

小茴香、菊花和鱼腥草的摄取水平均超过 5 %TDI, 总体药材的平均摄入水平占可容忍摄入量的 34.6 %。但以上情况均按照药材摄入量为 100 %计算, 实际生活中药材多以水煎液、茶饮等形式服食, 这些途径可能可以降低药材中重金属的摄取量。水煎液等其他形式的镍含量状况有待进一步研究。药材镍的日平均摄取量未超过 WHO 规定的可容忍摄入量 (TDI), 但远超过 5 %TDI, 市售药食同源茯苓等 10 种药材中镍含量偏高, 对于经常服用药食同源药材的民众, 需引起重视。

参考文献:

- [1] 雷毅雄, 陈家堃, 吴中亮, 等. 3 种镍化合物转化细胞中 DNA 损伤的研究[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(5): 392-394.
- [2] International Agency for Research on Cancer. Nickel and nickel compounds summaries and evaluation[R]. IARC: 1990.
- [3] 孙英彪, 朱玉真. 镍致小鼠中枢神经毒性机制的研究[J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16(3): 165-166.
- [4] 党毅, 肖颖. 中药保健食品研制与开发[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 3-4.
- [5] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 488-492.
- [6] 中华人民共和国卫生部 / 中国国家标准化管理委员会. 人造奶油卫生标准 GB15196-2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [7] 傅逸根, 胡欣, 俞苏霞. 食品中镍限量卫生标准的研究[J]. 浙江省医学科学院学报, 1999, 37: 9-11.
- [8] World Health Organization. Guideline for drinking water quality, second ed., volume 1, Recommendations[R]. WHO: 1997.
- [9] 食品安全国家标准. 食品中污染物限量标准(征求意见稿)编制说明[Z]. 中华人民共和国卫生部, 2010.

(编辑: 宋威)

双波长高效液相色谱法测定三黄颗粒中黄芩苷、小檗碱的含量

张 荣, 段美美(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 建立同时测定三黄颗粒中黄芩苷、小檗碱含量的 HPLC 法。**方法** 采用 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相, 以甲醇-0.1 %磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 25 °C, 进样量: 10 μL, 检测波长: 黄芩苷为 280 nm, 盐酸小檗碱为 345 nm。**结果** 黄芩苷、小檗碱的线性范围分别为 0.2048~2.0480 μg ($r=0.9999$), 0.2160~2.160 μg ($r=0.9999$); 平均加样回收率分别为 99.89 %、99.98 %, RSD 分别为 1.45 %、1.76 %。**结论** 本方法操作简便快捷, 结果准确可靠, 重复性好, 可用于三黄颗粒的质量控制。

关键词: 三黄颗粒; 黄芩苷; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0183-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.021

Determination of Baicalein and Berberin Content in Sanhuang Granules by Double Wavelength HPLC

ZHANG Rong, DUAN Meimei (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC method for the simultaneous determination of baicalein and berberin in Sanhuang Granules. **Methods** The HPLC analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (250mm × 4.60 mm, 5 μm) with methanol-water (0.1 % phosphonic acid) as mobile phase in gradient elution. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ and the ultraviolet detector was operated at 280 nm for Baicalein and 345 nm for Berberin, respectively. **Results** Baicalein and berberin showed good linearity in the range of 0.2048~2.0480 μg ($r=0.9999$) and 0.2160~2.160 μg ($r=0.9999$) respectively. The average recoveries of adding sample were 99.89 % and 99.98 %, respectively and RSD ($n=6$) was 1.45 %, and 1.76 %, respectively. **Conclusion** The established method is simple, accurate and repro-

收稿日期: 2012-11-07

作者简介: 张荣, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药有效性与安全性评价。Email: zhangrong@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省“211 工程”三期重点学科建设项目—药物警戒系统中的中药再评价(粤发改社[2009]972 号)。

ducible, which is suitable for the determination of baicalein and berberin in *Sanhuang* Granules.

Keywords: *Sanhuang* Granules; Baicalein; Berberin; HPLC

三黄颗粒是由黄芩、黄连、黄柏等多种药味组成的中药复方制剂,具有清热解毒、泻火通便之功效。主要用于治疗三焦热盛所致的目赤肿痛、口鼻生疮、咽喉肿痛、尿黄、便秘等。为有效控制该制剂质量,确保疗效的稳定,建立了三黄颗粒中主要有效成分黄芩苷、小檗碱的HPLC含量测定方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱仪,配有UV检测器,LC-20AT泵,柱温箱,SIL-20A自动进样器,Labsolution色谱工作站,日本岛津公司;CP225D电子分析天平,AB204-N电子分析天平,德国METTLER TOLEDO公司;WFH-203三用紫外分析仪,上海精科实业有限公司。

1.2 试药 三黄颗粒由广州中医药大学新药开发研究中心提供;黄芩苷对照品(批号:110715-201016)、小檗碱对照品(批号:110322),中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯,德国Merck公司;水为超纯水,Milli-Q型纯水制备机制备;其他试剂均为市售分析纯,广州化学试剂公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm × 4.60 mm, 5 μm);流动相:A为甲醇,B为0.1%磷酸水溶液,按表1程序进行梯度洗脱;流速为1.0 mL·min⁻¹;柱温为25℃;进样量10 μL,检测波长:黄芩苷为280 nm,小檗碱为345 nm。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~20	40	60
20~30	40→55	60→45
30~40	55	45
40~45	55→40	45→60

2.2 溶液的准备

2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品、盐酸小檗碱对照品适量,精密称定(黄芩苷5.12 mg,盐酸小檗碱5.40 mg),分别置于5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得1.024 mg·mL⁻¹的黄芩苷对照品储备液和1.080 mg·mL⁻¹的盐酸小檗碱对照品储备

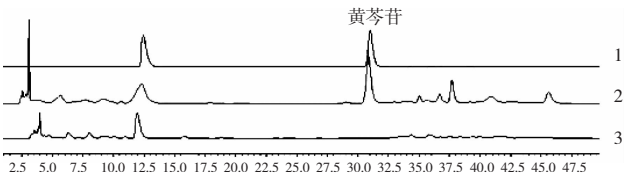
液。

分别精密量取黄芩苷和盐酸小檗碱对照品储备液各1 mL,置于10 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每1 mL含黄芩苷0.102 mg,盐酸小檗碱0.108 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取三黄颗粒0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇100 mL,称定质量,超声处理(功率250 W,频率35 kHz)15 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 分别按处方量称取除黄芩或黄连、黄柏外的全方药材,粉碎过4号筛,精密称取0.5 g,按照2.2.2项下方法,分别制备黄芩阴性及黄连、黄柏阴性对照溶液。

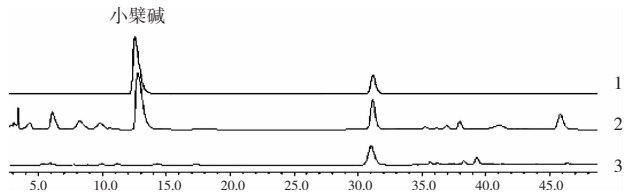
2.3 专属性试验 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液,阴性对照溶液适量,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,10 μL进样检测分析。在上述选定的色谱条件下,小檗碱和黄芩苷可达基线分离,且阴性样品无干扰。理论塔板数按黄芩苷计算不低于2500,按小檗碱峰计算不低于5000,见图1和图2。



1. 黄芩苷对照品; 2. 供试品溶液; 3. 黄芩阴性对照

图1 黄芩苷 HPLC 图谱(280 nm)

Figure 1 HPLC results for of baicalein(280 nm)



1. 小檗碱对照品; 2. 供试品溶液; 3. 黄连、黄柏阴性对照

图2 盐酸小檗碱 HPLC 图谱(345 nm)

Figure 2 HPLC results for berberin

2.4 线性关系考察 取混合对照品溶液适量,0.45 μm微孔滤膜滤过,在上述选定色谱条件下,分别进样2, 4, 8, 12, 16, 20 μL,测定峰面积,以

黄芩苷、小檗碱的进样量(μg)为横坐标, 其对应峰面积($\text{mAu} \times \text{sec}$)为纵坐标进行线性回归, 得黄芩苷回归方程 $Y = 3323939.50X + 1558.85$, $r = 0.9999$, 线性范围: $0.2048 \sim 2.0480 \mu\text{g}$; 小檗碱回归方程 $Y = 3563917.54X - 3261.40$, $r = 0.9999$, 线性范围: $0.2160 \sim 2.160 \mu\text{g}$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取黄芩苷、盐酸小檗碱混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 连续重复进样 6 次, 测得峰面积, 黄芩苷和盐酸小檗碱的 RSD 分别为 0.24% 、 0.47% , 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液 $10 \mu\text{L}$, 在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按上述色谱方法测定峰面积, 黄芩苷和小檗碱峰 RSD 分别为 0.89% 、 1.32% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样品(批号: 20120315), 共 6 份, 分别精密称定, 按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 黄芩苷、小檗碱的 RSD 分别为 1.52% 、 1.74% , 表明测定方法重复性良好。

2.8 回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号: 20120315)共 6 份, 每份 0.5 g , 分别精密加入黄芩苷对照品 15.0018 mg , 盐酸小檗碱对照品 12.0023 mg , 按照 2.2.2 项下方法制备样品溶液, 并按上述色谱条件进行测定, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验($n=6$)

Table 2 Results of average recovery test for baicalin and berberin in Sanhuang Granules($n=6$)

	序号	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
黄芩苷	1	0.5012	14.8957	15.0018	29.5775	97.87	99.89	1.45
	2	0.5003	14.8689	15.0018	29.8927	100.15		
	3	0.5026	14.9373	15.0018	29.8521	99.42		
	4	0.5035	14.9640	15.0018	30.3158	102.33		
	5	0.5007	14.8808	15.0018	29.8756	99.95		
	6	0.5019	14.9165	15.0018	29.8603	99.61		
小檗碱	1	0.5046	11.5150	12.0023	23.8173	102.50	99.98	1.76
	2	0.5011	11.4351	12.0023	23.4289	99.93		
	3	0.5019	11.4534	12.0023	23.1557	97.50		
	4	0.5026	11.4693	12.0023	23.3316	98.83		
	5	0.5031	11.4807	12.0023	23.6330	101.25		
	6	0.5008	11.4283	12.0023	23.4116	99.84		

2.9 样品测定 采用上述供试品溶液制备方法和色谱方法, 对 3 批三黄颗粒样品(批号分别为 20120315、20120318、20120321)进行测定, 结果见表 3。

表 3 三黄颗粒样品测定($n=3$)

Table 3 Results of content determination for baicalin and berberin in 3 batches of samples($n=3$)

批号	黄芩苷		小檗碱	
	测定含量/ μg	换算含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	测定含量/ μg	换算含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
20120315	1.486 ± 0.094	29.723 ± 1.871	1.140 ± 0.124	22.820 ± 2.492
20120318	1.485 ± 0.111	29.695 ± 2.134	1.138 ± 0.118	22.763 ± 2.374
20120321	1.492 ± 0.126	29.832 ± 2.515	1.139 ± 0.094	22.785 ± 1.861

3 讨论

三黄颗粒是由黄芩、黄连、黄柏等多种药味组成的中药复方制剂, 黄芩苷为黄芩的主要有效成分, 具有抑菌、利尿、抗炎、抗变态及解痉的作用, 并且具有较强的抗癌作用^[1]。盐酸小檗碱为黄连、黄柏的主要有效成分, 具有明显的抗菌、抗病毒、降糖及抗肿瘤功效^[2]。此两种成分的药理作用与三黄颗粒的药学作用相一致, 考虑为制剂中的主要有效成分, 为确保制剂疗效的稳定, 故选用黄芩苷、盐酸小檗碱作为三黄颗粒含量测定的质控指标。

经全波长紫外扫描分析, 黄芩苷和盐酸小檗碱分别在 280 nm 和 345 nm 波长处有最大吸收, 二者难以在同一波长处测定, 故本试验采用双波长法, 分别选择两种成分各自最大吸收波长作为检测波长。

本制剂由多味中药组成, 方中干扰成分较多, 曾参照文献及《中国药典》、《中药化学》^[3-6]方法对黄芩苷、小檗碱进行分离, 结果发现复方中其他成分对两者存在干扰, 考虑到黄芩苷与盐酸小檗碱的化学性质差异较大, 采用等梯度洗脱不能获得理想的效果, 故采用梯度洗脱, 比较了甲醇-水、乙腈-水等不同的流动相系统, 并加入磷酸、冰醋酸等作为改性剂, 结果表明在本文最终所采用的以甲醇- 0.1% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱条件下, 制剂中的黄芩苷、小檗碱峰形对称, 与其他杂质峰能够达到完全分离, 且阴性样品无干扰, 获得了良好的效果。

参考文献:

[1] 雷芳. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2010, 19(15): 87.
[2] 刘金保, 周杰. 黄连解毒汤药理作用的研究进展[J]. 中国现代临床医学杂志, 2008, 7(3): 9.
[3] 张国庆, 杨更亮, 李志伟, 等. 安宫牛黄胶囊中的黄芩苷和盐酸小檗碱的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(3): 176.
[4] 李洁, 彭国克, 马彦, 等. 清消泡腾片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 疾病控制杂志, 2002, 6(4): 349.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 282, 285, 286.
[6] 匡海学. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 1.

(编辑: 宋威)