

· 化学与分析 ·

HPLC 测定一清胶囊中 14 种有效成分的含量

党蒙蒙^{1,2}, 王家龙², 张秋燕², 牟稷征², 董宇², 吴建华^{1*}, 崔翰明^{2*}

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的:建立 HPLC-DAD 同时测定一清胶囊中 14 种成分(大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、药根碱、巴马汀、黄连碱、小檗碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素与千层纸素 A 苷)含量的方法。方法:采用 Agilent 1200 HPLC-DAD 色谱仪, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm), 以水-乙腈-0.2% 甲酸甲醇溶液-25 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ 水溶液四元流动相梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, DAD 检测波长分别为 254, 275, 345 nm。结果:经测定 14 种化合物的线性关系良好;精密度的 RSD 均 < 3.0%;重复性测定结果 RSD 均 < 3.0%;加样回收率在 97.11% ~ 102.44%, RSD 均 < 3.0% (n = 6)。结论:该方法简便快捷,结果准确可靠,重复性好,为一清胶囊的质量控制提供科学依据。

[关键词] 高效液相色谱-二极管阵列检测器;一清胶囊;质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0066-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120066

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.0946.002.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 9:46

Simultaneous Determination of 14 Compounds in Yiqing Capsules by HPLC

DANG Meng-meng^{1,2}, WANG Jia-long², ZHANG Qiu-yan², MU Ji-zheng²,
DONG Yu², WU Jian-hua^{1*}, CUI Han-ming^{2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-DAD method for simultaneous determination of 14 active compounds (baicalin, oroxyloside, wogonoside, jatrorrhizine, copetisine, palmatine, berberine, baicalein, rhein, aloe-emodin, wogonin, emodin, chrysophanol and physcion) in Yiqing capsules. **Method:** Agilent 1200 HPLC-DAD chromatographic instrument and Agilent ZORBAX SB-C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm) were used, with water-acetonitrile-0.2% formic acid in methanol-25 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, with the column temperature of 25 °C, and DAD detection wavelength was 254, 275, 345 nm respectively. **Result:** Fourteen compounds showed good linear relationship; the recovery rate was ranged from 97.11% -102.44% with RSD less than 3.0% for all the analytes (n = 6). RSD of precision degree was less than 3.0%; and RSD of repeatability testing results was less than 3.0%. **Conclusion:** This HPLC-DAD method is simple, accurate and reproducible. It could provide scientific basis for the quality control of Yiqing capsules.

[Key words] HPLC-DAD; Yiqing capsules; quantity control

[收稿日期] 20151109(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09102-011-08);国家自然科学基金项目(81541083);中英国际科技合作项目(2010DFA31620)

[第一作者] 党蒙蒙,在读硕士,从事中药药物分析与药代动力学研究, Tel:15319566852, E-mail: danseshijue1206@163.com

[通讯作者] * 吴建华, 硕士, 副教授, 从事中药饮片及新药研究, Tel:029-38185172, E-mail: wu0700@163.com

* 崔翰明, 硕士, 副研究员, 从事中药药物分析与药代动力学研究, Tel:010-88001470, E-mail: cui-yaoshi@163.com

中药复方化学成分复杂多样,各具独特药理作用,准确的含量测定对于药品的质量控制至关重要^[1]。一清胶囊由黄芩、黄连和大黄组成,具有清热燥湿、泻火解毒、化瘀凉血止血的功效,为临床上常用治疗火毒血热所致的身热烦躁、目赤口疮、牙龈肿痛、大便秘结的复方中成药^[2]。研究表明,其主要有效成分为大黄中大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素及其蒽醌苷类^[3];黄连中药根碱、巴马汀、黄连碱、小檗碱等^[4];黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 苷等化合物^[5]。

2015 年版《中国药典》对于一清胶囊中各化合物的含量测定仅限于大黄素、大黄酚和黄芩苷,缺乏其他成分的质控方法。而文献报道也仅限于测定少数黄连生物碱、大黄蒽醌及黄芩黄酮^[6-10],缺乏准确、全面分析一清胶囊中多种指标性成分的测定方法。因此笔者建立 HPLC-DAD 含量测定方法同时测定一清胶囊中已知的 14 种成分,即大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、药根碱、巴马汀、黄连碱、小檗碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素与千层纸素 A 苷。并进行完善的方法学考察,为全面控制一清胶囊及其他含大黄、黄连和黄芩的中成药质量提供可行的实践依据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(Agilent,含 DAD 检测器),MSU225S-000-DU 型 1/10 万电子天平(Sartorius),Milli-Q 纯水仪(Millipore)。

大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素与盐酸药根碱对照品均购自中国食品药品检定研究院(批号分别为 110756-200110,110796-201118,110757-200206,110758-201013,110795-201007),盐酸巴马汀、盐酸小檗碱(Sigma 公司,纯度 97%,批号分别为 13324JE,067K1454),盐酸黄连碱(Aladdin 公司,纯度 98%,批号 B1228043),黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 苷均购自北京四面体有限公司(纯度均为 98%,批号分别为 131219,140403,140115,140203,140116);一清胶囊(国药准字 Z19991047,成都康弘制药有限公司,批号分别为 140710,130724,150403);甲醇和乙腈色谱纯,甲酸,磷酸二氢钾等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,3.5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)-含 0.2% 甲酸的甲醇溶液(C)-25 mmol · L⁻¹ KH₂PO₄ 水溶液(D)梯度洗脱,梯度洗脱程序见表

1,进样量 10 μL,流速 0.8 mL · min⁻¹,柱温 25 °C;检测波长 254 nm 检测大黄蒽醌类化合物(大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚与芦荟大黄素),275 nm 检测黄芩黄酮类化合物(黄芩苷、千层纸素 A 苷、汉黄芩苷、黄芩素与汉黄芩素)和 345 nm 检测黄连生物碱类化合物(小檗碱、黄连碱、巴马汀与药根碱)。HPLC 色谱见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution program

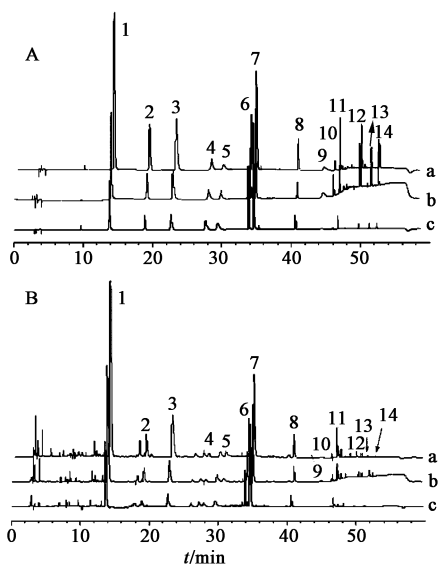
时间/min	A/%	B/%	C/%	D/%
0	18.0	10.0	0.0	72.0
3	10.0	18.0	0.0	72.0
5	7.0	21.0	0.0	72.0
25	1.0	23.0	0.0	76.0
30	0.0	35.0	2.5	62.5
40	0.0	38.0	10.0	52.0
42	30.0	40.0	30.0	0.0
44	10.0	15.0	75.0	0.0
48	5.0	15.0	80.0	0.0
50	0.0	15.0	85.0	0.0
52	0.0	15.0	85.0	0.0
54.5	18.0	10.0	0.0	72.0
60	18.0	10.0	0.0	72.0

2.2 对照品溶液的制备 精密称 14 种对照品适量,用甲醇溶解,制成不同质量浓度的对照品溶液,分别取适量上述对照品溶液用甲醇稀释成一定浓度的混合对照品溶液(35.6,42.8,56.4,33.8,42.9,33.9,96.5,64.3,202.2,480,57.8,384,36.8,162.1 mg · L⁻¹)。精密吸取上述混合对照品溶液,分别稀释 2,2.5,5,10,20,50 倍,用甲醇稀释成一系列混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取一清胶囊粉末约 50 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,超声提取 30 min,冷却至室温,甲醇补足减失的质量,作为供试品溶液 I;精密量取供试品溶液 I 续滤液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液 II。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围考察 精密吸取配制好的系列混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标,各对照品溶液质量浓度为横坐标,进行线性回归,得到各成分的标准曲线和相关系数,见



1. 黄芩苷; 2. 千层纸素 A 苷; 3. 汉黄芩苷; 4. 药根碱; 5. 黄连碱; 6. 巴马汀; 7. 小檗碱; 8. 黄芩素; 9. 大黄酸; 10. 芦荟大黄素; 11. 汉黄芩素; 12. 大黄素; 13. 大黄酚; 14. 大黄素甲醚; a. 275 nm; b. 254 nm; c. 345 nm

图 1 3 个波长下混合对照品色谱 (A) 与一清胶囊色谱 (B)
Fig. 1 HPLC chromatography of mixed reference substances (A) and Yiqing capsule (B)

表 2。结果表明 14 种化合物在上述线性范围内线性关系良好。

表 2 各化合物的线性关系和线性范围

Table 2 Linearity and range of each compound

波长 /nm	化合物	线性方程	线性范围 /mg·L ⁻¹	r
254	大黄酸	Y = 43.775X + 38.233	0.712 ~ 35.6	0.996 0
	芦荟大黄素	Y = 26.241X + 3.1022	0.858 ~ 42.9	0.999 6
	大黄素	Y = 39.114X + 44.160	1.128 ~ 56.4	0.998 3
	大黄酚	Y = 51.656X - 32.290	0.856 ~ 42.8	0.998 9
	大黄素甲醚	Y = 42.918X + 14.796	0.676 ~ 33.8	0.998 9
275	黄芩苷	Y = 32.773X - 32.700	9.6 ~ 480	0.999 7
	千层纸素 A 苷	Y = 34.350X - 45.724	3.242 ~ 162.1	0.999 7
	汉黄芩苷	Y = 20.987X - 44.879	7.68 ~ 384	0.999 7
	黄芩素	Y = 46.765X - 23.300	1.156 ~ 57.8	0.999 4
345	汉黄芩素	Y = 68.027X - 43.614	0.736 ~ 36.8	0.999 0
	药根碱	Y = 56.861X - 22.828	0.678 ~ 33.9	0.999 7
	黄连碱	Y = 27.995X - 29.006	1.286 ~ 64.3	0.999 6
	巴马汀	Y = 48.572X - 39.521	1.93 ~ 96.5	0.999 7
	小檗碱	Y = 47.502X - 81.835	4.044 ~ 202.2	0.999 7

2.4.2 精密度考察 精密吸取低、中、高不同质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,每个

浓度连续进样 6 次,测定各成分峰面积,结果显示各化合物在低、中、高 3 个质量浓度进样,峰面积 RSD 均 < 3.0%,表明该方法精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 精密吸取混合对照品溶液,分别于 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24 h 进样。结果表明 14 种化合物峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明 24 h 内各化合物稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取一清胶囊(140710)粉末约 50 mg,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液 I 与 II 各 6 份,其中供试品溶液 II 色谱图用于计算含量相对较高的黄芩苷、汉黄芩苷与小檗碱,供试品溶液 I 色谱图用于计算其他化合物,按 2.1 项下色谱条件测定,按标曲计算各化合物的含量 (mg·g⁻¹),结果显示 14 种化合物含量的 RSD 均 < 5.0%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收试验 取一清胶囊样品(140710)约 25 mg,精密称定,分别加入适量对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,重复制备 6 份;按 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 3。

表 3 一清胶囊中 14 种成分的加样回收率试验 (n = 6)

Table 3 Result of recovery test of Yiqing capsule (n = 6)

波长 /nm	化合物	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	平均回收率 /%	RSD /%
254	大黄酸	18.15	17.95	35.96	99.23	2.0
	芦荟大黄素	10.88	10.70	21.43	98.64	2.2
	大黄素	9.10	8.95	17.84	97.69	2.6
	大黄酚	11.35	11.36	22.38	97.11	0.5
	大黄素甲醚	4.33	4.05	8.33	98.84	2.3
275	黄芩苷	2 116.16	2 115.15	4 231.99	100.03	0.5
	千层纸素 A 苷	191.85	191.70	383.37	99.91	2.1
	汉黄芩苷	787.54	787.01	1 574.75	100.03	1.0
	黄芩素	111.01	110.84	221.69	99.86	2.3
345	汉黄芩素	47.34	47.18	94.37	99.69	0.2
	药根碱	31.30	31.02	62.44	100.40	2.3
	黄连碱	122.86	122.74	245.49	99.91	1.6
	巴马汀	119.43	116.27	238.53	102.44	2.1
	小檗碱	450.91	450.80	901.60	99.98	2.1

2.4.6 不同批次样品测定 取不同批次的一清胶囊粉末 50 mg,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 4。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 14 种目标化合物中 4 种成分为黄连生物碱类,5 种成分为大黄蒽醌类,另外 5

表 4 一清胶囊中各成分的含量

Table 4 Content of each component in Yiqing capsules

药材 (波长/nm)	成分	批号		
		140710	130724	150403
大黄 (254)	大黄酸	0.68	0.72	0.69
	芦荟大黄素	0.4	0.45	0.41
	大黄素	0.33	0.37	0.34
	大黄酚	0.41	0.42	0.42
	大黄素甲醚	0.17	0.17	0.17
	总大黄蒽醌类	2.00	2.14	2.03
黄芩 (275)	黄芩苷	78.36	80.12	75.78
	千层纸素 A 苷	7.31	7.97	6.58
	汉黄芩苷	30.61	28.31	30.16
	黄芩素	4.22	4.33	4.20
	汉黄芩素	1.78	1.78	1.75
	总黄芩黄酮类	122.28	122.50	118.47
黄连 (345)	药根碱	1.19	1.20	1.17
	黄连碱	4.79	4.69	4.58
	巴马汀	4.64	4.2	4.56
	小檗碱	17.38	18.78	17.18
	总黄连生物碱类	27.99	28.87	27.50

种成分为黄芩黄酮类。其中大黄蒽醌类亲脂性相对较强,黄连生物碱和黄芩黄酮类极性略大,以甲醇为提取溶剂能兼顾 3 类化合物的提取效率。此外本试验考察了盐酸-甲醇(1:100)和其他含酸提取溶剂,黄芩中的苷类成分易水解为苷元,最终选用甲醇超声 30 min 制备供试品,可兼顾黄连生物碱、大黄游离蒽醌和黄芩黄酮。而大黄有较多的蒽醌苷类成分,本试验相较于其他方法^[6-10]缺少酸水解蒽醌苷这一步骤,使得测定结果偏低。

3.2 检测波长的选择 本试验采用 DAD 检测器多波长测定,分别选择在 345 nm 下测定黄连生物碱类化合物,在 254 nm 下测定大黄蒽醌类化合物,在 275 nm 下测定黄芩黄酮类化合物。

3.3 色谱分离 本试验所测定的 14 种成分,其中黄芩黄酮苷类成分极性较大且呈酸性,黄连生物碱类成分极性较小且呈碱性,分析该两类化合物需要流动相有一定的缓冲能力,经选择 KH₂PO₄ 的水溶液与甲酸梯度洗脱分离效果更好;大黄蒽醌类成分极性小,其含有酚羟基或羧基呈酸性,因此选用乙腈与含 0.2% 甲酸的甲醇溶液为流动相。此外,为提高分离效果,选用 3.5 μm 细粒径填料的色谱柱,且柱长为 250 mm,柱效较常规的 5 μm 粒径填料色谱

柱明显提高,可实现该分离效果。

3.4 样品测定 一清胶囊由黄芩、黄连和大黄 3 味中药制成,经测定,一清胶囊中黄芩黄酮类成分黄芩苷和汉黄芩苷的含量较高,其次是小檗碱;而其他成分的含量均较低,因此笔者采用不同浓度的供试品分别测定上述 14 种成分,经验证可准确定量含量差异高达 100 倍的不同成分。该方法经验证同样可用于其他含黄芩、黄连和大黄的中成药的质量控制。

[参考文献]

[1] Li Z, Xiao S, Ai N, et al. Derivative multiple reaction monitoring and single herb calibration approach for multiple components quantification of traditional Chinese medicine analogous formula[J]. J Chromatogr A, 2015, 1376:126-142.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:426-427.

[3] Aichner D, Ganzera M. Analysis of anthraquinones in rhubarb (*Rheum palmatum* and *Rheum officinale*) by supercritical fluid chromatography[J]. Talanta, 2015, 144:1239-1244.

[4] Qiao Y L, Sheng Y X, Wang L Q, et al. Development of a rapid resolution liquid chromatographic method for simultaneous analysis of four alkaloids in Rhizoma Coptidis under different cultivation conditions[J]. J AOAC Int, 2009, 92(2):663-671.

[5] Lee K J, Jung P M, Oh Y C, et al. Extraction and bioactivity analysis of major flavones compounds from *Scutellaria baicalensis* using *in vitro* assay and online screening HPLC-ABTS system[J]. J Anal Methods Chem, 2014, doi:10.1155/2014/563702.

[6] 张艺竹, 安靓, 陈焯, 等. LC-MS/MS 同时测定一清胶囊 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7):1197-1201.

[7] 李东影, 冯伟红, 王智民, 等. QAMS 测定一清颗粒中大黄蒽醌类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):53-56.

[8] 陈健龙, 张玉玲, 肖胜利, 等. UPLC 法同时测定黄连与代综方中 4 种生物碱的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(23):2152-2154.

[9] Qu H, Ma Y, Yu K, et al. Simultaneous determination of eight active components in Chinese medicine 'YIQING' capsule using high-performance liquid chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(1):66-72.

[10] 田书霞, 蒋晔. RP-HPLC 同时分离测定一清胶囊中 7 种有效成分[J]. 中成药, 2006, 28(2):185-188.

[责任编辑 顾雪竹]