

HPLC 测定双黄祛毒片中 7 种成分的含量

陈云龙¹, 卢小凤¹, 廖锦彬¹, 林荣锋¹, 黄晓其¹, 易宇阳¹, 苏子仁^{1,2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 建立测定双黄祛毒片(盐酸小檗碱、大黄、五倍子)含量的方法。方法: 采用 HPLC 在同一色谱条件 ZORBAX SB-Pheny 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)对没食子酸、盐酸小檗碱、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚进行含量测定。结果: 线性范围分别为 0.12 ~ 2.4 μg ($r = 0.9999$), 盐酸小檗碱线性范围 0.11 ~ 2.2 μg ($r = 0.9999$), 0.015 ~ 0.3 μg ($r = 0.9998$), 0.02 ~ 0.4 μg ($r = 0.9998$), 0.008 ~ 0.16 μg ($r = 0.9999$), 0.013 ~ 0.26 μg ($r = 0.9998$), 0.006 ~ 0.12 μg ($r = 0.9999$), 平均回收率分别为 100.97%, 100.20%, 99.01%, 99.76%, 101.10%, 101.97%, 101.56%。结论: 该方法简便、快速、准确, 重复性好, 可作为双黄祛毒片中没食子酸、盐酸小檗碱、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚含量测定方法。

[关键词] 双黄祛毒片; 没食子酸; 盐酸小檗碱; 大黄酸; 大黄酚; 芦荟大黄素; 大黄素; 大黄素甲醚; 高效液相色谱法
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0119-04

HPLC Simultaneous Determination of 7 Components in Shuanghuangqudu Tablets

CHEN Yun-long¹, LU Xiao-feng¹, LIAO Jin-bin¹, LIN Rong-feng¹,
HUANG Xiao-qi¹, YI Yu-yang¹, SU Zi-ren^{1,2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of gallic acid, berberine hydrochloride, aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Shuanghuangqudu tablets. **Method:** The HPLC system consisted of a ZORBAX SB-Pheny Dimensions column (4.6 mm × 15 cm, 5 μm), methanol-0.1% phosphoric acid as mobile phase (using gradient) with flowing rate 1.0 mL · min⁻¹ and detected at 310 nm. **Result:** The linear ranges of gallic acid, berberine hydrochloride, aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion were 0.12-2.4 μg ($r = 0.9999$), 0.11-2.2 μg ($r = 0.9999$), 0.015-0.3 μg ($r = 0.9998$), 0.02-0.4 μg ($r = 0.9998$), 0.008-0.16 μg ($r = 0.9999$), 0.013-0.26 μg ($r = 0.9998$), 0.006-0.12 μg ($r = 0.9999$), respectively, and the average recoveries ($n = 9$) were 100.97%, 100.20%, 99.01%, 99.76%, 101.10%, 101.97%, 100.56%, respectively. **Conclusion:** The method is simple and repeatable, which can be applied to determine seven ingredients at the same test condition in Shuanghuangqudu tablets.

[Key words] Shuanghuangqudu tablets; gallic acid; berberine hydrochloride; aloe emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; HPLC

双黄祛毒片是由大黄、五倍子、盐酸小檗碱 3 味

药制成的中药制剂, 具有清热解毒、收敛止泻的作用, 临床上常用于赤痢泻下、腹泻、湿热便血等。方中大黄苦寒泻下; 五倍子收敛止泻、解毒止血, 可缓和 大黄强烈泻下作用同时增强清热解毒的功效; 盐酸小檗碱有较强的抗菌作用, 可增强本方的收敛止泻之功。针对本方中大黄、五倍子、盐酸小檗碱三味

[收稿日期] 20111011(007)

[第一作者] 陈云龙, 研究生, 从事中药新药研究, Tel: 15920186407, E-mail: cyl_cn@hotmail.com

[通讯作者] * 苏子仁, 本科, 研究员, 从事中药新药研究, Tel: 13763393599, E-mail: suziren@gzhtcm.edu.cn

药物,目前尚无其测定方法。为了保证临床上的用药安全性和有效性,在参照药典规定和相关文献报道^[1-7],笔者采用高效液相色谱法在同一色谱条件下测定本方中的主要成分盐酸小檗碱、没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进行含量测定,作为其质量控制的方法。

1 仪器和试剂

LC-20AT 型液相色谱仪 (SIL-20A Auto Sample Injector, LC-20AT Pump, SPD-20A Detector, Shimadzu), STH585 Column Oven 柱温箱 (Dionex), KQ3200DE 型医用数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司), 实验室专用超纯水机 (重庆颐洋实业发展有限公司), CT225D 型电子分析天平 (Sartorius), 盐酸小檗碱对照品 (批号 110713-200609)、没食子酸 (批号 110831-200302)、大黄酸 (批号 110757-200206)、大黄酚 (批号 110796-200615)、芦荟大黄素 (批号 110795-200605)、大黄素 (批号 110756-200110)、大黄素甲醚 (批号 110758-200610), 对照品均由中国药品生物制品检定所提供, 双黄祛毒片 (批号 20110118, 20110121, 20110125) 由广州中医药大学新药开发研究中心提供, 甲醇为色谱纯试剂 (Merck 公司), 超纯水 (自制), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX SB-Pheny 色谱柱 (4.6 mm × 15 cm, 5 μm), 以甲醇 (A)-0.1% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 10% A, 15 min, 50% A, 30 min, 85% A, 40 min, 85% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 310 nm。

2.2 溶液配置

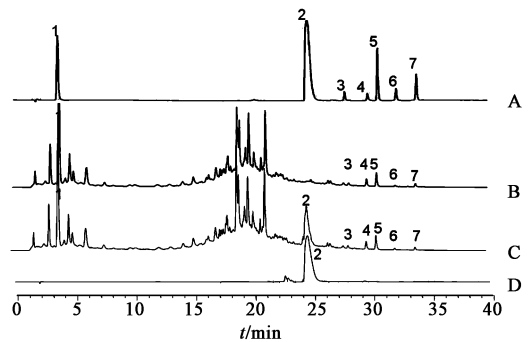
2.2.1 对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱 7.7 mg 置 10 mL 量瓶中、没食子酸 8.4 mg 置 10 mL 量瓶中、芦荟大黄素 11.2 mg 置 200 mL 量瓶中、大黄酸 7.0 mg 置 100 mL 量瓶中、大黄素 10.5 mg 置 100 mL 量瓶中、大黄酚 8.6 mg 置 100 mL 量瓶中、大黄素甲醚 8.4 mg 置 200 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得各对照品母液。从上述 7 种对照品母液中分别精密移取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 混匀, 即得没食子酸、盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为 120, 110, 8, 10, 15, 6, 6 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取质量差异项下的双黄祛毒片 (素片, 0.3 g/片), 碾碎, 混合均匀, 取约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL,

称定质量, 超声 30 min (40 kHz, 200 W), 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按双黄祛毒片的制备工艺分别制得不含大黄、大黄和五倍子、盐酸小檗碱的阴性样品, 按 2.2.2 项下操作方法分别制得各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 取以上对照品混合溶液 10 μL、供试品溶液及阴性样品溶液各 8 μL, 在上述色谱条件下进行测定。结果阴性样品溶液在对照品相同的保留时间位置上未见色谱峰, 说明阴性无干扰, 见图 1。



A. 对照品; B. 缺盐酸小檗碱样品; C. 供试品;
D. 缺大黄、五倍子阴性样品溶液

- 1. 没食子酸; 2. 盐酸小檗碱; 3. 芦荟大黄素;
4. 大黄酸; 5. 大黄素; 6. 大黄酚; 7. 大黄素甲醚

图 1 双黄祛毒片中 7 个成分的 HPLC

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 进样, 测定其峰面积。以峰面积值 (mAU) 为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标作图, 进行线性回归分析, 得出双黄祛毒片中 7 种指标成分的标准曲线方程、相关系数及线性范围 (表 1)。结果表明, 7 种指标成分在各自线性范围内, 峰面积值与进样量呈良好的线性关系。

表 1 7 种指标成分的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/μg
没食子酸	$Y = 1\,394\,492.22X + 6\,407.14$	0.999 9	0.12 ~ 2.4
盐酸小檗碱	$Y = 2\,988\,666.67X + 2\,285.71$	0.999 9	0.11 ~ 2.2
芦荟大黄素	$Y = 465\,495.28X - 187.09$	0.999 8	0.008 ~ 0.16
大黄酸	$Y = 901\,177.04X - 437.93$	0.999 8	0.01 ~ 0.2
大黄素	$Y = 1\,057\,857.23X + 729.13$	0.999 9	0.015 ~ 0.3
大黄酚	$Y = 652\,226.94X + 154.60$	0.999 8	0.006 ~ 0.12
大黄素甲醚	$Y = 1\,396\,772.01X - 581.83$	0.999 9	0.006 ~ 0.12

2.5 精密度试验 精密吸取没食子酸、盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲

醚对照品混合溶液 10 μL ,按上述色谱条件重复进样 6 次,测定峰面积并计算其 RSD,分别为 0.9%, 1.1%, 1.4%, 0.8%, 1.2%, 1.4%, 1.5%。结果表明该仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样测定,结果样品中各指标成分峰面积值的 RSD 分别为 1.6%, 0.4%, 1.0%, 0.8%, 1.2%, 1.5%, 1.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批号的双黄祛毒片,按 2.2.2 项下操作方法平行制备 6 份溶液进行测定,结果没食子酸、盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 0.4%, 0.2%, 1.9%, 1.6%, 1.7%, 0.9%, 1.2%, 表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品约 1 g,分别精密加入一定量的没食子酸、盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品,按 2.2.2 项下供试品制备供试品溶液,测定各组分的含量并计算回收率。结果没食子酸、盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均回收率分别为 100.97%, 100.20%, 99.01%, 99.76%, 101.10%, 101.97%, 100.56%, 见表 2。

2.9 样品测定 按 2.2.2 项下操作方法对 5 批样品进行测定,结果见表 3。

表 2 双黄祛毒片中 7 种成分加样回收率试验

成分	No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测定值 /mg	回收率(RSD) /%
没食子酸	1	5.117	4.077	9.227	100.36 (0.32)
	2	5.113	5.056	10.38	102.07 (0.51)
	3	5.112	6.124	11.29	100.48 (1.02)
盐酸小檗碱	1	5.224	4.012	9.341	101.14 (0.87)
	2	5.226	5.561	10.803	100.15 (1.48)
	3	5.233	6.014	11.171	99.32 (0.92)
芦荟大黄素	1	0.348	0.277	0.619	99.04 (1.41)
	2	0.337	0.326	0.655	98.79 (1.11)
	3	0.341	0.408	0.743	99.20 (1.56)
大黄酸	1	0.442	0.363	0.802	99.63 (0.73)
	2	0.444	0.429	0.877	100.46 (0.69)
	3	0.443	0.537	0.972	99.18 (1.13)
大黄素	1	0.654	0.528	1.21	102.37 (1.73)
	2	0.654	0.642	1.32	101.85 (0.42)
	3	0.656	0.767	1.41	99.09 (0.77)
大黄酚	1	0.111	0.086	0.202	102.54 (1.63)
	2	0.116	0.118	0.238	101.71 (0.89)
	3	0.111	0.131	0.246	101.65 (0.72)
大黄素甲醚	1	0.107	0.082	0.188	99.47 (0.59)
	2	0.104	0.108	0.213	100.47 (1.48)
	3	0.106	0.125	0.235	101.73 (0.98)

表 3 样品含量测定 ($n=2$)

样品批号	没食子酸		RSD		盐酸小檗碱		RSD		芦荟大黄素		RSD		大黄酸		RSD		大黄素		RSD		大黄酚		RSD		大黄素甲醚		RSD	
	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%	mg/片	/%		
20110118	1.33	0.43	1.36	0.45	0.09	1.15	0.12	0.93	0.17	0.83	0.03	0.21	0.03	0.27														
20110121	1.36	0.38	1.35	1.09	0.10	0.99	0.13	1.22	0.18	1.71	0.03	0.32	0.03	0.68														
20110125	1.35	0.55	1.36	0.35	0.09	0.79	0.13	0.64	0.17	1.03	0.04	0.41	0.03	1.01														
20110105	1.33	0.67	1.36	0.58	0.10	0.87	0.13	1.57	0.18	1.01	0.04	1.22	0.04	1.29														
20110107	1.37	0.25	1.39	1.13	0.11	0.48	0.15	0.93	0.18	0.77	0.04	0.68	0.04	1.16														

3 讨论

3.1 提取溶媒及时间的选择 本方中 7 个指标成分的溶解性不同,查阅文献后发现 7 个指标成分在 70% 甲醇溶液中溶解度良好^[8-9],故选择 70% 甲醇溶液作为提取溶媒。另外提取时间曾采用 15, 30, 45 min 3 个时间对进行试验,结果显示超声 30 min 和 45 min 的提取效果相当,而超声 15 min 则提取不完全,因此选择超声处理 30 min 为宜。

3.2 色谱柱选择 该制剂中的盐酸小檗碱、没食子

酸、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚均具有芳香结构,采用 C_{18} 柱分离效果不佳,改用苯基柱后能对 7 种成分进行有效分离。

3.3 流动相的选择 该制剂中(盐酸小檗碱、五倍子、大黄)7 种成分为不同化合物,采用药典^[1]测定其中某一药材指标成分的流动相体系无法同时对 7 种成分进行有效的分离测定。本色谱条件中的流动相体系是在多次试验及文献研究^[2-7]基础上建立的,采用甲醇-0.1% 的磷酸进行梯度洗脱,对双黄祛

RP-HPLC 测定藏成药十味手参散中胡椒碱的含量

陈海娟^{1*}, 纪兰菊²

(1. 青海师范大学生命与地理科学学院, 青藏高原环境与资源教育部重点实验室, 西宁 810008;
2. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008)

[摘要] 目的: 建立藏成药十味手参散中胡椒碱的含量测定方法。方法: 色谱条件 Kromasil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(77:23), 检测波长 343 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 胡椒碱在 0.448 ~ 2.24 μg 呈良好线性关系 ($r = 0.9995$), 十味手参散中胡椒碱的平均回收率为 99.43% ($n = 6$)。结论: 所建立的方法简便、快速、准确、灵敏度高、重复性好, 可有效控制藏成药十味手参散的质量。

[关键词] 十味手参散; 胡椒碱; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0122-04

Content Determination of Piperine in Shiwei Shoushen Powder by RP-HPLC

CHEN Hai-juan^{1*}, JI Lan-ju²

(1. School of Life and Geographical Science, Qinghai Normal University, Key Laboratory of Education Department of Environment and Resources on Qinghai-Tibetan Plateau, Xining 810008, China;
2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

[收稿日期] 20111116(004)

[通讯作者] * 陈海娟, 硕士, 讲师, 从事中药资源的开发和利用, Tel: 0971-6307616, E-mail: haijuanchen84@163.com

毒片中 7 种指标成分盐酸小檗碱、没食子酸、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚份的分离度均 > 1.5, 并能同时测定其含量。

3.4 检测波长的选择 该制剂中的 7 种成分的最大吸收波长相差较远, 因此采用全波长检测器进行全波长扫描, 选择能使 7 种成分都有较好吸收的波长作为检测波长, 最终确定检测波长为 310 nm。

3.5 小结 本文所建立的含量测定方法, 采用同一色谱条件对双黄祛毒片方中的 7 个主要成分同时进行测定, 操作简便, 节约成本, 能有效提高分析效率, 可在此基础上为该制剂指纹图谱的建立提供参考。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010;22,62,285.
[2] 岳淑梅, 冯玲玲, 齐潇潇, 等. 肝宁颗粒中大黄所含 5 种蒽醌苷元的 HPLC 测定[J]. 中成药, 2008, 30(8):1155.
[3] 谭志国, 雷鹏, 李新中, 等. 高效液相色谱法测定大黄不同炮制品中没食子酸的含量[J]. 中南药学, 2007, 5

(5):479.

[4] 冯有龙, 余伯阳, 董小平. 高效液相色谱法同时测定三黄片中的蒽醌类、黄酮类及生物碱类化合物[J]. 药学学报, 2006, 41(3):285.
[5] 赵英日, 罗兰, 崔红花. 考察甲醇浓度对大黄中 5 种蒽醌类化合物含量的影响[J]. 中国民族民间医药杂志, 2009, 18(13):40.
[6] 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.
[7] 李艳芳, 夏泉, 许风清, 等. HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12):15.
[8] 梁永锋. 掌叶大黄与河套大黄化学成分的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(26):12540, 12558.
[9] 陈剑平, 李一圣, 卢小凤, 等. 反相高效液相色谱法同时测定黄术健胃片中野黄芩苷、盐酸小檗碱及丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10):2157.

[责任编辑 顾雪竹]