

HPLC同步测定润肠通丸中9种成分的含量

王丽萍, 曹英杰, 段晓颖*

(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:建立同步测定润肠通丸中阿魏酸、甘草苷、新橙皮苷、橙皮苷、柚皮苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的方法。方法:采用HPLC法,Agilent C₁₈色谱柱(ZORBAX,SB-AQ,4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.2%甲酸水梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温35℃,检测波长235 nm(甘草苷、甘草酸铵),285 nm(柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚),320 nm(阿魏酸)。结果:9个成分的方法学考察均合格,且阴性无干扰,平均回收率97.0%~102.4%,RSD 0.9%~1.9%。结论:该方法简便、准确、专属性强,为润肠通丸及其类似组方制剂的质量评价提供了研究基础。

[关键词] 高效液相色谱法;润肠通丸;定量分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0050-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230050

Simultaneous Determination of Nine Constituents in Runchangtong Pills by HPLC WANG Li-ping, CAO Ying-jie, DUAN Xiao-ying* (The First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination ferulic acid, liquiritin, naringin, hesperidin, neohesperidin, ammonium glycyrrhizinate, emodin, chrysophanol and physcion in Runchangtong pills. **Method:** HPLC was applied on a Agilent C₁₈ column (ZORBAX SB-AQ, 4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% formic acid water as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and multiple detection wavelength of 235 nm (liquiritin, ammonium glycyrrhizinate), 285 nm (naringin, hesperidin, neohesperidin, emodin, chrysophanol, physcion), 320 nm (ferulic acid). **Result:** The methodology of 9 components met the requirements with no interference of negatives, the average recovery rates were 97.0%~102.4%, RSD was 0.9%-1.9%. **Conclusion:** This established method established is easy, accurate with high specificity. This study provides scientific basis for the quality evaluation of Runchangtong pills and preparations of the same kind.

[Key words] HPLC; Runchangtong pills; quantitative analysis

润肠通丸是河南中医学院第一附属医院的常用制剂,由何首乌、大黄、当归(油炙)、枳实、甘草等10余味药组成,具有益阴养血,清热导滞,化痰散结,润肠通便之功能。临床用于因血虚津亏、燥热内结,气滞不行所致大便秘结等。其中何首乌、大黄滋养阴津泻下热结为君药,当归(油炙)助君药润肠通便为臣,伍以枳实行气导滞为佐药,甘草调和诸药,该方具有补而不滞、攻而不峻等特点。

现代药理研究揭示方中诸药及其中成分对便秘

有明确的药理作用,如游离型蒽醌大黄素、大黄素甲醚等是大黄“泻下”效应的有效成分^[1],大黄素对便秘小鼠小肠蠕动有促进作用^[2]。何首乌中所含的蒽醌衍生物能促进肠蠕动而有轻度泻下作用^[3]。阿魏酸是油当归的功效成分,具活血作用,对血虚肠燥型便秘有显著的通便作用,能显著改善模型鼠的排黑便时间、排便粒数及小肠推进率^[4-5]。枳实可明显提高慢传输型便秘大鼠神经递质SP、VIP含量,促进肠运动^[6]。枳实的主要成分橙皮苷等,可

[收稿日期] 20150602(004)

[基金项目] 河南中医学院科研苗圃工程项目(MP2014-03)

[第一作者] 王丽萍,主管药师,从事中药化学研究,Tel:13939039028,E-mail:luckkid@126.com

[通讯作者] *段晓颖,主任药师,硕士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:13783531353,E-mail:luckkids@163.com

促进胃排空,明显增加便秘小鼠小肠运动,表明枳实通过增加胃肠蠕动和节律性收缩来治疗便秘,能明显缩短首便时间,提高排便频率,且呈剂量依赖性^[7]。柚皮苷对便秘小鼠排便有正向调节作用^[8]。

润肠通丸现有的质量标准中仅建立了何首乌的薄层色谱鉴别,未涉及具体成分的含量测定,难以全面评价和控制润肠通丸的药品质量;而中药复方的疗效是各药味多成分共同作用的结果,其含量及其比例关系均会影响疗效,因此在评价、控制复方中药质量时,多种指标成分同时测定比仅测定单一指标成分更科学,能更好地表征药品的质量^[9]。

查阅相关成分测定文献,尧爱民等采用 HPLC 法测定栀子大黄汤中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等的含量;有 HPLC-FLD 方法,测定该汤剂中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量^[10];周军等采用 HPLC 法测定了通宣理肺浓缩丸中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷及甘草酸等的含量^[11];未见采用 HPLC 法同步测定润肠通丸中上述 9 个成分报道。本试验可为具有类似组方的复方制剂质量研究提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪,2996 型二极管阵列检测器,Empower 工作软件(美国 Waters);CP225D 型电子天平(Sartorius)。

阿魏酸(批号 110773-201012),甘草苷(批号 111610-201106),柚皮苷(批号 110722-201312),橙皮苷(批号 110721-201316),新橙皮苷(批号 111857-201102),甘草酸铵(批号 110731-201116),大黄素(批号 110756-200110),大黄酚(批号 110796-201319),大黄素甲醚(批号 110758-201013)对照品均购于中国食品药品检定研究院;处方饮片由河南中医学院一附院中药饮片库房提供,润肠通丸样品(批号 140310,140516,141023)由河南中医学院一附院中药制剂实验室提供,乙腈、甲酸(Sigma 公司)均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(ZORBAX SB-AQ 4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水(B)梯度洗脱(0~36 min,11%~21% A;36~36.1 min,21%~34% A;36.1~82 min,34%~52% A),检测波长 320 nm(阿魏酸),235 nm(甘草苷、甘草酸铵),285 nm(柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35℃,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,用甲醇制成质量浓度分别为 0.236 0,0.948 8,2.356 4,0.350 0,1.835 2,2.532 0,0.343 2,0.218 0,0.058 7 mg·L⁻¹ 的对照品储备溶液。精密量取阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品储备液 0.50,0.56,1.00,0.40,0.62,0.40,0.85,0.65,1.30 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过 50 目筛)约 2.0 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz)放冷至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照润肠通丸的处方比例和制备工艺,分别制备缺枳实、甘草、当归的阴性样品及同时缺大黄和何首乌的双阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备各阴性样品溶液。

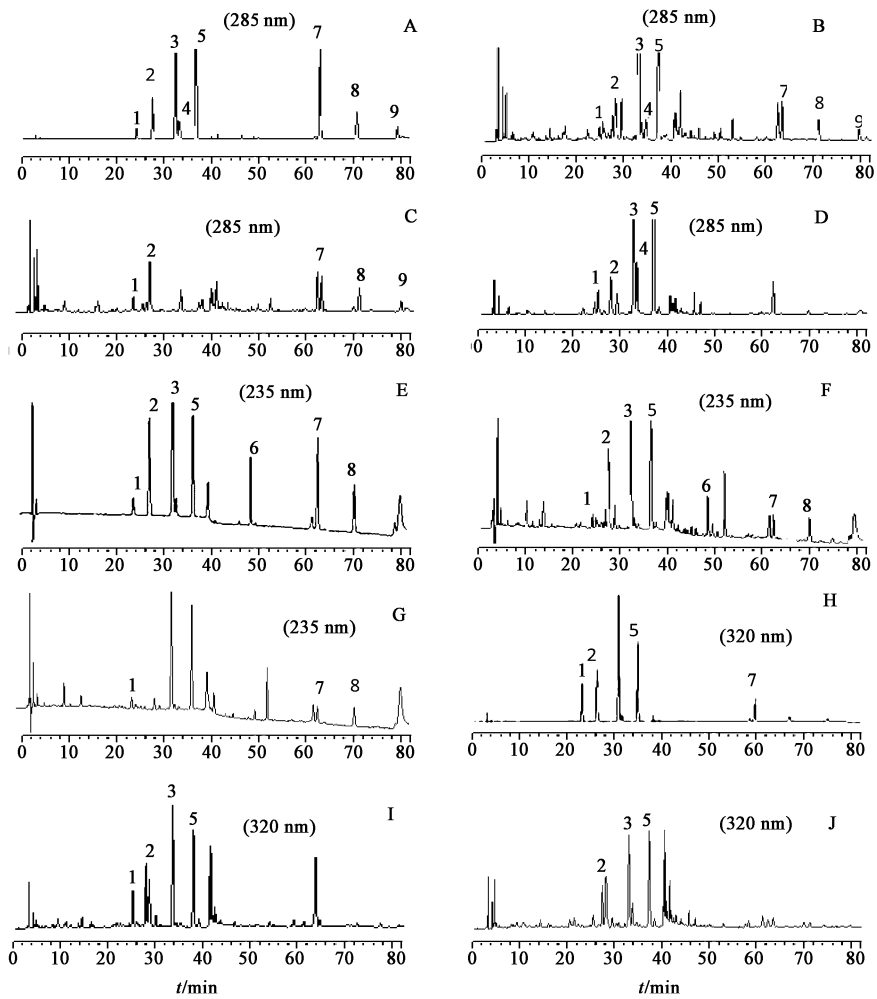
2.3 专属性试验 吸取 2.2 项下混合对照品溶液、样品溶液和阴性供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果表明阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚与其他峰分离度良好,阴性无干扰,见图 1。

2.4 标准曲线及线性范围的考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进样 4,6,8,10,12,14 μL,测定峰面积,以对照品进样量(μg)为横坐标,以峰面积为纵坐标进行线性回归,回归方程式见表 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次测定,结果阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 9 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.0%,0.9%,0.6%,1.3%,0.8%,1.0%,0.8%,1.2%,1.2%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批(批号 140310)润肠通丸样品 6 份。按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.1%,1.3%,1.4%,1.6%,1.5%,1.6%,1.5%,1.3%,1.7%,表明方法的重复性较好。



A, E, H. 混合对照品; B, F, I. 供试品; C. 缺枳实阴性样品; D. 缺何首乌、大黄双阴性样品; G. 缺甘草阴性样品; J. 缺当归阴性样品; 1. 阿魏酸; 2. 甘草苷; 3. 柚皮苷; 4. 橙皮苷; 5. 新橙皮苷; 6. 甘草酸铵; 7. 大黄素; 8. 大黄酚; 9. 大黄素甲醚

图 1 润肠通丸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Runchangtong pills

表 1 9 种成分回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficients and linear ranges of 9 compounds

指标成分	回归方程	r	线性范围/ μg
阿魏酸	$Y = 12\,260\,368.8X + 4\,244.4$	0.999 7	0.047 2 ~ 0.165 2
甘草苷	$Y = 10\,717\,907.4X + 77\,826.9$	0.999 9	0.212 5 ~ 0.743 9
柚皮苷	$Y = 12\,521\,472.0X - 229\,884.4$	0.999 8	0.942 6 ~ 3.299 0
橙皮苷	$Y = 3\,116\,709.6X + 60\,876.5$	0.999 8	0.056 0 ~ 0.196 0
新橙皮苷	$Y = 14\,275\,882.5X - 1\,193\,497.5$	0.999 7	0.455 1 ~ 1.593 0
甘草酸铵	$Y = 1\,538\,268.7X - 11\,174.7$	0.999 9	0.405 1 ~ 1.417 9
大黄素	$Y = 13\,321\,874.6X - 393\,069.3$	0.999 7	0.116 7 ~ 0.408 4
大黄酚	$Y = 11\,197\,745.2X + 94\,820.1$	0.999 8	0.056 7 ~ 0.198 4
大黄素甲醚	$Y = 7\,968\,836.6X + 98\,311.5$	0.999 8	0.030 5 ~ 0.106 8

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一润肠通丸供试品溶液 10 μL , 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 20 h 进样, 结果阿魏酸、甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸

铵、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.5%, 1.5%, 1.9%, 1.6%, 1.6%, 1.8%, 1.6%, 1.8%, 表明供试品溶液在 20 h 内较稳定。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批(批号 140310)润肠通丸样品粉末 1.0 g, 至 50 mL 量瓶中,分别精密加入各对对照品储备液适

量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,进样量 10 μ L,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 润肠通丸样品中 9 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery tests of 9 compounds in Runchangtong pills

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%	成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%	
阿魏酸	1.000 6	0.346	0.354	0.702	100.5	99.2	甘草酸铵	1.000 6	2.992	2.988	6.033	101.8	100.2	
	1.000 2	0.346	0.354	0.699	99.5	(1.9)		1.000 3	2.991	2.988	5.987	100.3	(1.8)	
	1.001 0	0.346	0.354	0.703	100.6			1.001 0	2.993	2.988	5.891	97.0		
	1.000 9	0.346	0.354	0.704	101.0			1.000 9	2.992	2.988	5.998	100.6		
	1.000 2	0.347	0.354	0.689	96.9			1.001 2	2.993	2.988	5.974	99.8		
	1.000 7	0.346	0.354	0.689	96.9			1.000 7	2.992	2.988	6.033	101.8		
甘草苷	1.000 6	1.529	1.518	3.056	100.6	100.1	大黄素	1.000 6	0.689	0.686	1.383	101.0	102.1	
	1.000 3	1.528	1.518	3.063	101.1	(1.3)		1.000 3	0.689	0.686	1.401	103.7	(1.3)	
	1.001 0	1.529	1.518	3.072	101.6			1.001 0	0.689	0.686	1.389	101.9		
	1.000 9	1.529	1.518	3.047	100.0			1.000 9	0.689	0.686	1.386	101.4		
	1.001 2	1.530	1.518	3.032	99.0			1.001 2	0.690	0.686	1.402	103.7		
	1.000 7	1.529	1.518	3.022	98.3			1.000 7	0.689	0.686	1.381	100.7		
柚皮苷	1.000 6	5.136	5.184	10.231	98.3	99.4	大黄酚	1.000 6	0.413	0.406	0.833	103.6	102.4	
	1.000 3	5.134	5.184	10.264	99.0	(0.9)		1.000 3	0.412	0.406	0.820	100.4	(1.1)	
	1.001 0	5.138	5.184	10.303	99.6			1.001 0	0.413	0.406	0.828	102.4		
	1.000 9	5.137	5.184	10.269	99.0			1.000 9	0.413	0.406	0.828	102.4		
	1.001 2	5.139	5.184	10.326	100.1			1.001 2	0.413	0.406	0.832	103.3		
	1.000 7	5.136	5.184	10.353	100.6			1.000 7	0.413	0.406	0.828	102.4		
橙皮苷	1.000 6	0.392	0.385	0.762	95.9	97.0	大黄素	1.000 6	0.179	0.176	0.355	99.8	97.5	
	1.000 3	0.393	0.385	0.771	98.2	(1.6)		甲醚	1.000 3	0.179	0.176	0.348	96.0	(1.8)
	1.001 0	0.393	0.385	0.761	95.7				1.001 0	0.179	0.176	0.352	97.8	
	1.000 9	0.393	0.385	0.759	95.2				1.000 9	0.179	0.176	0.348	95.6	
	1.001 2	0.393	0.385	0.772	98.5				1.001 2	0.179	0.176	0.349	96.5	
	1.000 7	0.393	0.385	0.771	98.4				1.000 7	0.179	0.176	0.354	99.4	
新橙皮苷	1.000 6	3.377	3.377	6.732	99.4									
	1.000 3	3.376	3.377	6.858	103.1									
	1.001 0	3.378	3.377	6.722	99.0	99.9								
	1.000 9	3.378	3.377	6.720	99.0	(1.6)								
	1.001 2	3.379	3.377	6.740	99.5									
	1.000 7	3.377	3.377	6.733	99.4									

2.6 样品测定 取 3 个批号的润肠通丸样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以标准曲线法分别计算,结果见表 3。

3 讨论

试验过程中,分别对各指标成分在 200 ~ 400

nm 波长进行扫描,得到各成分的最大吸收波长;为减少干扰,提高方法的准确度,同时兼顾低含量成分的检测灵敏度,最终选择检测波长为 235 nm(甘草苷,甘草酸铵),285 nm(柚皮苷,橙皮苷,新橙皮苷,大黄素,大黄酚,大黄素甲醚),320 nm(阿魏酸)。

表 3 3 批润肠通丸样品中 9 种成分的质量分数 (n=3)

批号	阿魏酸	甘草苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	甘草酸铵	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
140310	0.346 1	1.527 7	5.132 6	0.392 4	3.375 0	2.989 7	0.688 7	0.412 3	0.179 2
140516	0.378 9	1.675 4	5.153 6	0.414 4	3.532 3	3.147 6	0.633 9	0.414 2	0.182 6
141023	0.374 2	1.587 2	5.629 7	0.416 6	3.569 2	3.029 8	0.604 1	0.372 3	0.191 0

曾分别以乙腈-0.2% 冰乙酸, 乙腈-0.1% 磷酸水系统为流动相^[12-15], 对润肠通丸供试品溶液中待测成分的分离情况进行了考察, 结果以乙腈-0.2% 甲酸水系统分离效果及峰形均较好, 能满足分析测定的要求, 本测定方法具有专属性强、分离效果好, 结果准确等特点。

由样品测定结果看, 在制备工艺和测定方法相同的情况下, 9 种成分不同批次的含量存在一定差异, 排除诸如制剂、储藏等细微差异引起的不同, 更多的可能与原料药中相关成分的初始含量不同有关, 提示中药制剂生产应按标准要求认真控制原料药质量, 严格按工艺要求操作, 保证成品质量的稳定可控, 从而确保临床用药剂量准确, 疗效安全可靠。

[参考文献]

[1] 李锋, 王胜春, 王新, 等. 大黄泻下效应的药理学新解释[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 481-484.

[2] 周成华, 武玉清, 许正新, 等. 大黄素对小肠运动的影响及其机制[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1421-1424.

[3] 苏玮, 郭群. 何首乌的现代药理研究概况[J]. 中草药, 1997, 28(2): 119-121.

[4] 龙全江, 郭朝晖, 刘峰林, 等. HPLC 法测定当归及油炒当归中阿魏酸的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(10): 36-37.

[5] 龙全江, 吴国泰, 朱书强. 油当归炮制前后润肠通便作用研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2006, 23(1): 51-53.

[6] 陶春虹. 枳实对慢传输型便秘大鼠肠神经递质 SP、

VIP 含量的影响[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 14-15.

[7] 张信花, 何鹏飞. 枳实水煎液对复方地芬诺酯便秘模型小鼠排便作用的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2010, 32(3): 209-210.

[8] 张涵, 唐立海, 巫燕莉, 等. 柚皮苷对便秘小鼠排便的影响及作用机制初探[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1517-1518.

[9] 刘荣霞, 叶敏, 果德安, 等. 中药质量控制研究的思路与方法[J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 332-337.

[10] 尧爱珉, 黄金秋, 徐大星, 等. RP-HPLC 法测定栀子大黄汤中多种成分的含量及其在方剂配伍研究中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(6): 531-535.

[11] 周军, 王杰, 蔡霞. 高效液相色谱法快速测定通宣理肺浓缩丸中 6 种成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(21): 1856-1859.

[12] 曾琪, 谭道鹏, 陈艳萍, 等. HPLC 双波长法同时测定净固片中 5 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 77-80.

[13] 陈家仪, 贾薇, 曾元儿, 等. HPLC 波长切换法同时测定枳芍散水煎液中 4 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 114-116.

[14] 施法, 白旭东, 董斌, 等. HPLC 法同时测定明目上清片中 10 个化学成分[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 91-95.

[15] 余佳文, 邓开英, 彭涛, 等. UPLC 同时测定藿香正气口服液中甘草苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、甘草酸铵、厚朴酚、和厚朴酚的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2314-2317.

[责任编辑 顾雪竹]