

# 万氏牛黄清心丸中黄芩甙及小檗碱的 高效液相色谱条件优化及分离测定

承 新

陈玉英 胡育筑 杨清华

(中国科技大学生物系 合肥 230027)

(中国药科大学分析化学教研室 南京 210009)

**摘要** 用高效液相色谱法(HPLC)分离测定万氏牛黄清心丸中的黄芩甙和小檗碱组分,建立了色谱优化指标 NCRF,用均匀设计法设计色谱条件进行实验,并对实验结果进行逐步多元回归分析,获得最佳色谱条件为乙腈:水=25:75;pH 2.60,含 0.7%三乙胺。色谱柱为 Spherisorb C<sub>18</sub>,5 $\mu$ (250 $\times$ 4.6mm),结果令人满意。

**关键词** 高效液相色谱法,小檗碱,黄芩甙,万氏牛黄清心丸,流动相最佳化

## 1 前言

随着对中成药研究的深入,高效液相色谱法(HPLC)越来越多地用于中成药有效成分的分离分析。中成药中的组分一般较复杂,使色谱条件的优化变得尤为重要<sup>[1]</sup>。本文用均匀设计法<sup>[2]</sup>设计了分离万氏牛黄清心丸中有效成分黄芩甙及小檗碱的实验,提出了改进的优化指标 NCRF,并用多元逐步回归分析了实验结果,得到了优化的色谱条件,成功地用于万氏牛黄清心丸中黄芩甙及小檗碱的定量测定。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器及试剂

Waters 高效液相色谱仪,510 泵,490 紫外可变波长检测器,U6K 进样器,680 程序梯度洗脱控制器,色谱柱。

盐酸小檗碱,黄芩甙(中国药品生物制品检定所提供),万氏牛黄清心丸(市售,天津达仁堂制药厂),乙腈(色谱纯),其它试剂均为分析纯。

### 2.2 样品处理

取市售万氏牛黄清心丸两丸,剪碎。称取约相当于一丸的量,加一倍量的硅藻土,研磨均匀,精确称定,放入滤纸筒中,置于索氏提取器内。用 50mL 甲醇连续回流 8h,冷却,浓缩,定容到 50mL。过滤,取续滤液适量稀释,用 Millipore 样品溶液过滤器过滤,用于 HPLC 分析,每次进样 10 $\mu$ L。

万氏牛黄清心丸模拟样品的制备:分别取市售药材粉碎过筛以后,按处方比例称取粉末适量,混匀

即可。

## 3 结果与讨论

### 3.1 分离条件的确立

#### 3.1.1 优化指标的设计

在中成药的研究中,由于组分复杂,各组分的极性相差较大,要求在被测组分之间有足够分离度的情况下,能分出尽可能多的峰数,同时峰不对称因子也列入优化范围,因此,本文在卢佩章<sup>[3]</sup>HCRF 的基础上,提出:

$$NCRF = N + \prod \frac{R_i}{R_{id}} \times f \times \frac{100 - t}{\alpha}$$

式中, $N$ :色谱峰数目; $R_i$ :被测组分峰分离度; $R_{id}$ :理想峰对分离度; $f$ :最后峰不对称因子; $t$ :最后峰保留时间; $\alpha$ :权重因子, $\alpha=5,10,\dots$ 。

由该色谱优化指标可以看出,色谱峰数  $N$  越大,则 NCRF 越高,表示该色谱条件越佳;而相邻峰对分离度、最后峰不对称因子以及保留时间等条件则互相约束,在  $N$  相同的情况下,这三方面只有综合作用达到最佳时才能获得最好的分离效果。因此,NCRF 能较全面地反映对色谱分离的要求。

#### 3.1.2 色谱条件的优化

通过初始实验,选定乙腈浓度、pH 值、三乙胺添加量为三因素,根据均匀设计表  $U_7(7^6)$ (见表 1)设计实验<sup>[2]</sup>,并根据实验结果计算优化函数值(见表 2)。

对于均匀设计的实验结果用逐步多元回归分析处理<sup>[4]</sup>。根据三因素七水平均匀设计实验的实验条

件及结果,建立方程模型为  $Y = a_1X_1^2 + a_2X_2^2 + a_3X_3^2 + a_4X_1 + a_5X_2 + a_6X_3 + a_7$ , 式中  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分别代表流动相的组成、pH 值以及三乙胺添加量,  $Y$  代表优化指标 NCRF 的值。

表 1 三因素七水平均匀设计表

试验号	因素 1	因素 2	因素 3
1	1	2	3
2	2	4	6
3	3	6	2
4	4	1	5
5	5	3	1
6	6	5	4
7	7	7	7

表 2 优化实验设计及结果

乙腈(%)	pH	三乙胺(%)	HCRF	NCRF
22	3.40	3	1204656	12.538
24	5.37	6	1103434	11.537
26	7.00	2	700902	7.044
28	2.52	5	1204810	13.679
30	4.60	1	1003807	10.347
32	6.48	4	501066	5.436
34	7.35	7	502060	6.047

把优化指标 HCRF 值代入,则建立的回归方程为:  $Y = -445.7X_1^2 - 11928.5X_2^2 + 1602371$ , 不能很好地预测流动相的组成。

把本文提出的优化指标 NCRF 代入,则建立的回归方程为:  $Y = -0.043X_1^2 - 0.148X_2^2 + 0.231X_3^2 + 2.114X_1 - 1.376X_3 - 9.975$ , 即:  $Y = -0.043(X_1 - 24.6)^2 - 0.148X_2^2 + 0.231(X_3 - 2.98)^2 + 13.99$ , 相关系数  $\gamma = 0.9982$ 。

由于反相 HPLC 要求流动相 pH > 2.50, 实验中三乙胺在流动相中的添加量  $\leq 0.7\%$ , 因此, 选择乙腈浓度为 24.6%, pH 2.60 和三乙胺浓度为 0.7% 作为色谱条件, 获得了最好的分离效果(图 1)。

### 3.2 干扰因素的考察

分别配制不含黄芩及黄连的空白模拟样品, 按 2.2 项的方法提取, 分离测定。结果表明, 在小檗碱及黄芩甙的相应位置上未见其它干扰峰。

### 3.3 标准曲线的建立

分别取不同浓度的小檗碱及黄芩甙标准溶液, 在相同条件下进行 HPLC 测定, 按峰面积对浓度回归, 得标准工作曲线: 黄芩甙为  $Y = 4.084 \times 10^4 + 3.016 \times 10^7 C$ , 相关系数 0.9995, 线性范围 0.01 ~ 0.12 mg/mL; 小檗碱为  $Y = -3.171 \times 10^4 + 3.083 \times$

$10^7 C$ , 相关系数 0.9998, 线性范围 0.01 ~ 0.10 mg/mL。式中  $Y$  是峰面积,  $C$  是浓度 (mg/mL)。

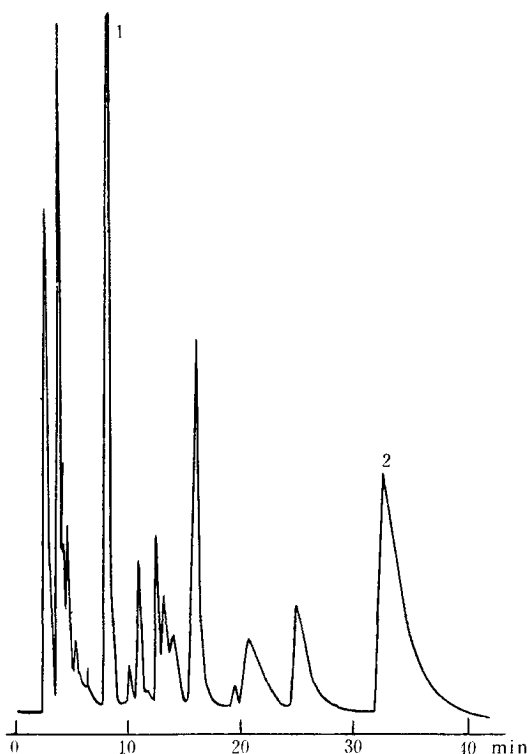


图 1 万氏牛黄清心丸色谱图

柱: Spherisorb  $C_{18}$ , 5  $\mu$ ; 流动相: ACN : H<sub>2</sub>O (pH 2.60, 7% 三乙胺) = 25 : 75; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 274 nm; 保留时间:  $t_{R1} = 5.052$  min,  $t_{R2} = 23.707$  min。

峰: 1. 黄芩甙, 2. 小檗碱。

### 3.4 回收率的测定

取已测定黄芩甙、小檗碱含量的市售成药两丸, 剪碎。称取约相当于一丸的量, 加一倍量的硅藻土, 研磨均匀, 精确称定, 放入滤纸筒中, 分别加入不同量的黄芩甙及小檗碱标准品, 按 2.2 项的方法分析测定, 回收率测定结果见表 3、表 4。

表 3 黄芩甙加样回收率测定结果

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.598	0.603	100.8		
1.000	0.989	98.9		
2.270	2.279	100.4	99.7	0.95
3.310	3.263	98.6		

回收率计算公式为:

$$\text{回收率} = \frac{\text{测得量 (mg)}}{\text{加入量 (mg)}} \times 100\%$$

测得量 = 测得总量 (mg) - 样品中该组分的量 (mg)。

碱的含量。五次测定四批万氏牛黄清心丸的结果及相对标准偏差列于表 5。

表 4 小檗碱加样回收率测定结果

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.564	0.547	97.1	98.0	1.20
0.920	0.924	100.5		
2.140	2.092	97.7		
3.010	2.915	96.8		

参 考 文 献

- 1 胡育筑. 色谱, 1991, 9(1): 25
- 2 王 鹏, 王玉珠, 沈建民. 沈阳药学院学报, 1989, 6(4) 297
- 3 Lu Peichang, Huang Hongxin. J Chromatogr Sci, 1989, 27: 690
- 4 刘世庆编著. 多元逐步回归分析, 微机用多元统计分析软件. 成都: 四川科学技术出版社, 1986

3.5 样品测定结果及精密度

用外标法测定万氏牛黄清心丸中黄芩甙及小檗

表 5 万氏牛黄清心丸中黄芩甙与小檗碱的含量测定

批 号	黄芩甙测定值 (mg/g)					平均值 (mg/g)	RSD (%)
910702	10.23	9.99	10.26	10.32	10.56	10.28	2.03
900828	9.14	9.10	9.24	9.18	8.98	9.13	1.08
910101	8.52	8.43	8.52	8.58	8.64	8.54	0.93
890415	13.31	12.80	12.91	13.21	12.86	13.02	1.76
	小檗碱测定值 (mg/g)					平均值 (mg/g)	RSD (%)
910702	11.25	10.99	11.05	11.23	11.16	11.13	1.02
900828	10.21	10.28	10.39	10.53	10.42	10.37	1.18
910101	11.36	11.12	11.02	11.37	11.30	11.23	1.39
890415	10.01	10.17	10.06	10.28	10.23	10.15	1.12

## Optimization and Determination of Berberine and Baicalin in Wanshi Niu Huang Qingxin Wan by High Performance Liquid Chromatography

Cheng Xin

(Dept. of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei, 230027)

Chen Yuying, Hu Yuzhu and Yang Qinghua

(Dept. of Analytical Chemistry, Chinese Pharmaceutical University, Nanjing, 210009)

A reversed-phase high performance liquid chromatographic method was developed to separate and determine berberine and baicalin in Wanshi Niu Huang Qingxin Wan, an improved chromatographic function NCRF was proposed. The step-regression analysis was used in calculating the uniform-design experimental results to estimate the optimized mobile phase. A 10  $\mu$ L portion was injected into a column (250  $\times$  4.6 mm) of Spherisorb C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m), with CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (25 : 75, containing 0.7% Triethylamine, pH 2.60) as mobile phase (1.0 mL/min) and UV detection at 274 nm.

**Key words** high performance liquid chromatography, berberine, baicalin, Wanshi Niu Huang Qingxin Wan, optimization of mobile phase