

HPLC法同时测定小儿化毒散中3种成分的含量^Δ

曾 桢^{1*},艾光丽²,李婷婷¹,文永盛¹,周世玉^{1#}(1.成都市食品药品检验研究院,成都 610045;2.成都中医药大学药学院,成都 611130)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3405-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.27

摘要 目的:建立同时测定小儿化毒散中芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters SunFire™-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为238 nm,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果:芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵检测质量浓度线性范围分别为8.808~88.08 μg/mL($r=0.999\ 8$)、1.778~17.78 μg/mL($r=0.999\ 6$)、2.533~25.33 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为4.404、0.889、2.533 μg/mL,检测限分别为1.101、0.445、1.267 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为95.08%~99.61%(RSD=1.77%, $n=9$)、96.93%~99.94%(RSD=0.92%, $n=9$)、98.33%~102.05%(RSD=1.27%, $n=9$)。结论:该方法简单、准确、重复性好,可用于小儿化毒散中芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵含量的同时测定。

关键词 小儿化毒散;高效液相色谱法;芍药苷;盐酸小檗碱;甘草酸铵

Simultaneous Determination of 3 Components in Xiaoer Huadu Powder by HPLC

ZENG Zhen¹, AI Guangli², LI Tingting¹, WEN Yongsheng¹, ZHOU Shiyu¹(1.Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China; 2.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611130, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of paeoniflorin, berberine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate in Xiaoer huadu powder. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Waters SunFire™-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 238 nm, and column temperature was 25℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of paeoniflorin, berberine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate were 8.808-88.08 μg/mL($r=0.999\ 8$), 1.778-17.78 μg/mL($r=0.999\ 6$), 2.533-25.33 μg/mL($r=0.999\ 9$), respectively. LOQ were 4.404, 0.889, 2.533 μg/mL; LOD were 1.101, 0.445, 1.267 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 95.08%-99.61% (RSD=1.77%, $n=9$), 96.93%-99.94% (RSD=0.92%, $n=9$), 98.33%-102.05% (RSD=1.27%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for simultaneous determination of paeoniflorin, berberine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate in Xiaoer huadu powder.

KEYWORDS Xiaoer huadu powder; HPLC; Paeoniflorin; Berberine hydrochloride; Ammonium glycyrrhizinate

小儿化毒散是中医儿科经典方剂,由人工牛黄、珍珠、天花粉、雄黄、大黄、黄连、赤芍、甘草等中药材组成,

具有清热解毒、活血消肿的功效,主要用于热毒内蕴、毒邪未尽所致的口疮肿痛、疮疡溃烂、烦躁口渴、大便秘结

- 集.2007.
- [9] 营大礼.干姜的化学成分及药理研究进展[J].中国药房, 2008,19(18):1435-1436.
- [10] 李蜀眉,王丽荣,张卫东,等.干姜中黄酮类化合物的提取及抗氧化性能的研究[J].食品工业,2015,36(1):141-143.
- [11] Barbara G, Veronika M, Olaf K, et al. Putative mycobacterial efflux inhibitors from the seeds of *Aframomum melegueta*[J].*J Nat Prod*,2012,75(7):1393-1399.
- [12] Connel DW, Sutherland MD. A re-examination of gingerol, shogaol, and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)[J].*Aust J Chem*,1969,22(5):1033-1043.
- [13] 赵庆,郝小江,陈耀祖,等.滇姜花的倍半萜成分[J].云南植物研究,1995,17(2):201-203.
- [14] Masaaki O, Masanori K, Akira U. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma Longa*[J].*Phytochemistry*,1990,29(7):2201-2205.
- [15] 刘布鸣,姜惟恒.沙姜精油中沙姜脑的化学结构与光谱研究[J].分析测试学报,1993,12(4):49-52.

Δ 基金项目:国家药品标准提高暨2015年版药典科研项目;成都市食品药品监督管理局项目(No.201703)

* 主管中药师。研究方向:中药质量标准。电话:028-85362592。E-mail:zengzhen125@163.com

通信作者:主任中药师。研究方向:中药质量标准。电话:028-85362592。E-mail:zsyu9@sohu.com

(收稿日期:2017-02-22 修回日期:2017-04-11)
(编辑:张 静)

等的治疗^[1-3]。其现行质量标准收载于2015年版《中国药典》(一部)^[4],仅对黄连、甘草、天花粉、雄黄、大黄、珍珠进行了显微鉴别,对黄连、大黄、人工牛黄进行了薄层鉴别,无含量测定项。现有文献表明,该方剂中的赤芍、黄连、甘草为主要用于治疗痈肿疮疡的药味,且其主要成分分别为芍药苷^[5-6]、盐酸小檗碱^[7-8]、甘草酸铵^[9-11]。为完善该制剂的质量控制,在现有文献报道基础上^[12-13],本课题组采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定小儿化毒散中芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,配置有自动进样器、光电二极管阵列检测器、四元泵、在线真空脱气机、LC1260色谱工作站(美国Agilent公司);AE-240型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);AUX-220型万分之一电子分析天平(日本Shimadzu公司);SK250H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

小儿化毒散(A厂,批号:140707、160905、160904、160603、150401、160906,规格:6 g/袋);芍药苷对照品(批号:110736-201539,纯度:96.4%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200911,纯度:86.8%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-201619,纯度:93.0%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters SunFire™-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,20% A;5~20 min,20%→50% A;20~25 min,50% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

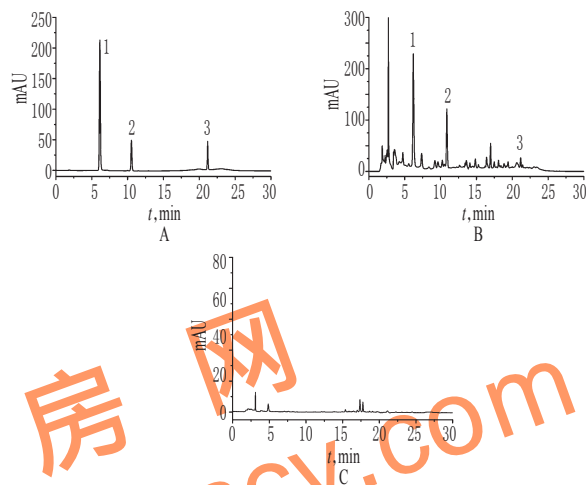
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芍药苷对照品22.842 4 mg、盐酸小檗碱对照品9.559 4 mg、甘草酸铵对照品7.295 5 mg,分别置于25、50、50 mL棕色量瓶中,加50%乙醇溶液溶解并定容,摇匀,作为单一对照品贮备液。分别精密吸取上述单一对照品贮备液各适量,置于同一10 mL棕色量瓶中,加50%乙醇溶液定容,摇匀,即得芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵质量浓度分别为88.08、17.78、25.33 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品10袋,研细,取约0.6 g,精密称定,置于150 mL锥形瓶中,精密加入50%乙醇溶液50 mL,称定质量,超声(功率:250 w,频率:53 kHz,下同)处理30 min,放冷至室温,加50%乙醇溶液补足缺失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺,制备缺赤芍、黄连、甘草的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以芍药苷峰计≥7 000,保留时间约6.25 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.芍药苷;2.盐酸小檗碱;3.甘草酸铵

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. paeoniflorin; 2. berberine hydrochloride; 3. ammonium glycyrrhizinate

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0 mL,分别置于5 mL棕色量瓶中,加50%乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列混合对照溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL
芍药苷	$y=23\ 832x+9\ 155\ 1$	0.999 8	8.808~88.08
盐酸小檗碱	$y=27\ 958x+0.54$	0.999 6	1.778~17.78
甘草酸铵	$y=13\ 151x-2\ 054\ 8$	0.999 9	2.533~25.33

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵的LOQ分别为4.404、0.889、

2.533 μg/mL; LOD分别为1.101、0.445、1.267 μg/mL。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件重复进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.09%、0.32%、0.25% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:140707)适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、16、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.69%、1.88%、1.01% (n=6), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:140707)约 0.6 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵含量的平均值分别为 8.20、3.10、1.01 mg/g, RSD 分别为 1.84%、1.58%、1.43% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的同一批样品(批号:140707)适量, 共 6 份, 每份约 0.3 g, 精密称定, 各置于 100 mL 棕色量瓶中, 分别加入低、中、高质量的芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 2。

2.10 样品含量测定

取 6 批样品各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试品溶液提取条件的选择

本试验考察了不同的提取溶剂(不同体积分数的甲醇、乙醇)、提取方法(冷浸法、回流法、超声法)、提取时间(20、30、40、60 min)对小儿化毒散中芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵提取率的影响。最终, 优选处理方法为 50% 乙醇溶液超声提取 30 min。

3.2 流动相的考察

本课题组分别以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.5% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 为 3.0)、乙腈-0.1% 磷酸溶液、甲醇-0.1% 磷酸溶液为流动相, 考察色谱情况。结果, 乙腈-0.1% 磷酸溶液作为流动相时较其他溶液基线平稳, 色谱峰分离度较好, 故最终优选乙腈-0.1% 磷酸溶液为本试验的流动相。

3.3 检测波长的考察

在预试验中, 把芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵的单一对照品贮备液在 200~400 nm 波长范围内进行扫描。

表 2 加样回收率试验结果 (n=9)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
芍药苷	0.305 8	2.507 6	1.231 3	3.679 4	95.17	96.34	1.77			
	0.307 3	2.519 9	1.231 3	3.693 2	95.29					
	0.300 9	2.467 4	1.231 3	3.660 4	96.89					
	0.300 5	2.464 1	2.462 6	4.807 6	95.16					
	0.300 7	2.465 7	2.462 6	4.918 7	99.61					
	0.300 2	2.461 6	2.462 6	4.891 6	98.67					
	0.301 3	2.470 7	3.693 9	5.987 8	95.21					
	0.302 7	2.482 1	3.693 9	5.994 3	95.08					
	0.305 4	2.504 3	3.693 9	6.048 7	95.95					
	盐酸小檗碱	0.305 8	0.948 0	0.469 3	1.402 9			96.93	97.76	0.92
		0.307 3	0.952 6	0.469 3	1.412 2			97.93		
		0.300 9	0.932 8	0.469 3	1.401 8			99.94		
0.300 5		0.931 6	0.938 5	1.852 4	98.11					
0.300 7		0.932 2	0.938 5	1.849 3	97.72					
0.300 2		0.930 6	0.938 5	1.841 2	97.03					
0.301 3		0.934 0	1.407 8	2.304 2	97.33					
0.302 7		0.938 4	1.407 8	2.310 3	97.45					
0.305 4		0.946 7	1.407 7	2.318 4	97.44					
甘草酸铵		0.305 8	0.308 9	0.152 9	0.460 1	98.89	99.77	1.27		
		0.307 3	0.310 4	0.152 9	0.461 5	98.82				
		0.300 9	0.303 9	0.152 9	0.454 7	98.63				
	0.300 5	0.303 5	0.305 8	0.610 9	100.52					
	0.300 7	0.303 7	0.305 8	0.604 4	98.33					
	0.300 2	0.303 2	0.305 8	0.611 7	100.88					
	0.301 3	0.304 3	0.458 7	0.772 4	102.05					
	0.302 7	0.305 7	0.458 7	0.766 7	100.50					
	0.305 4	0.308 5	0.458 7	0.764 1	99.33					

表 3 样品含量测定结果 (n=3, mg/g)

样品批号	芍药苷	盐酸小檗碱	甘草酸铵
140707	8.20	3.09	0.97
160905	4.94	3.90	0.95
160904	4.93	3.62	1.04
160603	4.80	4.35	1.04
150401	4.73	3.41	1.13
160906	5.56	3.92	1.05

结果显示, 芍药苷在 230 nm 波长处有最大吸收, 盐酸小檗碱在 228、265、345 nm 波长处有最大吸收, 甘草酸铵在 250 nm 波长处有最大吸收; 而在 238 nm 波长处, 3 种成分均有较大吸收, 且均能达到较好的分离效果, 综合考虑, 最终选择 238 nm 作为本试验的检测波长。

3.4 方法耐用性考察

本试验还考察了不同品牌及不同型号的色谱柱 [Agilent 1200 型 Diamond C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters 1260 型 SunFire™-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent 1200 型 Diamond C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm)]。结果, 其峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 表明本试验的耐用性良好。

综上所述, 本方法简单、准确、灵敏、重复性好、精密度高, 可用于小儿化毒散中芍药苷、盐酸小檗碱、甘草酸铵含量的同时测定。

HPLC法同时测定云连药材中6种生物碱的含量[△]

潘正^{1*},高运玲²,江生³,范刚⁴,张艺⁴,曹伟国¹(1.重庆医科大学中医药学院,重庆 400016;2.重庆邮电大学生物学院,重庆 400065;3.重庆市食品药品检验所,重庆 401121;4.成都中医药大学民族药学院,成都 611130)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3408-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.28

摘要 目的:建立同时测定云连药材中6种生物碱含量的方法。方法:色谱柱为XtimateTM C₁₈,流动相为30 mmol/L碳酸氢铵溶液(含0.1%三乙胺和0.7%氨水)-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的检测质量浓度线性范围分别为0.85~16.96 mg/L($r=0.999\ 9$)、1.25~24.96 mg/L($r=0.999\ 8$)、2.05~40.96 mg/L($r=0.999\ 9$)、3.65~72.96 mg/L($r=0.999\ 9$)、2.88~57.60 mg/L($r=0.999\ 9$)、13.25~264.96 mg/L($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为97.14%~102.14%(RSD=1.93%, $n=6$)、97.00%~102.00%(RSD=2.06%, $n=6$)、98.18%~101.82%(RSD=1.79%, $n=6$)、96.15%~101.28%(RSD=2.06%, $n=6$)、96.88%~101.88%(RSD=1.87%, $n=6$)、99.31%~103.76%(RSD=1.89%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于云连药材中6种生物碱含量的同时测定。

关键词 云连;生物碱;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of 6 Alkaloids in *Coptis teeta* by HPLC

PAN Zheng¹, GAO Yunling², JIANG Sheng³, FAN Gang⁴, ZHANG Yi⁴, CAO Weiguo¹(1.College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2.College of Biology, Chongqing University of Posts and Telecommunication, Chongqing 400065, China; 3.Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 4.College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611130, China)

参考文献

- [1] 肖飞,赵厚睿,向希雄,等.小儿化毒散临床应用探讨[J].世界中医药,2015,10(11):1806-2807.
- [2] 丁冬胜,邹敏书,晁国明.小儿化毒散治疗小儿急性化脓性扁桃体炎临床疗效观察[J].华南国防医学杂志,2015,29(1):66-67.
- [3] 赵浩堂,张漩,陈庆梅,等.小儿化毒散治疗小儿口腔溃疡78例的疗效观察[J].世界中医药,2016,11(4):653-654.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1495-1498.
- [5] Yang N, Cui H, Zhang L. *et al.* Paeoniflorin inhibits human pancreatic cancer cell apoptosis via suppression of MMP-9 and ERK signaling[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(2): 1471-1476.
- [6] 李冬梅,徐丽,张红果,等.芍药苷对脑缺血再灌注模型沙土鼠脑组织炎症反应因子的影响[J].中国药房,2015,26(1):916-917.
- [7] Choi YH. Berberine hydrochloride protects C2C12 myoblast cells against oxidative stress-induced damage via induction of nrf-2-mediated ho-1 expression[J]. *Drug Dev Res*, 2016, 77(6):56-58.
- [8] Li HL, Wu H, Wu XJ. *et al.* MAPK pathways are involved in the inhibitory effect of berberine hydrochloride on gastric cancer MGC 803 cell proliferation and IL-8 secretion in vitro and in vivo[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1430-1438.
- [9] 赵慧,吕佳,周艺璇,等.甘草酸铵对乙酰氨基酚致人肝细胞损伤的保护作用研究[J].中南药学,2017,15(3): 301-304.
- [10] 孟雅坤,王伽伯,肖小河,等.甘草酸铵联合苦参素抗大鼠肝纤维化作用及初步机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(21):110-115.
- [11] 黄继英,韩冰,张顺财,等.甘草酸铵通过抑制HMGB1的表达减轻ConA诱导的免疫性肝损伤[J].胃肠病学和肝病杂志,2012,21(3):264-267.
- [12] 孙新建,李志浩,吴进,等.RP-HPLC测定小儿化毒散中大黄素和大黄酚的含量[J].中医药导报,2010,16(10): 93-95.
- [13] 黄泽中,何利华,尹雄章,等.小儿化毒散中芍药苷含量测定[J].医药导报,2012,33(7):916-917.

[△] 基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(No.cstc2014jcyj A10004);重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ1400433);重庆市卫生计生委中医药科技项目(No.ZY201602066)

* 副教授,博士。研究方向:中药化学成分分析。电话:023-65712062。E-mail:letter2013@sina.com

(收稿日期:2017-02-28 修回日期:2017-04-28)

(编辑:刘柳)