

HPLC 测定复方龙脷胶囊中栀子苷和大黄素甲醚

杜成智, 谭建宁*, 马雯芳
(广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立复方龙脷胶囊中栀子苷和大黄素甲醚的测定方法。方法: 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相分别为乙腈-水 (15:85)、甲醇-水 (95:5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长分别为 238, 254 nm, 柱温 25 °C。结果: 栀子苷、大黄素甲醚分别在 0.493 2 ~ 2.959 2 μg ($r=0.999 5$) 和 0.063 4 ~ 0.380 4 μg ($r=1.000 0$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 100.4%, 101.3%, RSD 分别为 1.9%, 1.7%。结论: 方法简便可行, 结果准确, 重复性好, 可用于复方龙脷胶囊中栀子苷和大黄素甲醚的含量测定。

[关键词] 复方龙脷胶囊; 高效液相色谱; 栀子苷; 大黄素甲醚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0135-04

[doi] 10.11653/syfy2013140135

Determination of Geniposide and Physcion in Compound Longli Capsule by HPLC

DU Cheng-zhi, TAN Jian-ning*, MA Wen-fang
(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of Geniposide and Physcion in Compound Longli Capsule. **Method:** Waters Symmetry C₁₈ analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was consisted of acetonitrile-water (15:85) and methanol-water (95:5) respectively; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, UV detection wavelength was set at 238, 254 nm respectively. The column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** Under the chromatographic conditions used, the calibration curve of geniposide and physcion was linear in the range of 0.493 2-2.959 2 μg ($r=0.999 5$) and 0.063 4-0.380 4 μg ($r=1.000 0$) respectively. The average recoveries was 100.4% and 101.3% with RSD 1.9% and 1.7% respectively. **Conclusion:** The method is accurate, effective and feasible. It can be used for the determination of the content of geniposide and physcion contained in Compound Longli capsule.

[Key words] Compound Longli capsule; HPLC; geniposide; physcion

龙脷叶^[1]是广西特有的壮族药用资源,在壮医临床上作为方药广为使用。壮药复方龙脷胶囊组方来源于壮药经验方,其由壮药龙脷叶(壮药名:蒙凵

堑)、栀子、麦冬、白芍、大黄共 5 味药材组成,具有清热润肺、疏肝除烦、养阴通便的功效,经多年临床使用,对精神病障碍引起的阴虚火旺证,症见烦躁、便秘等有很好的疗效。为了对该品种进行更加全面的现代研究,按照国家中药新药六类的技术要求进行全面研究。栀子^[2]为方中的君药,主心烦躁、不眠、除心神颠倒欲绝、利五淋、通小便、去胸中之热甚,大黄为使药,能迅速泻火通便排毒,又助君药滋阴养血、血盈津丰、火不自生^[3-4]。为有效控制复方龙脷胶囊的质量,本研究参考相关文献^[5-10]建立了复方龙脷胶囊中栀子苷和大黄素甲醚两种成分的含

[收稿日期] 20121014(002)

[基金项目] 广西千亿元重大科技攻关工程项目(桂科攻 11107009-2-6)

[第一作者] 杜成智,讲师,硕士,从事药物分析研究, Tel: 0771-2219877, E-mail: 276561774@qq.com

[通讯作者] * 谭建宁,研究生,高级实验师,从事中药化学成分及质量标准研究, Tel: 0771-2219877, E-mail: 648545814@qq.com

量测定方法。

1 材料

美国 Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪 [四元泵, 在线脱气机, 自动进样器 (G1329B), 柱温箱], KQ3200B 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司), LG16-WA 型台式高速离心机 (北京京立离心机有限公司), 超纯水系统 (MILLIPORE), CP224S 型电子分析天平 (Sartorius 德国)。乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为高纯水。栀子苷对照品 (批号 110749-200714), 大黄素甲醚对照品 (批号 110758-201013) 由中国药品生物制品检定所提供。复方龙胆胶囊 (批号 120601, 120602, 120603, 120604, 120605, 120606) 由广西鸿博药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 栀子苷色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流动相乙腈-水 (15: 85), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 238 nm, 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 栀子苷峰与其他成分分离良好。

2.1.2 大黄素甲醚色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流动相甲醇-水 (95: 5), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 大黄素甲醚峰与其他成分分离良好。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取栀子苷对照品 12.33 mg, 加甲醇制成每 1 mL 含栀子苷 0.493 2 mg 的溶液, 即得栀子苷储备液。

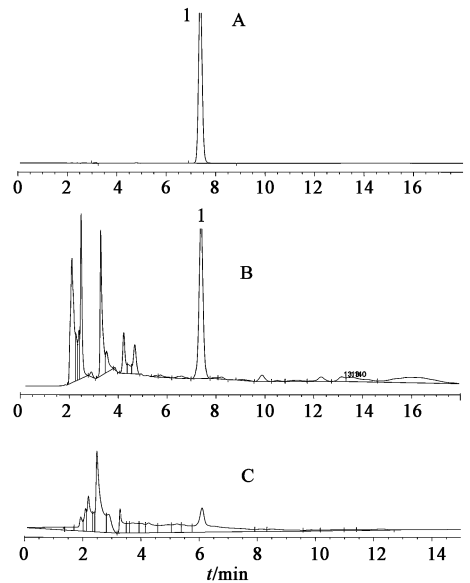
精密称取大黄素甲醚对照品 3.17 mg, 加甲醇制成每 1 mL 含大黄素甲醚 0.063 4 mg 的溶液, 即得大黄素甲醚储备液。

2.2.2 供试品溶液 取复方龙胆胶囊内容物 (批号 120602) 约 1.0 g, 精密称定后置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 精密称定后超声处理 20 min, 放冷, 补足减失质量。滤过后取续滤液离心 10 min, 静置, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得测栀子苷供试品溶液。

取复方龙胆胶囊内容物 (批号 120602) 约 0.7 g, 精密称定后置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 精密称定后超声处理 30 min, 放冷, 补足减失质量。滤过后取续滤液离心 10 min, 静置, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得测大黄素甲醚供试品溶液。

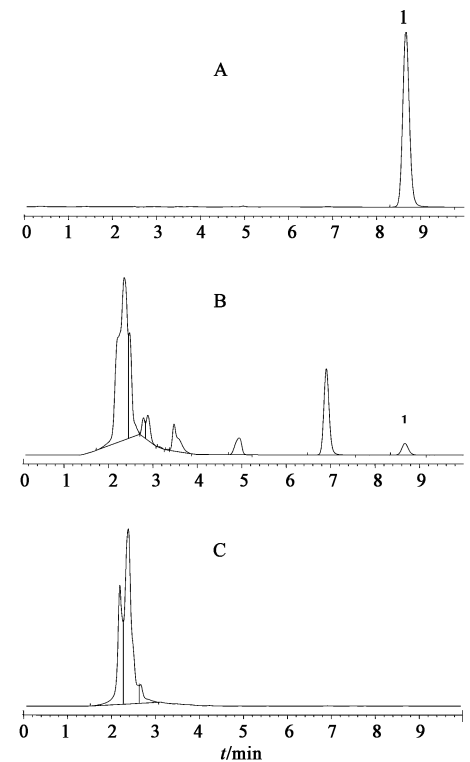
2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例及工艺配制缺栀子以及缺大黄的复方龙胆胶囊, 按供试品溶液的

制备方法, 制备阴性样品溶液, 按 2.1 项色谱条件下吸取 10 μL 进样。结果表明, 阴性样品在栀子苷及大黄素甲醚相应位置处无吸收峰, 表明无阴性干扰。对照品, 样品及阴性样品色谱图见图 1, 2。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性样品; 1. 栀子苷

图 1 栀子苷对照, 复方龙胆胶囊样品及缺栀子阴性样品 HPLC



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性样品; 1. 大黄素甲醚

图 2 大黄素甲醚对照, 复方龙胆胶囊样品及缺大黄阴性样品 HPLC

2.3 系统适应性试验

2.3.1 栀子苷 分别吸取栀子苷对照品溶液和供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1.1 项下色谱条件记录色谱图,结果栀子苷的保留时间为 7 min 左右,阴性对照样品对测定无干扰,色谱图见图 1,栀子苷峰与邻近峰达到基线分离,分离度良好($R > 1.5$)。

2.3.2 大黄素甲醚 分别吸取大黄素甲醚对照品溶液和供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1.2 项下色谱条件记录色谱图,结果大黄素甲醚的保留时间为 9 min 左右,阴性对照样品对测定无干扰,色谱图见图 2,大黄素甲醚峰与邻近峰达到基线分离,分离度良好($R > 1.5$)。

2.4 栀子苷方法学考察

2.4.1 线性试验 精密吸取 2.2.1 项下栀子苷对照品储备液适量,加甲醇定容,配制栀子苷系列对照品溶液,分别吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1.1 项下色谱条件测定峰面积。以对照品的进样量(μg)对峰面积进行线性回归,求得回归方程为 $Y = 1\,530X - 52.92$ ($r = 0.999\,5$),其线性范围为 0.493 2 ~ 2.959 2 μg 。

2.4.2 精密度试验 精密吸取栀子苷对照品溶液 10 μL ,重复进样 6 次,测得峰面积,峰面积积分值 RSD 0.21% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液按上述色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,测定其峰面积的 RSD 1.4% ($n = 6$)。结果表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一批号龙胆胶囊样品(批号 120602)6 份,分别按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,并依法测定,计算得平均含量为 1.889 mg/粒, RSD 2.2% ($n = 6$),说明该法重复性较好。

2.4.5 加样回收率试验 取已知栀子苷含量的样品(批号 120602)6 份,取约 0.5 g,精密称定,分别精密加入栀子苷对照品溶液($2.496\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 mL,其余操作按 2.2.2 项下的方法制备,测定,计算,结果平均加样回收率为 100.4%, RSD 1.9% ($n = 6$),说明本方法准确度较好。结果见表 1。

2.4.6 样品含量测定 复方龙胆胶囊装样规格约为 0.36 g/粒,取 6 个批号样品,按 2.2.2 项制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件测定,结果见表 2。

2.5 大黄素甲醚方法学考察

2.5.1 线性试验 精密吸取 2.2.1 项下大黄素甲

表 1 栀子苷加样回收率试验 ($n = 6$)

| 原有量 /mg | 加入量 /mg | 测定量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 2.498 9 | 2.496 | 5.001 9 | 100.3 | | |
| 2.524 2 | 2.496 | 4.977 6 | 98.29 | | |
| 2.517 8 | 2.496 | 5.023 5 | 100.4 | 100.4 | 1.9 |
| 2.524 8 | 2.496 | 5.021 5 | 100.0 | | |
| 2.512 8 | 2.496 | 5.106 9 | 103.9 | | |
| 2.507 8 | 2.496 | 4.996 7 | 99.71 | | |

表 2 样品中栀子苷的测定 ($n = 3$)

| 批号 | 栀子苷/(mg/粒) | RSD/% |
|--------|------------|-------|
| 120601 | 2.07 | 1.7 |
| 120602 | 1.93 | 1.8 |
| 120603 | 2.00 | 0.3 |
| 120604 | 2.00 | 0.5 |
| 120605 | 1.99 | 1.6 |
| 120606 | 1.96 | 1.5 |

醚对照品储备液适量,加甲醇定容,配制大黄素甲醚系列对照品溶液,分别吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1.2 项下色谱条件测定峰面积。以对照品的进样量(μg)对峰面积进行线性回归,求得回归方程为 $Y = 3\,759X + 1.986$ ($r = 1.000\,0$),其线性范围为 0.063 4 ~ 0.380 4 μg 。

2.5.2 精密度试验 精密吸取大黄素甲醚对照品溶液 10 μL ,重复进样 6 次,测得峰面积,峰面积积分值 RSD 0.06% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取供试品溶液按上述色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,测定其峰面积的 RSD 0.23% ($n = 6$),结果表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批号龙胆胶囊样品(批号 120602)6 份,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,并依法测定,计算得平均含量为 0.225 mg/粒, RSD 1.2% ($n = 6$),说明该法重复性较好。

2.5.5 加样回收率试验 取已知大黄素甲醚含量的样品(批号 120602)6 份,取约 0.16 g,精密称定,分别精密加入大黄素甲醚对照品溶液($0.063\,4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 mL,其余操作按 2.2.2 项下方法,测定,计算,结果平均加样回收率为 101.3%, RSD 1.7% ($n = 6$),说明本方法准确度较好。结果见表 3。

2.5.6 样品含量测定 复方龙胆胶囊装样规格约为 0.36 g/粒,取 6 个批号样品,按 2.2.2 项制备供

表 3 大黄素甲醚加样回收率试验 (n = 6)

| 原有量 /mg | 加入量 /mg | 测定量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 0.099 7 | 0.063 4 | 0.163 1 | 99.96 | | |
| 0.095 0 | 0.063 4 | 0.158 4 | 99.93 | | |
| 0.097 5 | 0.063 4 | 0.162 1 | 101.9 | | |
| 0.094 7 | 0.063 4 | 0.158 8 | 101.1 | 101.3 | 1.7 |
| 0.096 6 | 0.063 4 | 0.162 7 | 104.3 | | |
| 0.098 7 | 0.063 4 | 0.162 3 | 100.4 | | |

表 4 样品中大黄素甲醚的测定 (n = 3)

| 批号 | 大黄素甲醚/(mg/粒) | RSD/% |
|--------|--------------|-------|
| 120601 | 0.23 | 1.3 |
| 120602 | 0.23 | 1.4 |
| 120603 | 0.23 | 0.8 |
| 120604 | 0.28 | 1.5 |
| 120605 | 0.29 | 1.6 |
| 120606 | 0.28 | 0.9 |

试品溶液,在 2.1 项色谱条件测定,结果见表 4。

3 讨论

该制剂用于治疗精神病障碍引起的烦躁和便秘等症,由于大黄素甲醚可通过血脑屏障^[11],且具有很强的抗炎和泻下作用,是该制剂的主要有效成分;故选择测定大黄素甲醚的含量作为该制剂质控指标之一。

中药材和中药复方成分种类复杂,研究中常会碰到同时测定多个成分且各成分的紫外吸收不同的问题,本实验采用 238 nm^[12]测定栀子苷,采用 254 nm^[12]测定大黄素甲醚可避免杂质影响又可满足灵敏度要求。

曾分别采用不同比例的乙醇、甲醇超声提取和回流考察提取率,结果显示 100% 甲醇超声提取即可较好去除干扰杂质又可提取完全效果最佳。但对超声时间进行考察时发现 100% 甲醇超声 20 min 提取栀子苷完全,而 100% 甲醇超声 30 min 提取大黄素甲醚才能提取完全。故确定 100% 甲醇超声提取 20 min 为栀子苷提取方案,而 100% 甲醇超声提取 30 min 为大黄素甲醚提取方案,提取省时完全,操作简单,重复性好。

在流动相的选择中,分别考察了甲醇-水(95:5)、甲醇-水(85:15)、甲醇-水(60:40)、乙腈-水(85:15)、乙腈-水(50:50)、乙腈-水(20:80)、乙腈-水(15:85)等多种流动相的分离效果,经过实验分

析,综合考虑了分离效果、基线平稳、操作方便性等情况,最终确定乙腈-水(15:85)、甲醇-水(95:5)为测定栀子苷及大黄素甲醚最佳流动相,该条件下测定物质出峰快,与杂质峰的分离度均 > 1.5。

比较了 Agilent、月旭、Waters 不同色谱柱的分离效能,结果发现 Waters 色谱柱分离效果、峰型均较好,而另两种色谱柱所得峰型有拖尾,且峰型不佳,因此采用 Waters 色谱柱。

本实验通过 6 个不同批次的样品的含量测定,摸索出 HPLC 测定复方龙胆胶囊中栀子苷和大黄素甲醚的含量,可作为复方龙胆胶囊含量测定的质量控制标准。

[参考文献]

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准. 第 1 卷[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2008:77.

[2] 张海燕, 邬伟魁, 杨军宣, 等. 栀子对心脑血管系统的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):294.

[3] 杨伟鹏, 王怡薇, 王彦礼, 等. 不同炮制方法对大黄泻下、解热、抗炎作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):117.

[4] 李燕, 隋峰, 刘亮亮, 等. 大黄各炮制品提取物泻下作用的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):151.

[5] 胡震, 杨广德, 罗国安, 等. 栀子中栀子苷提取工艺及 HPLC 分析[J]. 中成药, 2006, 28(3):336.

[6] 韩凤梅, 李宇, 李路军, 等. 高效液相色谱法测定安宫牛黄丸中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14):1406.

[7] 牛德斌. HPLC 测定栀子金花丸中 2 类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):96.

[8] 吕士杰, 李妍, 芦晓晶, 等. HPLC 测定苓丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 16(6):81.

[9] 李丹, 阎姝. 茵陈蒿汤及其单味颗粒中 7 种成分比较[J]. 医药导报, 2013, 32(2):215.

[10] 夏从龙, 周浓, 种佳. HPLC 测定不同厂家牛黄消炎片中 5 种蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):83.

[11] 韩国柱. 中草药药代动力学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1999:345.

[12] 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, 2010:22, 232.

[责任编辑 顾雪竹]