

HPLC-ELSD 测定猴枣牛黄散中乔松素、 小豆寇明、西贝母碱和西贝母碱苷

高森¹, 李正翔¹, 王志涛¹, 房志仲^{2*}

(1. 天津医科大学总医院, 天津 300052; 2. 天津医科大学, 天津 300070)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱-蒸发光散射法测定猴枣牛黄散(HZNHS)中乔松素、小豆寇明、西贝母碱和西贝母碱苷的含量。方法: Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 流动相(乔松素和小豆寇明)A 为甲醇, B 为 0.5% 磷酸溶液, 检测波长 300 nm; 流动相(西贝母碱和西贝母碱苷)乙腈-水-二乙胺(65:35:0.5), ELSD 漂移管温度 80 °C, 载气(N₂)流速 2.3 SLPM·min⁻¹。结果: 乔松素和小豆寇明分别在 0.052 7~1.054 μg ($r=0.999\ 4$), 0.036 2~0.724 0 μg ($r=0.999\ 8$) 进样量与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 97.14%, 97.64%, RSD 分别为 1.10%, 1.39%; 西贝母碱和西贝母碱苷分别在 0.057 1~1.142 μg ($r=0.999\ 1$), 0.081 3~1.626 μg ($r=0.999\ 5$) 进样量的自然对数值与峰面积的自然对数值呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 97.55%, 98.09%, RSD 分别为 1.75%, 1.80%。结论: 方法测定结果准确、灵敏、重复性好, 可用于猴枣牛黄散中乔松素、小豆寇明、西贝母碱和西贝母碱苷的测定。

[关键词] 猴枣牛黄散; 乔松素; 小豆寇明; 西贝母碱; 西贝母碱苷; 高效液相-蒸发光散射

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0145-05

[doi] 10.11653/syjf2013210145

Determination of Pinocembrin, Cardamonin, Sipeimine and Sipeimine-3β-D-glucoside in Houzao Niuhuangsan by HPLC-ELSD

GAO Sen¹, LI Zheng-xiang¹, WANG Zhi-tao¹, FANG Zhi-zhong^{2*}

(1. General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China;

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC-ELSD method for determination of the content of pinocembrin, cardamonin, sipeimine and sipeimine-3β-D-glucoside in Houzao Niuhuangsan (HZNHS). **Method:** An Hypersil C₁₈ column was used as the chromatographic column, the flow rate was 0.9 mL·min⁻¹. The mobile phase for pinocembrin and cardamonin consisted of methanol (A) and 0.5% phosphoric acid solution (B); the UV detection wavelength was at 300 nm. The mobile phase for sipeimine and sipeimine-3β-D-glucoside consisted of acetonitrile-water-diethylamine (65:35:0.5). The temperature of drift tube was set at 80 °C, and the gas flow (N₂) was set at 2.3 SLPM·min⁻¹. **Result:** There was a good linear relationship between the concentration of pinocembrin, cardamonin and peak area value when the concentrations of pinocembrin and cardamonin were within the range of 0.052 7-1.054 μg ($r=0.999\ 4$), 0.036 2-0.724 0 μg ($r=0.999\ 8$). The average recovery were 97.14% (RSD 1.10%) and 97.64% (RSD 1.39%). There was a good linear relationship when the concentrations of sipeimine and sipeimine-3β-D-glucoside were within the range of 0.057 1-1.142 μg ($r=0.999\ 1$), 0.081 3-1.626 μg ($r=0.999\ 5$). The average recovery was 97.55% (RSD 1.75%) and 98.09% (RSD 1.80%). **Conclusion:** The method was accurate, sensitive, reproducible and may be used in the determination of pinocembrin, cardamonin, sipeimine and sipeimine-3β-D-glucoside in HZNHS.

[收稿日期] 20130524(016)

[第一作者] 高森, 硕士, 主管药师, 从事临床药学和中药质量控制研究, Tel:13920249696, E-mail: gaosenyj@163.com

[通讯作者] * 房志仲, 教授, 硕士生导师, 从事药物制剂与质量控制研究, Tel:022-23542805, E-mail: fangzhizhongtj@163.com

[Key words] Houzao Niuhuangsan; pinocembrin; cardamonin; sipeimine; sipeimine-3 β -D-glucoside; HPLC-ELSD

猴枣牛黄散为中药复方制剂,由草豆蔻、川贝母(蛇胆汁制)、猴枣、猪牙皂、牛黄、细辛、珍珠(水飞)、琥珀(水飞)、石菖蒲、朱砂(水飞)、人工麝香、硝石、冰片、白矾(煨)、甘草、全蝎(制)等 16 味药物组成。具有除痰镇惊、通窍之功效,可用于小儿惊风、痰涎壅盛等症的治疗^[1-2]。猴枣牛黄散辅助治疗支气管肺炎疗效显著,有利于缩短病程,且无明显不良反应,同时有效地排除气道内的黏稠分泌物,从而保持气道通畅,改善通气。另外该药还具有清热化痰、安神、清心定惊之效,有利于减少患儿烦躁,减少机体的耗氧量,对病情转归有助^[3-4]。原质量标准仅对方中一味药材进行了定性鉴别,未对方中的任何药味进行含量测定。为保证产品质量,确保临床疗效,本文采用高效液相色谱法对草豆蔻中乔松素、小豆寇明和川贝母中西贝母碱、西贝母碱苷进行含量测定方法研究,为完善该制剂质量标准提供依据。

1 材料

日本岛津 LC-10ATVP 型高效液相色谱仪(岛津自动进样器 SIL-10ADVP), ANASTAR 色谱数据工作站, Alltech 2000ES 型蒸发光散射器, SPD-10AVP 型紫外-可见检测器, 乔松素对照品(批号 111829-201001)、小豆寇明对照品(批号 110763-200403)、西贝母碱对照品(批号 110767-201005)和西贝母碱苷对照品(批号 111917-201001)均购于中国食品药品检定研究院;猴枣牛黄散(规格 0.36 g/瓶,批号 130410,130417,130420)购于佛山冯了性药业有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯,安徽时联特种溶剂股份有限公司),磷酸、二乙胺(分析纯,广州化学试剂二厂)。

2 方法与结果

2.1 乔松素和小豆寇明的含量测定^[5-10]

2.1.1 色谱条件及系统适应性 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 流动相 A 甲醇, B 0.5% 磷酸溶液, 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 55% A; 10 ~ 35 min, 55% ~ 70% A; 35 ~ 50 min, 70% A), 检测波长 300 nm, 流速 0.9 mL·min⁻¹。在此条件下乔松素和小豆寇明与其他组分分离效果良好,以乔松素计理论塔板数不低于 4 000。

2.1.2 检测波长的选择 分别取乔松素对照品和小豆寇明对照品适量,加甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.03 mg 的溶液,在 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描,结

果乔松素对照品在 300 nm 处有最大吸收,小豆寇明对照品在 301 nm 处有最大吸收,参考 2010 年版《中国药典》草豆蔻药材含量测定项下检测波长 300 nm,故将检测波长定用 300 nm。

2.1.3 对照品混合溶液的制备 精密称取乔松素对照品和小豆寇明对照品各适量,加甲醇制成对照品混合溶液(乔松素为 0.052 7 g·L⁻¹,小豆寇明为 0.036 2 g·L⁻¹)。

2.1.4 供试品溶液的配制 取本品内容物约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(200 W,频率 30 kHz)20 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.5 阴性对照溶液的配制 按猴枣牛黄散处方比例称取适量除草豆蔻的其余药味,按猴枣牛黄散的前处理和制剂生产工艺制成缺草豆蔻的阴性样品,按照 2.1.4 方法制成缺草豆蔻的阴性对照溶液。

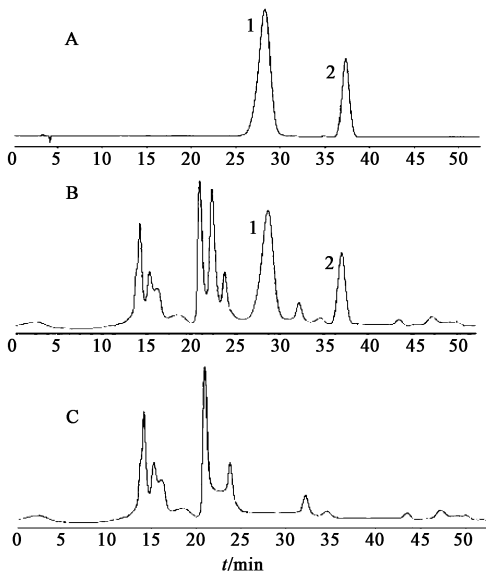
2.1.6 线性关系考察 精密吸取对照品混合溶液 1, 5, 10, 15, 20 μ L, 按 2.1.1 色谱条件进行测定,以峰面积积分为纵坐标,乔松素、小豆寇明量为横坐标分别绘制标准曲线,得回归方程 $Y_{\text{乔松素}} = 3.198 3 \times 10^6 X + 946.4 (r = 0.999 4)$, $Y_{\text{小豆寇明}} = 2.999 2 \times 10^6 X - 621.2 (r = 0.999 8)$ 。表明乔松素在 0.052 7 ~ 1.054 μ g 进样量与峰面积线性关系良好,小豆寇明在 0.036 2 ~ 0.724 0 μ g 进样量与峰面积线性关系良好。

2.1.7 阴性对照试验 分别精密吸取 10 μ L 的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液,按 2.1.1 项的色谱条件进行色谱分析,供试品溶液色谱中,在与乔松素对照品和小豆寇明对照品相同保留时间处有吸收峰,而阴性对照溶液在相同保留时间处未显吸收峰,见图 1。

2.1.8 精密度试验 取对照品混合溶液重复进样 6 次,按 2.1.1 项的色谱条件测定乔松素和小豆寇明的峰面积,结果表明仪器具有良好的精密度,乔松素和小豆寇明的 RSD 分别为 0.97%, 0.64%。

2.1.9 重复性试验 取同一批样品,按上述方法制备 6 份供试品溶液,分别测定其含量,乔松素和小豆寇明的 RSD 分别为 0.46%, 0.69%, 表明本方法具有良好的重复性。

2.1.10 稳定性试验 取同一供试品溶液,在放置



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照品; 1. 乔松素; 2. 小豆寇明

图1 猴枣牛黄散中乔松素和小豆寇明的HPLC

0, 1, 2, 4, 6, 8 h后精密吸取10 μL 进样,测定其峰面积值,乔松素和小豆寇明的RSD分别为0.81%, 0.72%,供试品溶液8 h内基本稳定。

2.1.11 加样回收率试验 取已知含量(乔松素含量0.54 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、小豆寇明含量0.38 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)的同一批样品适量,取1.0 g,精密称定,置25 mL具塞锥形瓶中,分别精密加入对照品混合溶液10 mL,按供试品溶液制备方法制成加样供试液。精密吸取加样供试液10 μL ,按上述含量测定方法测定其峰面积,计算回收率,表明本方法回收率良好,见表1。

表1 猴枣牛黄散中乔松素和小豆寇明回收率试验

成分	取样量 /g	样品含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
乔松素	1.039 7	0.561 4	1.064 7	95.50	97.14	1.10
	1.132 4	0.611 5	1.123 9	97.23		
	1.025 9	0.554 0	1.062 1	96.42		
	0.981 5	0.530 0	1.042 4	97.23		
	1.012 9	0.547 0	1.065 1	98.32		
	0.991 1	0.535 2	1.052 6	98.18		
小豆寇明	1.039 7	0.395 1	0.742 5	95.97	97.64	1.39
	1.132 4	0.430 3	0.780 6	96.76		
	1.025 9	0.389 8	0.741 9	97.25		
	0.981 5	0.373 0	0.730 4	98.74		
	1.012 9	0.384 9	0.745 8	99.70		
	0.991 1	0.376 6	0.729 3	97.43		

注:对照品混合溶液加入量为10 mL,即乔松素为0.527 mg,小豆寇明为0.362 mg。

2.2 西贝母碱和西贝母碱苷的含量测定^[7-10]

2.2.1 色谱条件及系统适应性 Hypersil C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),乙腈-水-二乙胺(65:35:0.5)为流动相,ELSD漂移管温度80 $^{\circ}\text{C}$,载气(N_2)流速2.3 $\text{SLPM}\cdot\text{min}^{-1}$,流速0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在此条件下西贝母碱和西贝母碱苷与其他组分基线分离良好,以西贝母碱理论塔板数不低于3 000。

2.2.2 对照品混合溶液的制备 精密称取西贝母碱和西贝母碱苷对照品适量,置25 mL量瓶中,加三氯甲烷-甲醇(3:2)溶解后稀释至刻度,摇匀,即得对照品混合溶液(西贝母碱0.057 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和西贝母碱苷0.081 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

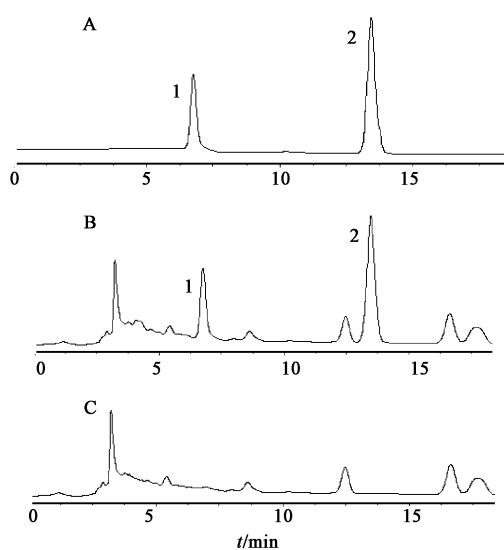
2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研成细粉,称取10.0 g,精密称定至烧瓶中,加浓氨溶液10 mL浸渍1 h,精密加入三氯甲烷-甲醇(3:2)混合溶液100 mL,称定质量,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用三氯甲烷-甲醇(3:2)混合溶液补足减失质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液50 mL,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至10 mL量瓶中,摇匀,用微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按猴枣牛黄散处方比例称取适量除川贝母的其余药味,按猴枣牛黄散的前处理和制剂生产工艺制成缺川贝母的阴性样品,按照方法制成缺川贝母的阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取对照品混合溶液1, 5, 10, 15, 20 μL ,按2.2.1项下的色谱条件进行测定,以峰面积的自然对数值为纵坐标,西贝母碱、西贝母碱苷的自然对数值为横坐标分别绘制标准曲线,回归方程 $Y_{\text{西贝母碱}} = 0.99X + 5.07$ ($r = 0.999 1$), $Y_{\text{西贝母碱苷}} = 1.07X + 4.95$ ($r = 0.999 5$),表明西贝母碱在0.057 1 ~ 1.142 μg 进样量的自然对数值与峰面积的自然对数值线性关系良好,西贝母碱苷在0.081 3 ~ 1.626 μg 进样量的自然对数值与峰面积的自然对数值线性关系良好。

2.2.6 阴性对照试验 分别精密吸取10 μL 的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液,按2.2.1项的色谱条件进行色谱分析,结果阴性无干扰,表明含量测定方法具有良好的专属性,见图2。

2.2.7 稳定性试验 取同一批样品,按2.2.3制备供试品溶液,在放置0, 1, 2, 4, 6, 8 h后精密吸取10 μL 进样,测定其峰面积值,西贝母碱和西贝母碱苷RSD分别为0.81%, 0.75%,表明供试品溶液8 h内基本稳定。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照品; 1. 西贝母碱; 2. 西贝母碱苷

图 2 猴枣牛黄散中西贝母碱和西贝母碱苷的 ELSD

2.2.8 重复性试验 取同一批样品,按上述方法制备 6 份供试品溶液,分别测定其含量,西贝母碱和西贝母碱苷的 RSD 分别为 0.73% ,0.54% ,表明本方法具有良好的重复性。

2.2.9 精密度试验 取对照品混合溶液进样 6 次,按 2.2.1 项的色谱条件测定西贝母碱和西贝母碱苷的峰面积,结果表明,仪器具有良好的精密度,西贝母碱 RSD 0.45% ,西贝母碱苷 RSD 0.91% 。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量(西贝母碱 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、西贝母碱苷 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的同一批样品适量,研成细粉,称取 5.0 g,精密称定至烧瓶中,分别精密加入对照品混合溶液 10 mL,再加浓氨溶液 10 mL 浸渍 1 h,精密加入三氯甲烷-甲醇(3:2)混合溶液 90 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用三氯甲烷-甲醇(3:2)混合溶液补足损失质量,摇匀,滤过,

精密量取续滤液 50 mL,置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,用微孔滤膜滤过,取续滤液作为加样供试液。精密吸取加样供试液 10 μL ,按上述含量测定方法测定其峰面积,计算回收率,表明本方法回收率良好,见表 2。

表 2 猴枣牛黄散中西贝母碱和西贝母碱苷回收率试验

成分	取样量 /g	样品含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
西贝母碱	5.021 6	0.552 4	1.120 4	99.48	97.55	1.75
	4.982 5	0.548 1	1.092 7	95.38		
	4.995 7	0.549 5	1.101 3	96.63		
	5.019 4	0.552 1	1.112 5	98.14		
	5.010 8	0.551 2	1.118 6	99.37		
	4.989 1	0.548 8	1.098 5	96.27		
西贝母碱苷	5.021 6	0.803 5	1.607	98.84	98.09	1.80
	4.982 5	0.797 2	1.590	97.52		
	4.995 7	0.799 3	1.619	100.82		
	5.019 4	0.803 1	1.601	98.14		
	5.010 8	0.801 7	1.597	97.82		
	4.989 1	0.798 3	1.574	95.42		

注:对照品混合溶液加入量为 10 mL,即西贝母碱为 0.571 mg,西贝母碱苷为 0.813 mg。

2.3 样品测定 取 3 批样品按 2.1 项下乔松素和小豆蔻明测定方法,分别精密吸取对照品混合溶液和供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定乔松素和小豆蔻明的含量,结果见表 3。

取 3 批样品按 2.2 项下西贝母碱和西贝母碱苷测定方法,分别精密吸取对照品混合溶液 5, 10 μL 和供试品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,测定,用外标两点法对数方程分别测定本品中西贝母碱和西贝母碱苷的含量,结果见表 3。

表 3 猴枣牛黄散中 4 种成分含量测定

批号	乔松素/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			小豆蔻明/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			西贝母碱/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			西贝母碱苷/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	含量	平均含量	RSD/%	含量	平均含量	RSD/%	含量	平均含量	RSD/%	含量	平均含量	RSD/%
130410	0.538	0.54	0.28	0.378	0.38	0.53	0.109	0.11	0.91	0.159	0.16	0.95
	0.541			0.382			0.111			0.161		
	0.540			0.380			0.110			0.162		
130417	0.576	0.58	0.96	0.375	0.38	0.85	0.120	0.12	0.83	0.171	0.17	0.90
	0.572			0.381			0.121			0.172		
	0.583			0.376			0.119			0.169		
130420	0.564	0.56	0.45	0.391	0.39	0.68	0.108	0.11	0.53	0.181	0.18	0.85
	0.559			0.387			0.109			0.179		
	0.562			0.386			0.108			0.178		

3 讨论

西贝母碱和西贝母碱苷测定时分别以甲醇-水(65:35)、乙腈-水-二乙胺(75:25:0.5)和乙腈-水-二乙胺(65:35:0.5)为流动相,结果甲醇-水(65:35)分离效果不好,未达到基线分离,乙腈-水-二乙胺(75:25:0.5)西贝母碱峰形良好,但西贝母碱苷达不到基线分离,乙腈-水-二乙胺(65:35:0.5)均能达到基线分离,峰形较好。故选用乙腈-水-二乙胺(65:35:0.5)为流动相。

草豆蔻和川贝母为方中主要药物,草豆蔻具有燥湿行气,温中止呕的功效,可用于寒湿内阻、脘腹胀满冷痛、暖气呕逆、不思饮食等症的治疗。川贝母具有清热润肺、化痰止咳、散结消痈的功效,可用于肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、痰中带血、瘰疬、乳痈、肺痈等症的治疗。同时乔松素和小豆寇明为草豆蔻主要成分,西贝母碱和西贝母碱苷为川贝母主要成分,本文采用高效液相色谱法对草豆蔻中乔松素、小豆寇明和川贝母中西贝母碱、西贝母碱苷进行含量测定方法研究,对完善本品的质量标准具有十分重要的作用,能有效控制产品的内在质量。

[参考文献]

[1] 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,2010:34,222,附录30,

附录36.

- [2] 国家药典委员会. 国家药品标准中药成方制剂. 第10册[S]. 北京:人民卫生出版社,1998:186.
- [3] 虞军勇,郑旭红,赵彬泉. 猴枣牛黄散辅助治疗支气管肺炎50例的疗效观察[J]. 海峡药学,2011,23(2):132.
- [4] 张蓓,王瑞芹,谢晓红,等. 小儿支气管肺炎60例临床诊治疗效观察[J]. 健康之路,2011,11(11):66.
- [5] 李元圆,俞桂新,杨莉,等. 草豆蔻药材质量控制方法研究[J]. 中国中药杂志,2012,35(16):2091.
- [6] 贺晓华,王小淞,曾建国,等. HPLC法测定赶黄草中槲皮苷、槲皮素和乔松素-7-O-葡萄糖苷[J]. 中草药,2009,40(6):981.
- [7] 黄林芳,陈士林,刘辉,等. HPLC-ELSD测定不同加工方法川贝母中3种生物碱[J]. 中成药,2009,31(10):1560.
- [8] 范蕾,王伟影. 可同时测定蛇胆川贝液中贝母素甲与贝母素乙含量的方法[J]. 中国药业,2012,21(2):41.
- [9] 黄梦娴. 三蛇胆川贝糖浆中总生物碱含量测定[J]. 广西医学,2001,23(4):757.
- [10] 邹毓兰,吕海涛. 草豆蔻中山姜素和小豆蔻明的HPLC测定及提取工艺优化[J]. 中成药,2011,33(1):145.

[责任编辑 顾雪竹]