

HPLC 同时测定三黄胶囊中 11 种成分的含量

汪 健¹, 金顺琪^{1,2}, 黄 菲¹, 张露蓉^{1*}

(1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215007; 2. 苏州市中西医结合医院, 江苏 苏州 215101)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱法同时测定医院制剂三黄胶囊中 11 种成分的含量, 作为其质量控制的方法。**方法** 选择 Agilent Extend-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 将 pH 2.5 的甲醇-磷酸水溶液作为流动相, 进行 1 mL·min⁻¹ 的梯度洗脱, 检测波长和柱温为 280 nm, 30 °C, 吸取 10 μL 进样。**结果** 各成分的平均加样回收率为 99.15%~116.70%。盐酸小檗碱、黄芩苷、槲皮素、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量为(10.14±0.93)、(12.88±1.12)、(1.71±0.17)、(2.78±0.22)、(0.21±0.01)、(0.20±0.06)、(0.21±0.04)、(0.53±0.04)、(0.35±0.09)、(0.64±0.05)、(0.23±0.04) mg/粒。**结论** 该方法简便、稳定、重复性良好, 可作为三黄胶囊的质控标准。

关键词: 三黄胶囊; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2023)05-0074-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.05.014

Simultaneous Determination of Eleven Components in Sanhuang Capsule by HPLC

WANG jian¹, JIN Shunqi^{1,2}, HUANG fei¹, ZHANG Lurong¹

(1. Suzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215007, China;

2. Suzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou 215101, China)

ABSTRACT: Objective To determine 11 components in Sanhuang Capsule by HPLC as a quality control method. **Methods** The chromatographic column was selected Agilent Extend-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), methanol-phosphoric acid aqueous solution with pH 2.5 was used as the mobile phase for gradient elution at a rate of 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 30 °C and the injection volume was 10 μL. **Results** The average recoveries were 99.15%~116.70%. The average content of berberine hydrochloride, baicalin, quercetin, wogonoside, baicalein, wogonin, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion were(10.14±0.93)、(12.88±1.12)、(1.71±0.17)、(2.78±0.22)、(0.21±0.01)、(0.20±0.06)、(0.21±0.04)、(0.53±0.04)、(0.35±0.09)、(0.64±0.05)、(0.23±0.04) mg/grain. **Conclusion** The method is simple, stable and reproducible, and can be used as the quality control standard of Sanhuang Capsule.

KEY WORDS: Sanhuang Capsule; HPLC; content determination

三黄胶囊是苏州市中医院的经典制剂(苏药制字 Z04001094), 其中包含大黄、黄芩、黄柏 3 味中药, 能够清热解毒, 在用于治疗疮疡湿证, 邪滞内阻肠道之证时, 充分体现了吴门医派治“湿热”以“清热燥湿兼投并进”的治法。方中大黄主要含蒽醌类成分如大黄素、大黄酸等^[1-2], 黄芩多含黄酮类成分如黄芩苷、汉黄芩素等^[3-4], 黄柏主要含生物碱类成分如盐酸小檗

碱^[5-6]等, 以上代表性成分分别是大黄、黄芩、黄柏含量测定中的指标成分, 也是其发挥药效的主要活性成分, 可作为药材质控标准的依据。

目前这三种单味药材, 已分别建立了多种含量测定方法, 但三黄胶囊仅有一篇测定其中盐酸小檗碱含量的报道^[7]。含量测定作为药品质量评价的指标, 凭单一成分是远不够的, 因此, 本实验综合 2020 版《中

基金项目: 2020 年度苏州市民生科技示范项目(SS202006); 2020 年度姑苏卫生人才培养项目(GSWS2020079)

作者简介: 汪 健(1974-), 男, 副主任中药师, E-mail: 42736198@qq.com

* 通信作者: 张露蓉(1973-), 女, 博士, 主任中药师, 研究方向: 医院药学, E-mail: fsyy00571@njucm.edu.cn

国药典》及相关文献中对主要有效成分的含量测定,利用高效液相色谱法同时对三黄胶囊中 11 种主要成分进行含量测定,进一步完善了三黄胶囊的质量控制标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 液相色谱系统(DAD 二极管阵列检测器);纯水仪(Millipore 默克 milli-q 公司);超声波清洗机(南京先欧仪器制造有限公司);电子天平(Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司,批号:203194);超纯水;无水乙醇(江苏强盛功能化学股份有限公司,批号:20211101);磷酸(上海联试化工试剂有限公司);标准品:盐酸小檗碱(批号:15062403)、黄芩苷(批号:18041007)、汉黄芩苷(批号:17010904)、黄芩素(批号:19112803)、汉黄芩素(批号:17012304)、大黄素甲醚(批号:16062404)购自上海纯优生物科技有限公司,纯度均大于 98%;槲皮素(批号:081-9003)、大黄素(批号:110756-200110)、大黄酚(批号:110796-200310)购自中国药品生物制品检定所;芦荟大黄素(批号:110795-201710)、大黄酸(批号:110757-200206)购自中国食品药品检定研究院。

1.3 药材 三黄胶囊共 10 批(批号:181107、190610、191211、200212、201030、201031、201101、201105、201106、220506),均源于苏州市中医医院。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 称取 0.3 g 胶囊粉末,放于 25 mL 容量瓶中,加入 70%乙醇,使液面至刻度线,超声 1 h,待放冷后,补足 70%乙醇,摇匀、过滤即得。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱、黄芩苷、槲皮素、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚这 11 种标准品,分别用甲醇配成浓度为 418.36、544.80、100.58、110.66、7.93、4.70、9.02、15.56、15.04、27.74、10.85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件 根据文献改良色谱条件^[8],考察不同条件下的分离效果,得到以下优化的色谱条件。色谱柱:Agilent Extend-C18 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:pH 2.5 的甲醇-磷酸水溶液;流速:1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;波长:280 nm;进样量:10 μL 。梯度洗脱条件如表 1。供试品及混合对照品色谱图,见图 1 和图 2。

表 1 流动相梯度洗脱表

时间/min	磷酸水溶液(pH 2.5)/%	甲醇/%
0	80	20
5	80	20
15	60	40
35	30	70
50	0	100
55	70	30

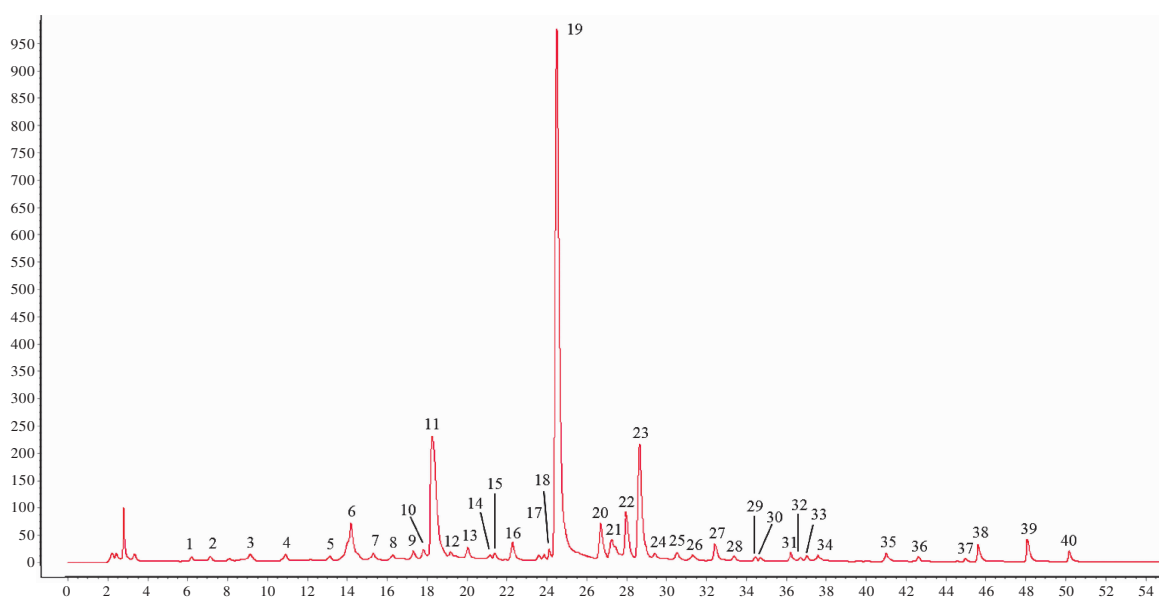
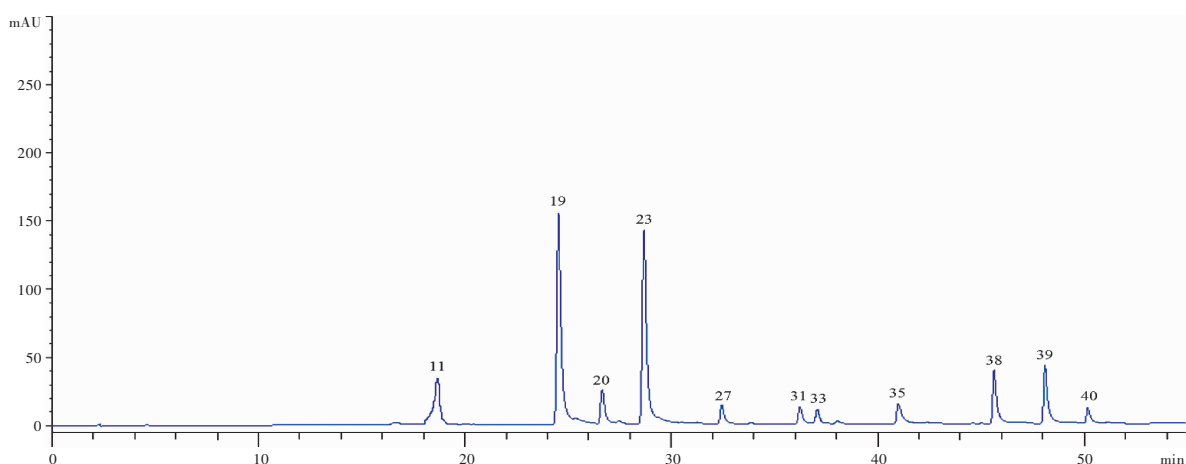


图 1 供试品溶液图谱



注:盐酸小檗碱(峰 11)、黄芩苷(峰 19)、槲皮素(峰 20)、汉黄芩苷(峰 23)、黄芩素(峰 27)、汉黄芩素(峰 31)、芦荟大黄素(峰 33)、大黄酸(峰 35)、大黄素(峰 38)、大黄酚(峰 39)、大黄素甲醚(峰 40)

图 2 混合对照品溶液色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 选择同一批次的三黄胶囊,按“2.1”中的方法提取样品,并在相同的色谱条件下检测 6 次得到盐酸小檗碱、黄芩苷、槲皮素、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积,RSD 分别为 0.17%、0.37%、0.55%、0.27%、1.24%、1.59%、1.74%、0.41%、0.37%、0.60%、0.30%,结果表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 选择同一批次的三黄胶囊,将制得的样品溶液分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 进样得到 11 种化学成分的峰面积(同前),RSD 分别为 1.92%、0.51%、0.43%、0.81%、1.88%、1.77%、0.73%、1.45%、0.71%、0.78%、0.97%,结果表明 24 h 内供试品溶液具有良好的稳定性。

2.4.3 重复性试验 选择 6 份同一批次的三黄胶囊,按同样操作制备样品溶液,并进样。计算得到 11 种成分(同前)平均含量的 RSD 分别为 0.89%、0.77%、1.10%、0.76%、0.84%、0.53%、0.98%、0.56%、1.50%、0.68%、0.84%,结果表明该方法重复性良好。

2.4.4 线性关系考察 用甲醇将配好的混合对照品按浓度由高到低稀释成 5 份,把浓度(C)作为横坐标,峰面积(A)作为纵坐标,生成标准曲线(表 2)。

2.4.5 加样回收率试验 分别把 6 份已知含量的供试品与对照品溶液混合,进样,加样回收率结果见表 3。

表 2 11 种成分的回归方程

成分	回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
盐酸小檗碱	$y=12.529x+324.070$	0.999 2	103.88~1 662.00
黄芩苷	$y=32.246x+621.550$	0.999 4	68.13~1 089.60
槲皮素	$y=10.717x+166.550$	0.999 2	25.13~402.00
汉黄芩苷	$y=30.299x+163.870$	0.999 2	28.50~456.00
黄芩素	$y=37.348x+26.604$	0.999 4	2.00~32.00
汉黄芩素	$y=23.447x+3.408$	0.999 3	1.19~19.00
芦荟大黄素	$y=12.202x+17.148$	0.999 3	2.38~38.00
大黄酸	$y=11.773x-22.047$	0.999 3	4.13~66.00
大黄素	$y=22.538x+47.820$	0.999 2	4.00~64.00
大黄酚	$y=17.377x+47.750$	0.999 2	6.88~110.00
大黄素甲醚	$y=18.82x+21.184$	0.999 3	2.69~43.00

2.4.6 含量测定 取 10 批三黄胶囊提取得到 10 份供试品溶液,进样,计算胶囊中各成分的含量(见表 4)。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 应用甲醇和乙醇分别进行超声提取,结果显示(图 3)得到的图谱峰型差异不大,其中乙醇提取的含量相对较高,并且考虑到乙醇较甲醇来说毒性低,危害小,故以乙醇作为提取溶剂。

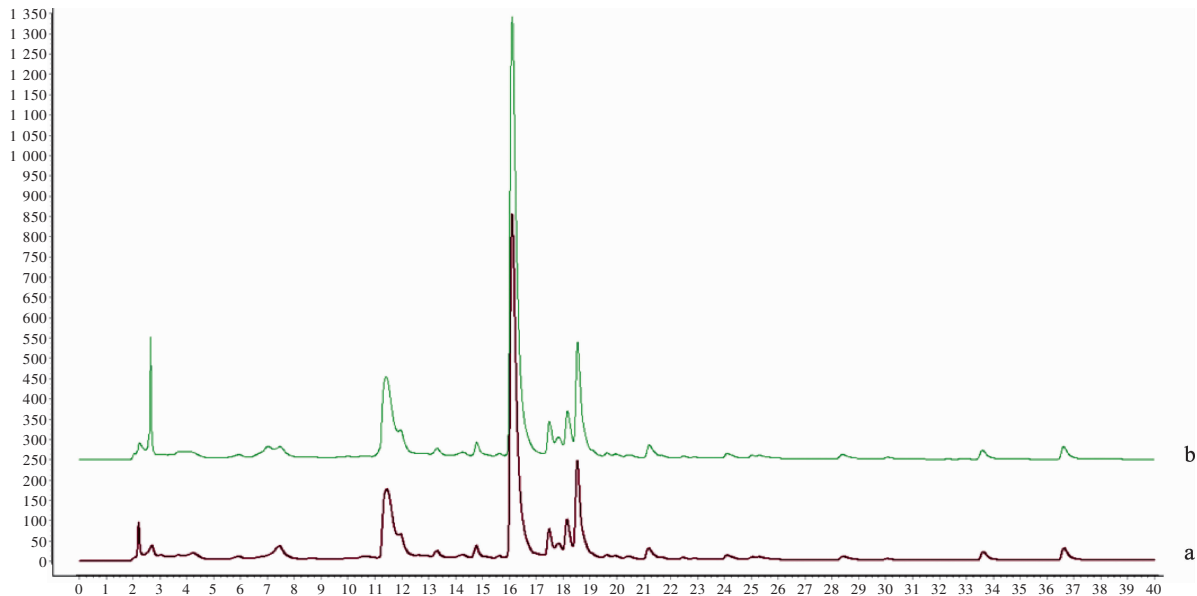
3.2 色谱条件的选择

表 3 加样回收率试验结果 (n=6)

成分	样品含 量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%	成分	样品含 量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%	
盐酸小檗碱	1	352.18	390.00	815.65	118.84	116.29	芦荟大黄素	1	8.50	10.80	20.40	110.16	105.33	2.98
	2	352.44	390.00	796.67	113.91			2	8.47	10.80	19.65	103.51		
	3	352.62	390.00	804.85	115.95			3	8.55	10.80	20.01	106.04		
	4	352.54	390.00	800.47	114.86			4	8.60	10.80	20.17	107.11		
	5	354.01	390.00	799.73	114.29			5	8.59	10.80	19.83	104.01		
	6	352.78	390.00	820.34	119.89			6	8.57	10.80	19.50	101.17		
黄芩苷	1	424.35	412.00	873.15	108.93	109.72	大黄酸	1	18.73	20.00	38.45	98.59	100.40	1.71
	2	425.88	412.00	890.35	112.74			2	18.69	20.00	38.68	99.93		
	3	426.72	412.00	877.87	109.50			3	18.67	20.00	39.41	103.68		
	4	427.39	412.00	875.37	108.73			4	18.75	20.00	38.74	99.94		
	5	429.01	412.00	876.88	108.71			5	18.86	20.00	38.93	100.35		
	6	425.20	412.00	877.20	109.71			6	18.78	20.00	38.76	99.90		
槲皮素	1	60.55	60.46	129.46	113.98	115.72	大黄素	1	13.29	13.20	26.39	99.20	100.91	2.71
	2	61.23	60.46	130.34	114.30			2	13.29	13.20	26.07	96.79		
	3	60.22	60.46	127.24	110.85			3	13.27	13.20	27.09	104.72		
	4	60.02	60.46	132.57	119.99			4	13.30	13.20	26.74	101.79		
	5	60.41	60.46	131.02	116.79			5	13.37	13.20	26.89	102.40		
	6	60.32	60.46	131.91	118.41			6	13.41	13.20	26.69	100.59		
汉黄芩苷	1	98.24	92.00	193.57	103.61	105.51	大黄酚	1	23.08	20.00	43.23	100.77	99.15	2.14
	2	98.34	92.00	199.86	110.36			2	23.05	20.00	42.85	99.01		
	3	98.31	92.00	194.58	104.65			3	23.03	20.00	43.48	102.28		
	4	98.48	92.00	194.99	104.89			4	23.02	20.00	42.41	96.94		
	5	98.79	92.00	194.98	104.56			5	23.07	20.00	42.88	99.05		
	6	98.93	92.00	195.50	104.97			6	23.42	20.00	42.80	96.86		
黄芩素	1	7.63	7.20	16.01	116.39	116.70	大黄素甲醚	1	9.00	8.90	18.51	106.83	103.19	2.11
	2	7.53	7.20	15.73	113.93			2	8.94	8.90	18.26	104.72		
	3	7.49	7.20	16.30	122.35			3	8.96	8.90	18.12	102.96		
	4	7.45	7.20	15.87	116.91			4	9.00	8.90	18.04	101.62		
	5	7.44	7.20	15.79	116.00			5	9.03	8.90	18.05	101.36		
	6	7.33	7.20	15.58	114.59			6	9.00	8.90	18.05	101.66		
汉黄芩素	1	6.65	6.00	12.96	105.15	109.56								
	2	6.65	6.00	13.07	106.90									
	3	6.63	6.00	13.36	112.06									
	4	6.67	6.00	13.34	111.21									
	5	6.67	6.00	13.21	108.91									
	6	6.39	6.00	13.19	113.32									

表 4 样品含量测定结果 (mg/粒)

编号	盐酸 小檗碱	黄芩苷	槲皮素	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚
1	10.03	13.77	1.79	2.90	0.22	0.18	0.24	0.56	0.39	0.68	0.27
2	10.68	13.48	1.74	2.84	0.22	0.18	0.24	0.56	0.39	0.67	0.26
3	11.07	14.21	1.90	2.95	0.22	0.17	0.17	0.57	0.40	0.67	0.23
4	11.11	14.31	1.92	2.97	0.22	0.19	0.26	0.57	0.41	0.67	0.23
5	8.74	11.37	1.53	2.44	0.19	0.16	0.18	0.47	0.33	0.58	0.23
6	8.78	11.39	1.51	2.45	0.19	0.16	0.18	0.47	0.33	0.58	0.23
7	10.85	12.68	1.85	2.95	0.21	0.37	0.16	0.48	0.10	0.58	0.14
8	10.45	13.00	1.73	2.87	0.22	0.19	0.25	0.57	0.40	0.68	0.27
9	10.62	13.03	1.73	2.88	0.21	0.18	0.25	0.54	0.40	0.69	0.26
10	9.09	11.57	1.45	2.52	0.21	0.16	0.16	0.50	0.35	0.61	0.23
$\bar{x} \pm s$	10.14±0.93	12.88±1.12	1.71±0.17	2.78±0.22	0.21±0.01	0.20±0.06	0.21±0.04	0.53±0.04	0.35±0.09	0.64±0.05	0.23±0.04



a. 甲醇提取的色谱图; b. 乙醇提取的色谱图

图 3 不同提取溶剂色谱图

3.2.1 波长的选择 通过紫外全波长扫描后,选择比较波长为 265 nm、280 nm、345 nm 时的色谱图 (图 4), 当波长为 280 nm 的色谱峰整体分离效果较好, 峰面积相对偏大, 所以将 280 nm 确定为检测波长。

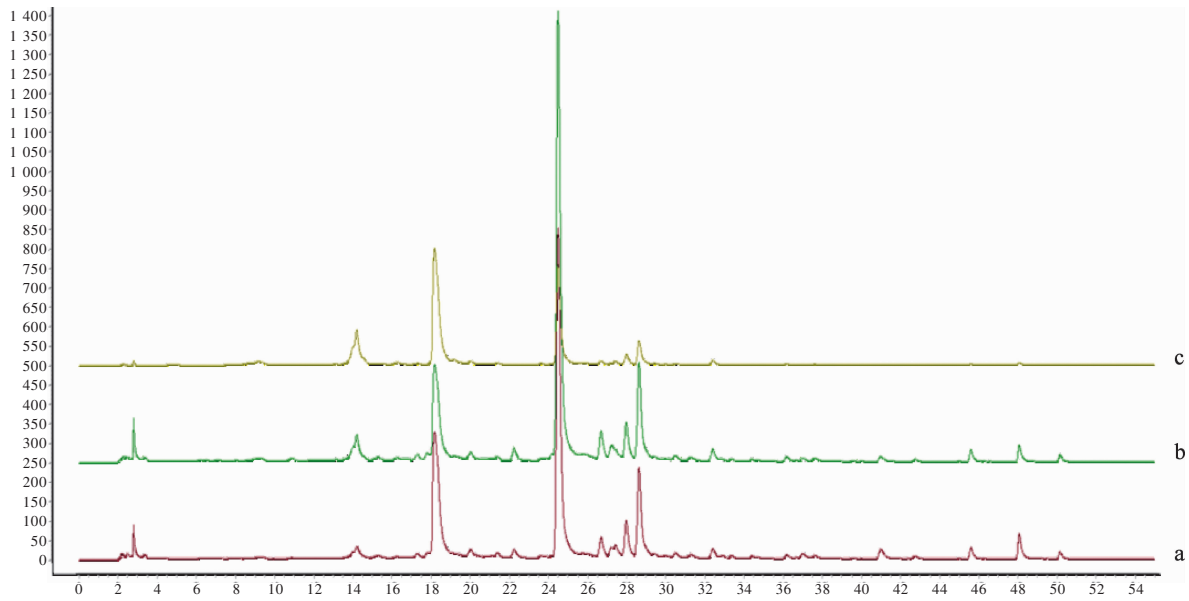
3.2.2 pH 的选择 流动相方面选择了三个不同 pH (pH=2.5、pH=3.0、pH=3.5) 的甲醇-磷酸水溶液, 当 pH 为 2.5 的样品各峰分离效果相对较好, 即用磷酸调 pH 2.5 时最佳 (图 5)。

该实验建立了三黄胶囊中每味药的主要指标成分含量测定的方法, 能够同时测定 11 种主要指标成分, 该法简便、稳定、可靠。结合前期建立的指纹图谱, 可以

全面控制该制剂质量, 使其质量控制标准更加完善。

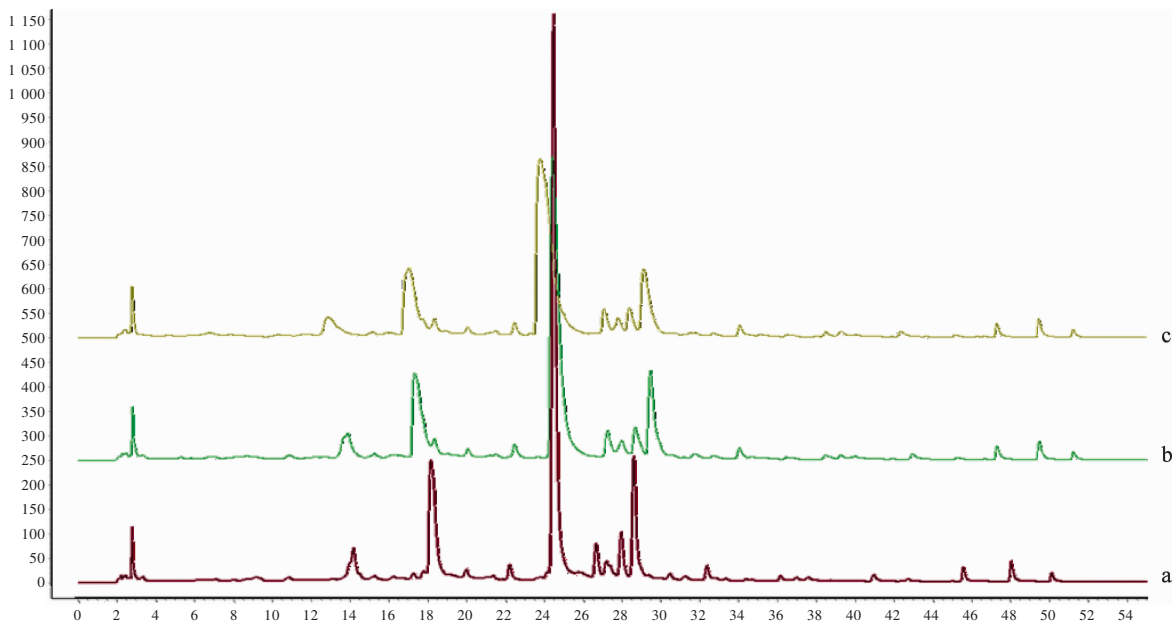
参考文献:

- [1] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [2] 王启斌, 叶方, 黄良永, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定大黄中 9 种蒽醌类成分含量[J]. 中国药业, 2021, 30(14): 58-62.
- [3] 李恩泽, 刘月芬, 刘玉君, 等. 不同产地黄芩中 6 种化学成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(9): 946-948.



a. 265 nm 的色谱图; b. 280 nm 的色谱图; c. 345 nm 的色谱图

图 4 不同波长的色谱图



a. pH 2.5 的色谱图; b. pH 3 的色谱图; c. pH 3.5 的色谱图

图 5 不同 pH 的色谱图

[4] 贞张君,王慧静,孙梓宜,等. 基于网络药理学和分子对接探讨葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 云南中医学院学报,2021,44(2):65-74.

[5] 高妍,周海芳,刘朵,等. 黄柏化学成分分析及其药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2019,15(4):207-209.

[6] 何巧玉,刘静,李春霞,等. 基于网络药理学和指纹图谱的黄柏质量标志物预测分析[J]. 中草药,2021,52(16):

4931-4941.

[7] 孙莉莉. 高效液相色谱法测定三黄胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 抗感染药学,2008,5(1):21-24.

[8] 王雷,于荣. HPLC 波长切换法同时测定三黄胶囊中 7 种成分的含量[J]. 中国药事,2016,30(11):1100-1106.

(收稿日期:2023-04-19)