.金蝉止痒胶囊对小鼠皮肤瘙痒的影响研究[J].中国药业,2014,23(6):20-22.
- [5] 曹玉杰.金蝉止痒胶囊联合枸地氯雷他定片治疗皮肤瘙痒症临床观察[J].中国民间疗法,2018,26(1):62-63.
- [6] 尚静雯.金蝉止痒胶囊联合枸地氯雷他定片治疗慢性荨麻疹疗效观察[J].中国麻风皮肤病杂志,2013,29(11):738-739.
- [7] 胡海平,张磊,陈喜丽,等.金蝉止痒胶囊联合曲安奈德益康唑乳膏治疗湿热型肛周湿疹的疗效观察[J].安徽医药,2017,21(9):1712-1715.
- [8] 欧柏生,魏飞,黄彦,等.金蝉止痒胶囊治疗湿热型湿疹98例[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(19):323-325.
- [9] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 YBZ20161320 09[S].2016.
- [10] 兰杨,吕珊珊,谯志文,等.健脾止泻宁颗粒的质量标准提高研究[J].中国药房,2017,28(18):2568-2572.
- [11] 陈琴华,李鹏,朱军,等.反相高效液相色谱法测定金蝉止痒颗粒中蛇床子素的含量[J].山西医药杂志,2011,40(6):610-611.

(收稿日期:2017-12-05 修回日期:2018-02-09)

(编辑:张静)