doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2019.07.04

HPLC 同时测定翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱含量

陆凤琪[1],周海嫔[2],陈文成[1],甘斌艳[1],王亚芳[3]*

(1.安徽牧春堂天然药物研究开发有限公司,安徽滁州 239000;2.滁州学院,安徽滁州 239000;3.北京市兽药监察所,北京 102629)

[收稿日期] 2019 - 05 - 06　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2019) 07 - 0025 - 05　[中图分类号] S853.7

[摘　要]　为了测定翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱的含量。采用中性氧化铝柱对供试品溶液进行处理,使目标峰不被杂质峰干扰。采用 YMC - Pack Pro C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm),流动相为乙腈 - 0.15% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,柱温为 26 ℃,检测波长为 245 nm,建立了高效液相色谱测定方法。芍药苷和盐酸小檗碱的进样量分别在 0.307 ~ 4.920 μg(r = 0.9996)和 0.064 ~ 1.025 μg(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 91.10%(RSD = 1.75%,n = 6)和 92.06%(RSD = 1.69%,n = 6)。该方法简单、可靠,可以同时检测翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱的含量,为翻黄合剂的质量控制提供了依据。

[关键词]　翻黄合剂;芍药苷;盐酸小檗碱;HPLC

Content Determination of Paeoniflorin and Berberine Hydrochloride in Fanhuang Mixture by HPLC

LU Feng - qi[1], ZHOU Hai - pin[2], CHEN Wen - cheng[1], GAN Bin - yan[1], WANG Ya - fang[3]*

(1. *Anhui Muchuntang Natural Medicine Research and Development Co., Ltd*, *Chuzhou*, *Anhui* 239000, *China*;
2. *Chuzhou University*, *Chuzhou*, *Anhui* 239000, *China*; 3. *Beijing Institute of Veterinary Drugs Control*, *Beijing* 102629, *China*)

Corresponding author: *WANG Ya - fang*, *E - mail*: *wangyafang2002@ aliyun.com*

Abstract: A method for the content determination of paeoniflorin and berberine hydrochloride in Fanhuang mixture. Neutral alumina column was used to treat the sample solution so that the target peak was not disturbed by the impurity peak. Used YMC - Pack Pro C18 analysis column (250 mm × 4.6 mm), mobile phase of acetonitrile - 0.15% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 26 ℃, the detection wavelength was 245 nm. The linear ranges of paeoniflorin and berberine hydrochloride were 0.307 ~ 4.920 μg(r = 0.9996) and 0.064 ~ 1.025 μg(r = 0.9998) respectively, and their average recovery rates were 91.10% (RSD = 1.75%, n = 6) and 92.06% (RSD = 1.69%, n = 6) respectively. The method is simple and reliable, and can simultaneously detect the content of paeoniflorin and berberine

基金项目:滁州市农业与社会发展领域科技计划项目(201711)

作者简介:陆凤琪,工程师,从事中兽药、天然植物药的研究与开发。

通讯作者:王亚芳。E - mail:wangyafang2002@ aliyun.com

hydrochloride in Fanhuang mixture, providing a basis for the quality control of Fanhuang mixture.

Key words: Fanhuang mixture; paeoniflorin; berberine hydrochloride; HPLC

现代中兽医从辨证论治角度分析鸡大肠杆菌病属疫毒内侵、肺胃热盛、血瘀气滞，应以清热解毒、活血行气为主[1]。翻黄合剂是由翻白草、千里光、大黄、黄连、赤芍等药材组成，临床用于鸡大肠杆菌病，具有清热解毒、活血化瘀、燥湿止痢的功效。其质量标准研究只针对盐酸小檗碱进行含量测定，未对赤芍中主要成分芍药苷进行检测，故本文参照有关文献[2-5]，采用高效液相色谱法同时测定翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱的含量，为翻黄合剂的质量控制提供科学的依据。

1　材　料

Agilent 1260 Infinity Ⅱ 高效液相色谱仪；EX125DZH 型电子天平（奥豪斯仪器（上海）有限公司）；UPT－C－5 型超纯水机（邦西科技（上海）有限公司）；RE－2000B 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；KQ3200B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

翻黄合剂为安徽牧春堂天然药物研究开发有限公司制备（批号：20190319）。芍药苷对照品（批号：110736－201741），盐酸小檗碱对照品（批号：110713－201613），以上均购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯，磷酸为优级纯，中性氧化铝（200－300 目），盐酸、甲醇为分析纯。

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

2.1.1　对照品溶液的制备　分别取在五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷和盐酸小檗碱对照品适量，精密称定，加甲醇制成芍药苷浓度为 99.76 μg/mL、盐酸小檗碱浓度为 23.85 μg/mL 的混合对照品溶液，摇匀，滤过，即得。

2.1.2　供试品溶液的制备　精密量取翻黄合剂 10 mL，置具塞锥形瓶中，加盐酸 0.1 mL，85 ℃水浴 30 min，超声处理（功率 150 W，频率 40 KHz）20 min，加于中性氧化铝柱（200～300 目，5 g，内径为 1 cm）上，用甲醇 100 mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，残渣加甲醇 50 mL 使溶解，转移置 50 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，滤过，即得。

2.1.3　未过柱纯化供试品溶液的制备　精密量取翻黄合剂 10 mL，置 50 mL 量瓶中，加盐酸 0.1 mL，85 ℃水浴 30 min，加甲醇 30 mL，超声处理（功率 150 W，频率 40 KHz）20 min，放冷，加甲醇定容至刻度，滤过，精密量取续滤液 10 mL，蒸干，残渣加甲醇 10 mL 使溶解，转移置 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，滤过，即得。

2.1.4　阴性对照溶液的制备　按处方组成与制剂工艺，制备缺赤芍和黄连的阴性样品，按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。

2.2　色谱条件

YMC－Pack Pro C18（250 mm × 4.6 mm）；流动相 A 为乙腈，B 为 0.15% 磷酸溶液，梯度洗脱程序见表 1；流速为 1.0 mL/min；柱温为 26 ℃；检测波长为 245 nm。

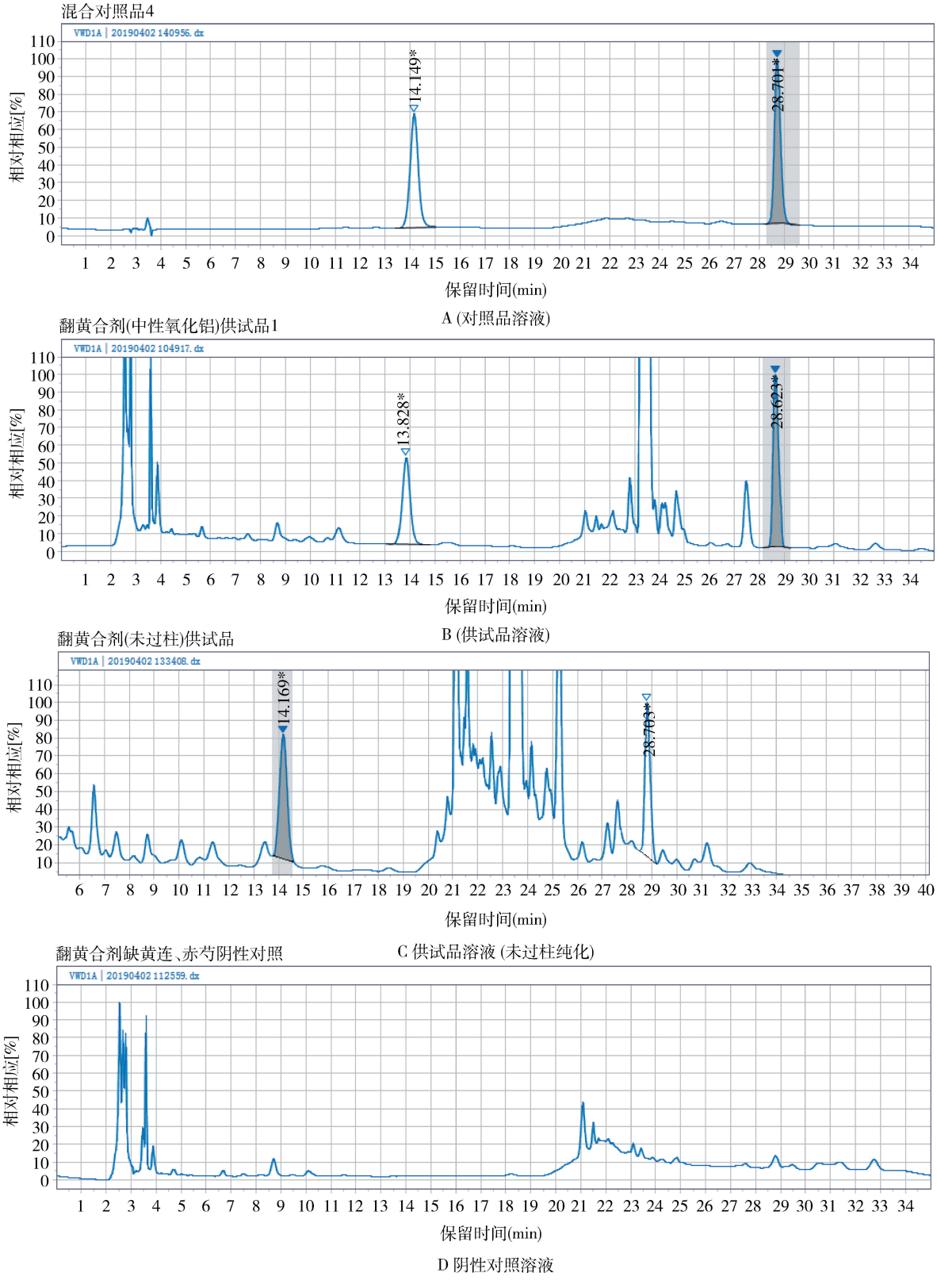
表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient eluted program

t/min	A/%	B/%
0	15	85
15	15	85
18	30	70
30	30	70
33	15	85
35	15	85

2.3　供试品溶液制备工艺与系统适用性试验

按上述色谱条件，分别取对照品溶液、供试品溶液、未过柱纯化供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL 进样，记录色谱图。理论板数按芍药苷和盐酸小檗碱峰计算不低于 4000，芍药苷保留时间为 13.828 min，盐酸小檗碱保留时间为 28.623 min，峰型对称，无杂质干扰且基线平稳，阴性无干扰。见图 1。



(A: Standard solution; B: Sample solution; C: No purified test solution by column; D: Negative control solution)

图 1　HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms

2.4　线性关系考察　分别取在五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷和盐酸小檗碱对照品适量，精密称定，加甲醇制成芍药苷浓度为 491.96 μg/mL、盐酸小檗碱浓度为 102.50 μg/mL 的母液。加甲醇将母液进行倍比稀释，分别稀释成芍药苷浓度为 491.96、245.98、122.99、61.49、30.75 μg/mL 和盐酸小檗碱浓度为 102.50、51.25、25.63、12.81、6.41 μg/mL 的对照品溶液。各进样 2 次，进样体积 10 μL，按上述色谱条件测定。以芍药苷和盐酸小檗碱峰面积为纵坐标(Y)，以对照品进样量为横坐标(X)，绘制标准曲线。见表 2。

表 2　线性关系

Tab 2　Linear relationship

成分	线性范围/μg	线性方程	r
芍药苷	0.307 ~ 4.920	Y = 4.6985X + 20.674	0.9996
盐酸小檗碱	0.064 ~ 1.025	Y = 20.577X - 34.66	0.9998

2.5　精密度试验　精密吸取芍药苷和盐酸小檗碱混合对照品溶液 10 μL，重复进样 6 次，按上述色谱条件测定，结果芍药苷和盐酸小檗碱峰面积的 *RSD* 分别为 1.14% 和 0.76% (n = 6)，表明仪器精密度良好。

2.6　稳定性试验　取同一供试品溶液，按上述色谱条件测定，分别于 0、2、4、6、8 h 后进样，进样量为 10 μL，测定峰面积。结果芍药苷和盐酸小檗碱峰面积的 *RSD* 分别为 1.32% 和 0.57% (n = 5)，表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7　重复性实验　取同一批的翻黄合剂(批号为 20190319)，按 2.1.2 所述方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定含量。结果芍药苷和盐酸小檗碱含量的 *RSD* 分别为 0.90% 和 0.64% (n = 6)，表明方法重复性良好。

2.8　加样回收率试验　取已知含量的翻黄合剂 6 份，精密吸取 10 mL，分别加入芍药苷 6.20 mg 和盐酸小檗碱 1.90 mg，加热至完全溶解，按 2.1.2 所述方法制备供试品溶液，进样测定含量，计算回收率。见表 3。

表 3　加样回收率试验结果(n = 6)

Tab 3　Results cosfficient of recovery test(n = 6)

名称	样品中含量/mg	加入对照品量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
芍药苷	6.23	6.23	11.856	90.30	91.10	1.75
	6.23	6.28	12.009	92.02		
	6.23	6.19	11.934	92.15		
	6.23	6.21	11.947	92.06		
	6.23	6.27	11.758	88.17		
	6.23	6.25	11.975	91.92		
盐酸小檗碱	1.92	1.93	3.724	93.47	92.06	1.69
	1.92	1.89	3.657	91.90		
	1.92	1.95	3.673	89.90		
	1.92	1.91	3.686	92.46		
	1.92	1.93	3.671	90.73		
	1.92	1.89	3.695	93.91		

2.9　样品含量测定　取三批样品，按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液，依法测定，计算样品中芍药苷和盐酸小檗碱的含量。见表 4。

表 4　3 批样品中含量测定结果

Tab 4　Content determination results of three batch sample

批号	芍药苷含量/(mg·mL^{-1})	盐酸小檗碱含量/(mg·mL^{-1})
20190319	0.623	0.192
20190329	0.604	0.187
20190411	0.611	0.189

3　讨论与结论

翻黄合剂是由翻白草、千里光、大黄、黄连、赤芍等药材提取精制制成的中药合剂，具有抗菌、抗炎、活血、祛瘀等功效。为了保证药物临床有效性，采用 HPLC 同时控制翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱的含量。翻黄合剂为复方制剂，含有多种化合物，在制备供试品溶液时，直接采用甲醇做溶剂对样品进行稀释，得到的供试品溶液杂质成分多，目标峰基线偏高，杂质峰有干扰，无法测定样品中芍药苷和盐酸小檗碱的含量。采用中性氧化铝柱对供试品溶液进行处理，可以除去部分杂质，使目标峰分离度好，无杂质峰干扰。

为了同时测定翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱的含量，对多种流动相进行了选择，选择甲醇 - 0.1% 磷酸溶液、乙腈 - 水的不同比例，所得目标峰峰型、分离度均不理想，最后选择乙腈 - 0.15% 磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱，经不断调整梯度洗脱比例，所得目标峰出峰时间、峰型、分离度均较好。

综上所述，该方法简单、可靠，可以同时检测翻黄合剂中芍药苷和盐酸小檗碱的含量，为翻黄合剂的质量控制提供了依据。

参考文献：

[1] 张 璐，龚旭昊，戴 青，等. 中药防治鸡大肠杆菌病的研究进展[J]. 中国兽药杂志，2017，51(09)：61 - 67.
Zhang L，Gong X H，Dai Q，*et al*. Research progress on prophylaxis and treatment of chicken colibacillosis using chinese material medica[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug，2017，51(09)：61 - 67.

[2] 黄 渭，杨 康，杨 敏，等. 高效液相色谱法同时测定白带丸中芍药苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 湖北中医药大学学报，2016，18(03)：57 - 59.
Huang W，Yang K，Yang M，*el al*. Content determination of paeoniflorin and berberine hydrochloride in baidai pills by HPLC[J]. Journal of Hubei University of Chinese Medicine，2016，18(03)：57 - 59.

[3] 马 帅，葛洁英，周 蓬. HPLC 法测定白带丸中芍药苷及盐酸小檗碱的含量[J]. 药学研究，2015，34(07)：398 - 400.
Ma S，Ge J Y，Zhou P. Determination of paeoniflorin and berberine hydrochloride in baidai pills by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical Research，2015，34(07)：398 - 400.

[4] 赵 旭，汪 坤. HPLC 同时测定栀黄止痛贴中栀子苷、大黄酸、芍药苷、盐酸小檗碱含量[J]. 中国中医药现代远程教育，2017，15(03)：128 - 130.
Zhao X，Wang K. Simultaneous content determination of geniposide，rhein，paeoniflorin and berberine in zhihuang zhitong paste by HPLC[J]. Chinese medicine modern distance education of china，2017，15(03)：128 - 130.

[5] 李 静，钱 江. 高效液相色谱法同时测定复方黄连素片中芍药苷和盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业，2016，25(07)：61 - 63.
Li J，Qian J. Content determination of paeoniflorin and berberine hydrochloride in compound huangliansu tablets by HPLC[J]. China Pharmaceuticals，2016，25(07)：61 - 63.

(编 辑：陈 希)