

大黄硝石滴丸 HPLC 多波长指纹图谱及多成分含量测定

药雅俊, 孔祥鹏, 裴妙荣*

(山西中医学院, 山西 晋中 030600)

[摘要] **目的:**建立大黄硝石滴丸 HPLC 多波长指纹图谱,并对栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷同时进行含量测定,以期对其质量进行控制。**方法:**采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 对 10 批大黄硝石滴丸样品进行评价,建立对照指纹图谱,并对其主要活性成分进行含量测定。**结果:**分别在 238,345,440 nm 下标定了 6,3,8 个共有峰,指纹图谱相似度均 >0.9。**结论:**大黄硝石滴丸的多波长指纹图谱特征性和专属性强,通过栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷的测定,可以有效地对大黄硝石滴丸的质量进行控制。

[关键词] 大黄硝石滴丸; 指纹图谱; 栀子苷; 盐酸小檗碱; 西红花苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0030-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060030

HPLC Multi-wavelength Chromatographic Fingerprints and Multi-component Content Determination of Dahuang Xiaoshi Dropping Pill

YAO Ya-jun, KONG Xiang-peng, PEI Miao-rong*

(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the multi-wavelength chromatographic fingerprints of Dahuang Xiaoshi dropping pill based on chromatographs of HPLC-PDA, and determine the contents of geniposide, berberine hydrochloride and crocin. **Method:** The multi-wavelength chromatographic fingerprints and determination 10 batches of homemade pills were performed, with geniposide, berberine hydrochloride and crocin as reference peak. The *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine* (2004A) was used for data analysis. **Result:** As a result, six common peaks were pointed out at 238 nm, three common peaks were pointed out at 345 nm, and eight common peaks were pointed out at 440 nm. Dahuang Xiaoshi dropping pill from different batches showed a similarity of above 0.9 in HPLC fingerprint chromatogram. **Conclusion:** This method is highly characteristic and specific. The multi-wavelength HPLC fingerprint and the determination of geniposide, berberine hydrochloride and crocin can be used for the quality control.

[Key words] Dahuang Xiaoshi dropping pill; fingerprint; geniposide; berberine hydrochloride; crocin

大黄硝石汤是《伤寒杂病论》中治疗湿热黄疸兼里实证代表方^[1],由大黄、黄柏、栀子、芒硝 4 味药组成。由于方中所含酸、碱性药物成分在煎煮过程中结合为难溶性复合物沉淀使得有效成分减损^[2],故采用组分配伍形式,利用现代制剂技术将其制成现代滴丸制剂,具有溶出快、药物稳定性好、制备简

单、质量易控制及服用方便等优点^[3]。目前,裴香萍等^[4]建立了大黄硝石汤中盐酸小檗碱含量测定的方法,笔者还未见对该制剂的含量测定及相关的指纹图谱研究。中药指纹图谱目前已成为国际上公认的控制天然药物质量的有效手段^[5]。目前,高效液相指纹图谱研究还是以单波长检测^[6-8]为主,但

[收稿日期] 20150701(021)

[基金项目] 山西省国际科技合作项目(2013081064-4);2014年山西省技术创新项目;山西中医学院博士基金项目

[第一作者] 药雅俊,在读硕士,从事中药新产品开发与应用研究,Tel:15135138851, E-mail:yaoyajun0601@163.com

[通讯作者] *裴妙荣,硕士,教授,从事中药复方药效物质基础研究,Tel:0351-3179900, E-mail:peimr602@163.com

对于复方制剂,单一波长指纹图谱具有片面性,从而导致其反映的中药质量具有随机性和偶然性^[9]。故本实验通过多成分含量测定和多波长指纹图谱对大黄硝石滴丸的质量进行初步控制,为进一步开发和临床用药安全提供保证。

1 材料

2695型高效液相色谱仪(PDA检测器,Empower工作站,美国Waters),AB135-S型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多),FA2104型电子分析天平(上海精科天平),SB-5200TDN型医用数控超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

对照品栀子苷(批号20121215,纯度98.13%,购于南京康满林化工实业有限公司),盐酸小檗碱(批号20120706,纯度97.2%,购于南京康满林化工实业有限公司),西红花苷(批号110924,纯度>98%,购于上海融禾医药科技有限公司)。大黄硝石滴丸(实验室自制,10批,分别标记为1~10号)。取大黄、黄柏、栀子的精制组分及芒硝,与聚乙二醇以一定比例混匀,于二甲基硅油中成型后取出,晾干,即得组分配伍大黄硝石滴丸。乙腈,甲醇,磷酸色谱纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 称取大黄硝石滴丸粉末约0.5g,精密称定,置10mL量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率250W,频率40kHz)15min使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷对照品适量,加甲醇配制成栀子苷 $3.606\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,盐酸小檗碱 $1.798\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,西红花苷 $1.428\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,按1:1:1混合,即得。

2.3 色谱条件 Apollo C₁₈色谱柱(4.6mm×250mm,5μm),流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温30℃,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~10min,5%A;10~20min,5%~15%A;20~50min,15%~18%A;50~80min,18%~30%A;80~110min,30%~50%A;110~115min,50%~5%A),检测波长210~600nm。以峰面积大于总峰面积的2%为限度,选取色谱峰作为指纹特征峰。

2.4 大黄硝石滴丸指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,连续进样6次,每次5μL,按2.3项下色谱条件测定,记录色谱图。238nm时,以栀子苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.1%,相对峰面积的RSD均<4.4%,相似度均>0.9;345nm时,以盐

酸小檗碱为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.09%,相对峰面积的RSD均<0.2%,相似度均>0.9;440nm时,以西红花苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.09%,相对峰面积的RSD均<14.8%,相似度均>0.9。表明仪器精密度高。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10,12h精密吸取10μL,按2.3项下色谱条件测定,记录色谱图。238nm时,以栀子苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.4%,相对峰面积的RSD均<3.0%,相似度均>0.9;345nm时,以盐酸小檗碱为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.1%,相对峰面积的RSD均<1.9%,相似度均>0.9;440nm时,以西红花苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.1%,相对峰面积的RSD均<13.1%,相似度均>0.9。表明供试品溶液在12h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批样品6份,按2.1项下方法制备,精密吸取5μL,按2.3项下色谱条件测定,记录色谱图。238nm时,以栀子苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.2%,除4号峰外,相对峰面积的RSD均<3.6%,相似度均>0.9;345nm时,以盐酸小檗碱为参照峰,各共有峰的相对保留时间的RSD均<0.1%,相对峰面积的RSD均<1.9%,相似度均>0.9;440nm时,以西红花苷为参照峰,各共有峰相对保留时间的RSD均<0.1%,相对峰面积的RSD均<9.9%,相似度均>0.9。表明该方法重复性良好。

2.4.4 大黄硝石滴丸指纹图谱的建立 取10批样品粉末,每批1份,精密称定,按2.1项下方法制备供试品溶液,精密吸取5μL,按2.3项下色谱条件测定,记录色谱图,以峰面积大于总峰面积的2%为限度,选取色谱峰作为指纹特征峰。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)进行处理。在238nm下,标记了6个峰,以栀子苷(3号峰)为参照峰;345nm时,标记了3个峰,以盐酸小檗碱(9号峰)为参照峰;440nm时,标记了8个峰,以西红花苷(10号峰)为参照峰。1~10批样品与对照图谱的相似度见表1,生成的对照图谱,对照品HPLC图,阴性样品HPLC图,见图1~3。10批滴丸的指纹图谱与对照图谱之间相似度均>0.9。

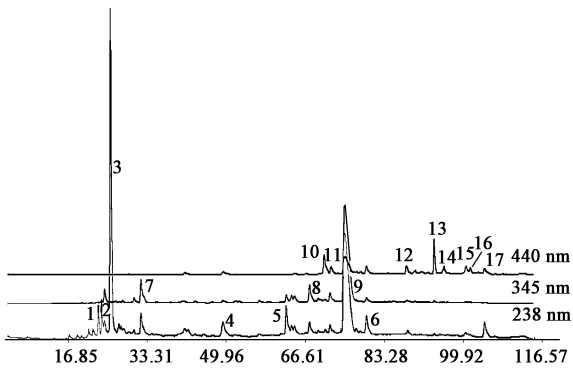
2.5 大黄硝石滴丸的含量测定

2.5.1 系统适用性试验 按2.3项下的色谱条件进行检测,栀子苷、盐酸小檗碱及西红花苷与相邻色

表 1 不同波长下 10 批大黄硝石滴丸对照指纹图谱相似度

Table 1 Similarity results table of reference fingerprint at different batches of Dahuang Xiaoshi dropping pill

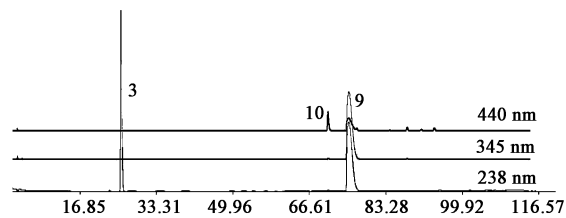
样品批号	238 nm	345 nm	440 nm
1	0.994	0.998	0.982
2	0.999	1	0.979
3	0.998	1	0.922
4	0.995	0.999	0.979
5	0.993	0.999	0.984
6	0.995	1	0.923
7	0.998	1	1
8	0.998	1	0.979
9	0.998	1	0.962
10	0.999	1	0.999



3. 栀子苷; 9. 盐酸小檗碱; 10. 西红花苷

图 1 大黄硝石滴丸 HPLC 多波长指纹对照谱

Fig. 1 Multi-wavelength HPLC reference fingerprint of Dahuang Xiaoshi dropping pill



3. 栀子苷; 9. 盐酸小檗碱; 10. 西红花苷

图 2 对照品多波长 HPLC

Fig. 2 Reference substances multi-wavelength HPLC

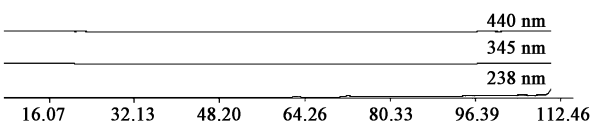


图 3 阴性样品 HPLC

Fig. 3 Negative sample HPLC

谱峰的分离度 > 1.5, 理论塔板数按栀子苷计均 > 5 000。

2.5.2 线性考察 将 2.2 项下的混合对照品溶液逐级稀释,使其质量浓度(以栀子苷质量浓度计)分别为 1.202, 0.601, 0.301, 0.150, 0.075 1, 0.037 6 $g \cdot L^{-1}$ 。分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按 2.3 项下色谱条件测定。以质量浓度($X, g \cdot L^{-1}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程。栀子苷的回归方程为 $Y = 1.3 \times 10^7 X + 1.1 \times 10^5$ ($r = 0.999 9$),在 0.037 6 ~ 1.202 $g \cdot L^{-1}$ 呈良好线性关系;盐酸小檗碱的回归方程为 $Y = 4.0 \times 10^7 X + 164 939$ ($r = 0.999 9$),在 0.018 7 ~ 0.599 $g \cdot L^{-1}$ 呈良好线性关系;西红花苷的回归方程为 $Y = 3.8 \times 10^6 X + 10 230$ ($r = 0.999 9$),在 0.014 9 ~ 0.476 $g \cdot L^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 精密吸取 10 μL ,按 2.3 项下色谱条件测定,记录色谱图。结果,238 nm 时,栀子苷峰面积的 RSD 1.2%; 345 nm 时,盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.7%; 440 nm 时,西红花苷峰面积的 RSD 1.4%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液,连续进样 6 次,按 2.3 项下色谱条件测定,记录色谱图。238 nm 时,栀子苷峰面积的 RSD 1.3%; 345 nm 时,盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.7%; 440 nm 时,西红花苷峰面积的 RSD 1.2%,表明仪器精密度良好。

2.5.5 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 5 μL ,按 2.3 项下色谱条件测定,记录色谱图。238 nm 时,栀子苷质量分数为 15.47 $mg \cdot g$, RSD 1.7%; 345 nm 时,盐酸小檗碱质量分数为 5.59 $mg \cdot g$, RSD 2.9%; 440 nm 时,西红花苷质量分数为 4.27 $mg \cdot g$, RSD 2.8%,表明该方法重复性良好。

2.5.6 回收率试验 称取已知质量分数的大黄硝石滴丸粉末 9 份,每份 0.15 g,分别精密加入混合对照品溶液(栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷质量浓度分别为 1.16, 0.41, 0.28 $g \cdot L^{-1}$)各 1, 2, 3 mL,每个梯度平行 3 份,按 2.1 项下方法制备供试品溶液。按 2.3 项下色谱条件测定,计算回收率。结果 3 种成分的回收率分别为 101.40%, 100.00%, 101.12%, RSD 分别为 2.3%, 2.6%, 2.5%。表明该方法准确度良好。

2.5.7 样品的测定 取 10 批次滴丸粉末 0.5 g,精密称定,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 5 μL 按 2.3 项下色谱条件测定,记录色谱图。结果见表 2。

表 2 大黄硝石滴丸样品中 3 种成分含量测定

Table 2 Dahuang Xiaoshi dropping pill sample results $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	栀子苷	盐酸小檗碱	西红花苷
1	17.61	5.23	4.84
2	16.60	4.87	4.71
3	17.21	5.50	4.88
4	16.34	5.31	4.53
5	15.93	5.52	4.57
6	16.77	5.39	4.78
7	15.91	5.51	4.73
8	15.77	5.74	4.88
9	15.66	5.19	4.49
10	15.29	5.23	4.51

大黄硝石滴丸中栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷的质量分数均值分别为 16.31, 5.35, 4.69 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。由此得到大黄硝石滴丸中栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷的质量分数分别不低于 13.05, 4.28, 3.75 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

中药指纹图谱结合多指标成分定量分析,已经成为目前中药质量控制的重要手段之一^[10]。由实验结果可知,10 批样品在 3 个波长下检测到的色谱峰类型、数目、含量相似,批间差异小,滴丸的制备工艺稳定。同一样品在 238, 345, 440 nm 下的峰面积有显著差别,这可能是不同化学成分在不同波长下吸收不一致导致的。对其主要活性成分的含量测定可知,不同批次的大黄硝石滴丸的含量差异不大。本实验建立的高效液相指纹图谱特征性强,结合主要活性成分的测定,为控制大黄硝石滴丸的质量提供了科学的方法。

栀子苷、盐酸小檗碱、西红花苷都为大黄硝石滴丸的主要成分,其中,栀子苷、西红花苷是栀子的主要成分^[11],盐酸小檗碱是黄柏的主要成分^[12],但是由于栀子苷是环烯醚萜苷类,盐酸小檗碱是生物碱类,西红花苷是二萜类^[13],这 3 种成分的最大吸收波长不一致,在 1 个波长处难以最大程度地显示,而《中国药典》中栀子测定栀子苷的最大吸收波长是

238 nm,关黄柏测定盐酸小檗碱的最大吸收波长为 345 nm,西红花苷在西红花的检测中最大吸收波长是 440 nm,参考上述 3 种成分的吸收波长,建立大黄硝石滴丸的 3 个波长高效液相指纹图谱。

[参考文献]

- [1] 李克光. 金匱要略讲义[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:185.
- [2] 裴妙荣,段秀俊,裴香萍. 酸碱对药大黄与黄柏在大黄硝石汤中配伍的化学研究[J]. 中国中药杂志, 2009,34(18):2312-2315.
- [3] 荣立新,鲁爽,张保猷. 中药滴丸剂研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20):325-329.
- [4] 裴香萍,裴妙荣. 高效液相色谱法测定大黄硝石汤中盐酸小檗碱的含量[J]. 山西中医,2009,25(3):35-36.
- [5] 王永刚,吴忠,魏凤环,等. 中药指纹图谱研究的现状与未来[J]. 中药材,2003,26(11):820-825.
- [6] 李晓亮,易进海,刘云华,等. 南五味子、五味子 HPLC 指纹图谱研究和木脂素成分测定[J]. 中成药,2011,33(6):920-924.
- [7] 黄勇红,黄艳萍,陈任宏. 飞扬草药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):74-76.
- [8] 周习,陈佩东,张丽,等. 失笑散的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):73-76.
- [9] 孙国祥,吴波,毕开顺. 平行五波长高效液相色谱指纹图谱全息整合法定量鉴定杞菊地黄丸的整体质量[J]. 色谱,2010,28(9):877-884.
- [10] 刘清飞,王义明,罗国安. 多指标定量指纹图谱用于中药复方缓释制剂体外释放度的评价[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):143-147.
- [11] 杨全军,范明松,孙兆林,等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J]. 中国现代中药,2010,12(9):7-12.
- [12] 张冠英,董瑞娟,廉莲. 川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(10):812-821.
- [13] 付小梅,彭水梅,刘婧,等. HPLC 法同时测定栀子类药材中 10 个主要有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(4):615-621.

[责任编辑 顾雪竹]