

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.16.018

高效液相色谱法同时测定湿润烧伤膏中 12 种成分含量

虞 娅,刘小卫,蒋 蕾

(重庆市南川区中医医院,重庆 408400)

摘要:目的 建立同时测定湿润烧伤膏中 12 种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 测定 5 种黄酮类成分(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A)含量,色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 275 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 10 μL;测定 7 种生物碱类成分(黄柏碱、木兰花碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀)含量,色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 至 4.0)-乙腈(65:35,V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 345 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、黄柏碱、木兰花碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱及巴马汀的质量浓度分别在 0.099~1.988 mg/mL($r=0.998\ 5$)、0.025~0.500 mg/mL($r=0.999\ 0$)、0.020~0.406 mg/mL($r=0.999\ 5$)、0.005~0.099 mg/mL($r=0.999\ 6$)、0.005~0.103 mg/mL($r=0.998\ 1$)、0.037~0.736 mg/mL($r=0.999\ 5$)、0.070~1.392 mg/mL($r=0.996\ 8$)、0.153~3.054 mg/mL($r=0.999\ 6$)、0.079~1.583 mg/mL($r=0.999\ 6$)、0.050~0.998 mg/mL($r=0.999\ 4$)、0.511~10.219 mg/mL($r=0.999\ 7$)、0.146~2.911 mg/mL($r=0.997\ 6$)范围内与峰面积线性关系良好;检测限为 0.001~0.043 μg,定量限为 0.003~0.130 μg;精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率为 98.71%~99.90%,RSD 为 0.06%~1.24%($n=6$)。结论 该方法操作简便,结果准确,稳定性、重复性好,可用于同时测定湿润烧伤膏中上述 12 种成分的含量。

关键词:高效液相色谱法;同时测定;湿润烧伤膏;黄酮类成分;生物碱类成分

中图分类号:R917;R927.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)16-0073-05

Simultaneous Determination of 12 Components in Moist Exposed Burn Ointment by HPLC

TUO Ya,LIU Xiaowei,JIANG Lei

(Chongqing Nanchuan Traditional Chinese Medicine Hospital,Chongqing,China 408400)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of 12 components in Moist Exposed Burn Ointment (MEBO). **Methods** The contents of five flavonoids (baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and oroxylin A) were determined, the chromatographic column was Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 275 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. The contents of seven alkaloids (phellodendrine, magnoflorine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine, berberine and palmatine) were determined, the chromatographic column was Agilent Zorbax SB C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjust the pH of phosphoric acid to 4.0)-acetonitrile (65:35, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 345 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A, phellodendrine, magnoflorine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine, berberine and palmatine were 0.099-1.988 mg/mL ($r=0.998\ 5$), 0.025-0.500 mg/mL ($r=0.999\ 0$), 0.020-0.406 mg/mL ($r=0.999\ 5$), 0.005-0.099 mg/mL ($r=0.999\ 6$), 0.005-0.103 mg/mL ($r=0.998\ 1$), 0.037-0.736 mg/mL ($r=0.999\ 5$), 0.070-1.392 mg/mL ($r=0.996\ 8$), 0.153-3.054 mg/mL ($r=0.999\ 6$), 0.079-1.583 mg/mL ($r=0.999\ 6$), 0.050-0.998 mg/mL ($r=0.999\ 4$), 0.511-10.219 mg/mL ($r=0.999\ 7$) and 0.146-2.911 mg/mL ($r=0.997\ 6$), respectively. The limit of detection (LOD) was in the range of 0.001-0.043 μg. The limit of quantitation (LOQ) was in the range of 0.003-0.130 μg. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0%. The average recoveries were in the range of 98.71%-99.90% with RSDs of 0.06%-1.24% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, stable and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of the above 12 components in MEBO.

Key words: HPLC; simultaneous determination; Moist Exposed Burn Ointment; flavonoids; alkaloids

湿润烧伤膏是由黄连、黄柏、黄芩、地龙及罂粟壳制成的软膏剂,呈浅棕黄色至深棕黄色,具有麻油香气,具有清热解毒、止痛和生肌等功效,临床主要用于各种烧、烫、灼伤的治疗。临床药理学研究表明,其还对

压疮、湿疹及糖尿病性皮肤病溃疡有较好疗效^[1-4]。湿润烧伤膏收载于国家药品标准[WS₃-043(Z-005)-2002(Z)],其中仅要求对盐酸小檗碱及黄芩素进行定量检测。目前,尚未见湿润烧伤膏中有效成分含量的相

关研究。为此,本研究中建立了测定湿润烧伤膏中5种黄酮类化合物(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素A)及7种生物碱类成分(黄柏碱、木兰花碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀)含量的高效液相色谱(HPLC)法,为该制剂质量评价及标准提升提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司); AB135-S型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司); SK8210 HP型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

湿润烧伤膏(汕头市美宝制药有限公司,批号分别为190805,190806,191101,191202,200504,200508,200701,200802,200803,200805,规格为每支40 g);盐酸巴马汀对照品(批号为110732-201812,含量97.6%),盐酸黄柏碱对照品(批号为111895-201805,含量94.9%),盐酸黄连碱对照品(批号为112026-201802,含量94.0%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201613,含量86.8%),盐酸药根碱对照品(批号为110733-201609,含量89.5%),黄芩苷对照品(批号为110715-201821,含量95.4%),汉黄芩苷对照品(批号为112002-201501,含量98.9%),黄芩素对照品(批号为111595-201607,含量98.5%),汉黄芩素对照品(批号为111514-201605,含量96.5%),均购自中国食品药品检定研究院;盐酸表小檗碱对照品(批号为PB0043),氯化木兰花碱对照品(批号为PX0026),均购自成都普利斯生物科技有限公司,含量均大于98%;千层纸素A对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为100826,含量98%);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。黄连(批号为200510)、黄柏(批号为20201005)、黄芩(批号为191103)、地龙(批号为20190912)、罂粟壳(批号为201101-1)饮片均购自安徽亳州药材大市场,经重庆市南川区中医医院胡沈星副主任药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

5种黄酮类成分:色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min时8%A→18%A,5~12 min时18%A,12~20 min时18%A→25%A,20~32 min时25%A→40%A,32~50 min时40%A→55%A,50~60 min时55%A,60~70 min时55%A→8%A);流速为1.0 mL/min;检测波长为275 nm;柱温为35℃;进样量为10 μL。

7种生物碱类成分:色谱柱为Agilent Zorbax SB C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(磷酸调pH至4.0)-乙腈(65:35, V/V);流速为1.0 mL/min;检测波长为345 nm;柱温为30℃;进样量为10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素A对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为4.970,1.250,1.014,0.249,0.258 mg/mL的混合对照品贮备液I;精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得混合对照品溶液I。分别取盐酸黄柏碱、氯化木兰花碱、盐酸黄连碱、盐酸表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为1.839,3.479,7.634,3.956,2.495,25.547,7.276 mg/mL的混合对照品贮备液2,精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得混合对照品溶液II。

供试品溶液:取样品约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水饱和正丁醇50 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz,下同)处理60 min,放冷,滤过,再次称定质量,用水饱和正丁醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按湿润烧伤膏处方工艺及比例,分别制得缺黄芩和缺黄连、黄柏的阴性样品,按供试品溶液制备方法,分别制成缺黄芩的阴性对照品溶液I和缺黄连及黄柏的阴性对照品溶液II。

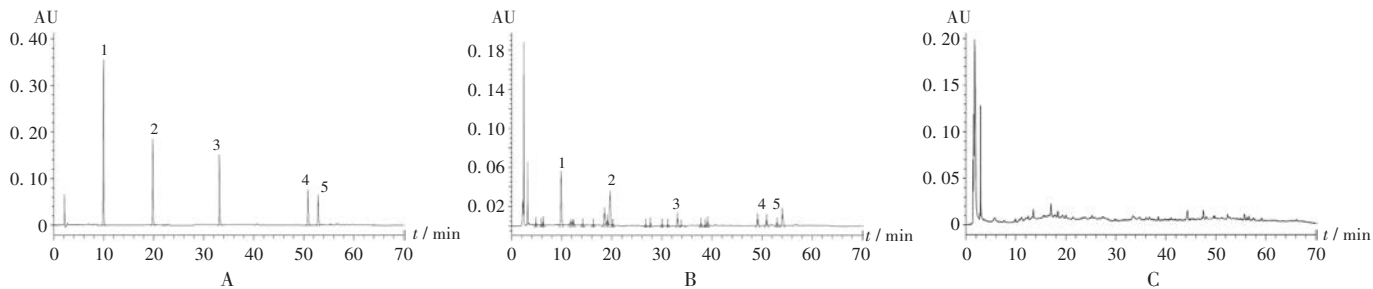
2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取2.2项下各溶液适量,按2.1项下相应色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液I和II色谱相应位置有吸收峰。理论板数按黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素A峰计均应不低于5 000,按小檗碱、黄连碱、黄柏碱及药根碱峰计均应不低于4 500,分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图1和图2。

线性关系考察:取混合对照品贮备液I和II,加70%甲醇溶液分别制成系列混合对照品溶液,按2.1项下相应色谱条件进样测定,记录峰面积。以各成分质量浓度(X, mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,回归方程及线性范围见表1。

检测限与定量限考察:精密吸取混合对照品溶液I和II,加70%甲醇倍比稀释,按2.1项下相应色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的进样量分别记作检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验:取供试品溶液适量,按2.1项下相应

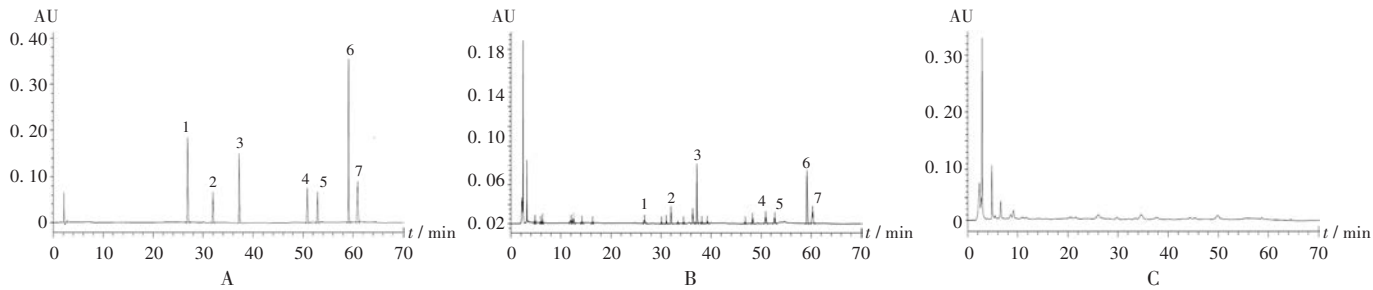


1. 黄芩苷 2. 汉黄芩苷 3. 黄芩素 4. 汉黄芩素 5. 千层纸素 A
A. 混合对照品溶液 I B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液 I

图1 黄酮类成分高效液相色谱图

1. Baicalin 2. Wogonoside 3. Baicalein 4. Wogonin 5. Oroxylin A
A. Mixed reference solution I B. Test solution C. Negative reference solution I

Fig. 1 HPLC chromatograms of flavonoids



1. 黄柏碱 2. 木兰花碱 3. 黄连碱 4. 表小檗碱 5. 药根碱 6. 小檗碱 7. 巴马汀
A. 混合对照品溶液 II B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液 II

图2 生物碱类成分高效液相色谱图

1. Phellodendrine 2. Magnoflorine 3. Coptisine 4. Epiberberine 5. Jatrorrhizine 6. Berberine 7. Palmatine
A. Mixed reference solution II B. Test solution C. Negative reference solution II

Fig. 2 HPLC chromatograms of alkaloids

表1 方法学考察结果(n=6)

Tab. 1 Results of the methodological investigation (n=6)

待测成分	回归方程	r	线性范围	检测限	定量限	精密度试验	稳定性试验	重复性试验		加样回收试验	
			(mg/mL)	(μg)	(μg)	的RSD(%)	的RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
黄芩苷	$Y_1 = 5.65 \times 10^2 X_1 + 1.65$	0.998 5	0.099~1.988	0.014	0.045	0.21	0.43	12.336	0.81	99.79	0.20
汉黄芩苷	$Y_2 = 6.04 \times 10^3 X_2 + 1.09$	0.999 0	0.025~0.500	0.007	0.022	0.32	0.91	3.118	0.83	99.43	0.84
黄芩素	$Y_3 = 3.98 \times 10^4 X_3 - 6.03$	0.999 5	0.020~0.406	0.005	0.016	0.50	0.56	2.230	0.62	98.96	1.24
汉黄芩素	$Y_4 = 1.03 \times 10^3 X_4 + 1.61$	0.999 6	0.005~0.099	0.002	0.005	0.36	1.03	0.558	1.20	98.98	0.53
千层纸素A	$Y_5 = 7.03 \times 10^2 X_5 - 2.03$	0.998 1	0.005~0.103	0.001	0.003	0.82	1.41	0.450	1.54	98.71	1.07
黄柏碱	$Y_6 = 6.66 \times 10^2 X_6 - 4.68$	0.999 5	0.037~0.736	0.011	0.034	0.34	0.50	4.328	1.00	99.38	0.60
木兰花碱	$Y_7 = 1.34 \times 10^2 X_7 + 2.03$	0.996 8	0.070~1.392	0.015	0.046	0.48	0.68	8.360	1.18	99.66	0.36
黄连碱	$Y_8 = 9.84 \times 10^2 X_8 + 3.69$	0.999 6	0.153~3.054	0.036	0.112	0.22	1.20	18.674	0.52	99.78	0.07
表小檗碱	$Y_9 = 6.07 \times 10^3 X_9 + 1.36$	0.999 6	0.079~1.583	0.020	0.063	0.30	0.66	9.365	0.93	99.55	0.17
药根碱	$Y_{10} = 7.03 \times 10^3 X_{10} - 3.38$	0.999 4	0.050~0.998	0.013	0.041	0.21	0.71	5.680	0.38	99.82	0.06
小檗碱	$Y_{11} = 3.82 \times 10^4 X_{11} + 4.36$	0.999 7	0.511~10.219	0.026	0.082	0.33	0.60	65.611	0.50	99.90	0.08
巴马汀	$Y_{12} = 3.98 \times 10^3 X_{12} + 1.87$	0.997 6	0.146~2.911	0.043	0.130	0.52	1.04	16.975	1.27	99.69	0.11

色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果见表1,表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液适量,分别于室温下放置0,3,6,9,12,15,18,24 h后,按2.1项下相应色谱条

件进样测定,记录峰面积。结果见表1,表明室温下供试品溶液放置24 h内稳定。

重复性试验:取样品适量,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下相应色谱条件进样测

表2 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of 12 components in samples (mg/g, n=3)

待测成分	190805	190806	191101	191202	200504	200508	200701	200802	200803	200805
黄芩苷	12.326	12.328	12.330	12.256	12.327	12.526	12.427	12.390	12.389	12.346
汉黄芩苷	3.125	3.164	3.190	3.167	3.132	3.127	3.126	3.131	3.147	3.137
黄芩素	2.235	2.229	2.231	2.225	2.231	2.219	2.230	2.226	2.223	2.224
汉黄芩素	0.564	0.584	0.572	0.574	0.569	0.570	0.568	0.572	0.573	0.568
千层纸素A	0.452	0.457	0.458	0.452	0.456	0.456	0.446	0.448	0.442	0.455
黄柏碱	4.326	4.320	4.353	4.367	4.378	4.3603	4.320	4.328	4.345	4.350
木兰花碱	8.364	8.299	8.254	8.375	8.308	8.4152	8.372	8.359	8.364	8.331
黄连碱	18.669	18.757	18.686	18.708	18.662	18.692	18.682	18.751	18.703	18.640
表小檗碱	9.364	9.356	9.375	9.355	9.360	9.365	9.371	9.372	9.361	9.364
药根碱	5.686	5.652	5.623	5.666	5.681	5.712	5.725	5.690	5.701	5.688
小檗碱	65.601	65.553	65.354	65.458	65.625	65.603	65.582	65.635	65.591	65.613
巴马汀	16.983	17.213	17.023	16.932	17.139	17.103	17.128	17.223	17.135	17.038

定,记录峰面积,并计算各成分含量。结果见表1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品1.0 g,精密称定,平行6份,置具塞锥形瓶中,每份精密加入2.2项下相应混合对照品贮备液I和II各2.5 mL,再按2.2项下供试品溶液制备方法处理,按2.1项下相应色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取样品10批,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下相应色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算12种成分的含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 成分解析

黄连、黄芩同属苦寒之品,有清热燥湿、泻火解毒之功效,黄连偏泻心胃之火,黄芩善解肺及大肠之热,二者常配对使用,以协同发挥疗效^[5]。黄芩中主要含有黄酮类、木脂素和挥发油等多种成分,其中黄酮类化合物为其主要药理活性成分,如黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素A等^[6]。药理学研究表明,黄芩素可抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡,黄芩苷具有抗氧化、抗心肌缺血、抗肿瘤及抗炎等功效,汉黄芩素可抑制多种肿瘤细胞生长增殖^[7-11]。黄连的主要活性成分为表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀等异喹啉类生物碱,具有抗菌、消炎、增强机体免疫功能、抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡等作用^[12-14]。黄连-黄芩配伍主治上焦、中焦火邪及清热毒,黄柏则入肾经、大肠经、膀胱经,清下焦火;黄柏的活性成分主要为生物碱类,包括小檗碱、药根碱、木兰花碱、黄柏碱等^[15-16]。

3.2 色谱条件优化

本研究中12种成分可分为黄酮类及生物碱类成

分,化学结构差异较大,预试验中参考文献^[17]方法,以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相,同时测定12种成分,但基线噪音较大,色谱峰分离效果欠佳,尤其巴马汀与小檗碱难以分离。为得到较好的分离效果和信号强度,最后采用不同色谱条件分别测定湿润烧伤膏中两大类成分,且选择不同流动相进行分离。通过对12种成分进行紫外-可见光全波长紫外扫描,发现7种生物碱类成分在345 nm波长处均有较强吸收,而5种黄酮类化合物在275 nm波长处有较强吸收,所以本研究设置两种检测波长。

3.3 提取方式选择

杨丽宏等^[17]分别采用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、纯净水等不同极性试剂,提取黄连解毒汤中生物碱类及黄酮类化合物,得出以饱和正丁醇溶液提取效果最好的结论,预试验中分别比较了不同浓度的甲醇溶液、饱和正丁醇溶液及0.1%甲酸溶液对各成分的提取效果,结果与文献结果一致,故以饱和正丁醇为提取溶剂,超声提取湿润烧伤膏中12种成分。

3.4 方法评价

本研究中首次实现了湿润烧伤膏中5种黄酮类化合物(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素A)及7种生物碱类成分(黄柏碱、木兰花碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀)含量的同时测定,方法精密度高、准确性和重复性好,可为该制剂质量评价和标准提升提供参考。

参考文献

- [1] 邓金星,林君德,邓飞扬. 纳米银医用抗菌敷料、康复新液与湿润烧伤膏联合应用治疗IV期压疮的疗效分析[J]. 中国烧伤创疡杂志,2020,32(4):245-247.
[2] 尤姗姗,蔡钰,王晓峰. 中药外洗联合湿润烧伤膏治疗角