

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00455

HPLC 测定复方大黄颗粒中盐酸小檗碱、淫羊藿苷及 5 种大黄蒽醌的含量

HPLC in determination of berberine hydrochloride, icariin and five rhubarb anthraquinones in *Fufang-dahuang granules*

郭鹏¹, 朱雪瑜², 张铁军^{2*}, 何永志³

1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193
2. 天津药物研究院中药现代研究部, 天津 300193
3. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

[摘要] **目的** 采用高效液相色谱法测定复方大黄颗粒中盐酸小檗碱、淫羊藿苷及 5 种大黄蒽醌的含量。**方法** 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流速 1.0 ml/min, 柱温 35℃, 测定盐酸小檗碱与淫羊藿苷的流动相为乙腈-0.05 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液(24:76), 检测波长为 270 nm; 测定 5 种大黄蒽醌的流动相为甲醇-0.1% H₃PO₄ 水溶液(75:25), 检测波长为 254 nm。**结果** 盐酸小檗碱、淫羊藿苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚基线分离, 线性良好($r \geq 0.9998$); 方法学考察表明, 日内及日间精密度符合相关标准, 加样回收率分别为 97.4%、97.8%、98.7%、97.1%、97.8%、99.8%、100.2%。测定了 3 批样品中盐酸小檗碱、淫羊藿苷及 5 种大黄蒽醌的含量(平均值)分别为 18.77、1.54、0.490、0.678、0.786、1.56、1.41 mg/g。**结论** 该方法简便、快速、稳定可靠, 为复方大黄颗粒的质量控制提供了依据。

[关键词] 复方大黄颗粒; 盐酸小檗碱; 淫羊藿苷; 大黄蒽醌类; 高效液相色谱法

[中图分类号] R 927.2 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0455-04

复方大黄颗粒是由大黄、黄连、淫羊藿等多味中药组成的复方中药制剂, 用于气阴两虚、瘀阻肾络型早期糖尿病肾病。现代药理学研究证实大黄中蒽醌类成分具有调节细胞因子^[1-2]、影响糖和脂代谢^[3]、抑制成纤维细胞的增殖^[4]、影响血液流变学^[5]及清除自由基^[6]等治疗糖尿病肾病的药理作用; 盐酸小檗碱是黄连总生物碱的代表性成分, 具有改善葡萄糖代谢^[7]、影响炎症因子^[8]、抗氧化、清除自由基以及醛糖还原酶抑制作用, 对糖尿病及其并发症有一定的治疗作用^[9-10]; 淫羊藿苷是淫羊藿的主要有效成分, 可抑制血中肌酐和尿素氮水平的升高, 抑制肾皮质过氧化物的产生, 减轻谷胱甘肽的耗竭, 对肾脏损伤具有保护作用^[11]。因此, 上述成分含量是评价该制剂内在质量的重要指标。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚是大黄蒽醌的 5 种代表性成分, 复方大黄制剂中大黄蒽醌的含量测定已有不少报道^[12-13], 但大多局限于大黄酸、大黄素和大黄酚 3 种成分的含量测定。李鑫楠等^[14]对熊胆降热丸中的 5 种大黄蒽醌类化合物进行含量测定, 未能较好地解决芦荟大黄素的分离问题。《中华人民共和国药典》2005 年版(一部)记载黄连药材采用薄层扫描法测定盐酸小檗碱的含量, 操作复杂, 准确性和重复性差; 淫羊藿药材采用高效液相色谱法(HPLC)测定淫羊藿苷的含量, 但分离效果不佳。文献报道测定盐酸小檗碱和淫羊藿苷的方法也较多^[15-16], 但二者同时测定未见报道。本研究采用 HPLC 测定了复方大黄颗

粒中的盐酸小檗碱、淫羊藿苷和 5 种大黄蒽醌的含量, 有利于更全面、有效地控制该制剂的质量。

1 仪器和试剂

美国戴安高效液相色谱仪(P680A 泵、ASI-100™ 自动进样器、UVD170S 四通道紫外检测器、Chromleon 色谱工作站), 超声波提取器 AS3120(奥特塞恩仪器有限公司), 分析天平(Shimadzu Libror AEL-40SM), 电子恒温水浴锅。

甲醇、乙腈为色谱纯(天津市康科德科技有限公司), 其余试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。盐酸小檗碱(批号: 110713-200208)、淫羊藿苷(批号: 10737-200312)、芦荟大黄素(批号: 110795-200605)、大黄酸(批号: 0757-200206)、大黄素(批号: 110756-200110)、大黄酚(批号: 110796-200615)、大黄素甲醚(批号: 110758-200610)均用于含量测定, 纯度 > 98%, 购自中国药品生物制品检定所。

复方大黄颗粒由天津药物研究院中药现代部研制。药材均购自河北安国药材市场, 经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定符合《中华人民共和国药典》2005 年版各药味项下规定。

2 方法和结果

2.1 HPLC 法测定盐酸小檗碱、淫羊藿苷的含量

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×

[收稿日期] 2009-12-22 **[接受日期]** 2010-01-05

[基金项目] 国家科技支撑计划(2007BAI37B08)。Supported by National Science and Technology Pillar Program(2007BAI37B08)。

[作者简介] 郭鹏, 硕士。E-mail: success07@126.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 022-23006848, E-mail: tiezheng4@sina.com

200 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液 (24 : 76), 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 270 nm, 柱温: 35℃, 进样量: 对照品 5 μl, 供试品 10 μl。

2.1.2 溶液制备 对照品储备溶液: 精密称取盐酸小檗碱、淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 分别置于 25 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得盐酸小檗碱、淫羊藿苷浓度分别为 0.180、0.132 mg/ml 的对照品储备液。对照品混合溶液: 精密量取上述盐酸小檗碱对照品储备液 8 ml、淫羊藿苷对照品储备液 1 ml, 置于同一 10 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品混合溶液 (每 1 ml 含盐酸小檗碱 144 μg, 淫羊藿苷 13.2 μg)。供试品溶液: 取复方大黄颗粒 20 g,

研细, 称取 0.2 g, 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加入适量 70% 乙醇, 超声处理 60 min, 放至室温, 加 70% 乙醇至刻度。摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液, 即得。阴性样品溶液: 按复方大黄颗粒制备工艺分别制备不含黄连及不含淫羊藿的阴性样品, 并按供试品溶液配制方法制成阴性样品溶液。

2.1.3 系统适用性试验 取对照品混合溶液、供试品溶液及阴性样品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 理论塔板数按盐酸小檗碱峰计算或淫羊藿苷峰计算均不低于 3 000。盐酸小檗碱、淫羊藿苷与相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 对称因子在 0.95~1.05 之间。供试品中其他成分对盐酸小檗碱、淫羊藿苷的测定无干扰。结果见图 1。

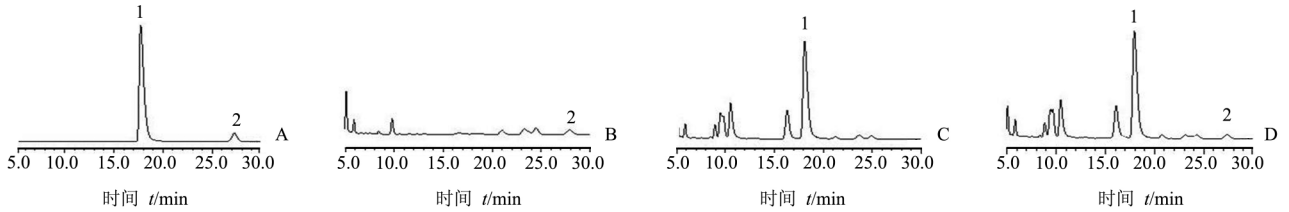


图 1 混合对照品(A)、缺黄连阴性样品(B)、缺淫羊藿阴性样品(C)及供试品(D)HPLC 图谱
1: 盐酸小檗碱; 2: 淫羊藿苷

2.1.4 线性关系考察 精密吸取 2、4、6、8、10、12 μl 对照品混合溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样分析。以峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算。盐酸小檗碱、淫羊藿苷回归方程分别为: $Y = 4\,013.3 X - 103.46, r = 0.999\,9$; $Y = 3\,554.7 X - 13.047, r = 0.999\,8$ 。结果表明盐酸小檗碱进样量在 0.2881~1.728 μg 范围内、淫羊藿苷进样量在 0.026~0.158 μg 范围内, 与峰面积具有良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取对照品混合溶液, 在 2.1.1 项色谱条件下连续进样 6 次, 连续进样 3 d, 盐酸小檗碱、淫羊藿苷色谱峰面积的日内精密度 RSD 分别为 1.79%、1.97%, 日间精密度 RSD 分别为 1.81%、2.05%, 表明方法的精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 0801), 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定。测得盐酸小檗碱、淫羊藿苷峰面积的 RSD (n=7) 分别为

1.62%、2.50%。表明供试品溶液室温放置 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批号 (0801) 样品粉末 6 份, 平行制备供试品溶液 6 份, 在 2.1.1 项色谱条件下进行分析测定。盐酸小檗碱、淫羊藿苷平均含量和 RSD (n=6) 分别为 19.0 mg/g (RSD=1.21%)、1.60 mg/g (RSD=2.53%)。表明该方法的重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 (批号 0801) 约 0.1 g, 共 9 份, 按样品中盐酸小檗碱、淫羊藿苷的 80%、100%、120% 质量浓度分别精密加入盐酸小檗碱、淫羊藿苷对照品溶液适量, 制备每一质量浓度的溶液各 3 份, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果回收率为 96.2%~100.0% (RSD<1.5%)。表明以本法同时测定盐酸小檗碱和淫羊藿苷的含量回收率结果良好。

2.1.9 样品测定 取 3 批复方大黄颗粒, 在 2.1.1 项色谱条件下进样分析, 记录色谱峰面积, 外标一点法计算含量。结果见表 1。

表 1 复方大黄颗粒中盐酸小檗碱、淫羊藿苷及 5 种大黄蒽醌的含量

(n=3, $\bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

| 批号 | 盐酸小檗碱 | 淫羊藿苷 | 芦荟大黄素 | 大黄酸 | 大黄素 | 大黄酚 | 大黄素甲醚 |
|------|----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0801 | 19.0±0.2 | 1.60±0.02 | 0.486±0.010 | 0.667±0.012 | 0.776±0.015 | 1.58±0.01 | 1.41±0.02 |
| 0802 | 18.6±0.2 | 1.54±0.02 | 0.501±0.012 | 0.696±0.012 | 0.802±0.014 | 1.61±0.01 | 1.45±0.02 |
| 0803 | 18.7±0.2 | 1.49±0.02 | 0.482±0.011 | 0.670±0.014 | 0.781±0.015 | 1.49±0.01 | 1.38±0.02 |

2.2 HPLC 法测定 5 种大黄蒽醌的含量

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1% H₃PO₄ 水溶液 (75 : 25), 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 254 nm, 柱温: 35℃, 进样量: 对照品 5 μl, 供试品 10 μl。

2.2.2 溶液制备 对照品储备溶液: 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 精密称定, 分别置于 25 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚浓度分别为 72.5、78.9、74.4、76.0、74.0 μg/ml 的对照品储备液。对照品

混合溶液:精密量取上述芦荟大黄素对照品储备液 1.5 ml,大黄酸、大黄素、大黄酚对照品储备液 2 ml,大黄素甲醚对照品储备液 2.5 ml,置于同一 10 ml 量瓶中,摇匀,即得对照品混合溶液(每 1 ml 含芦荟大黄素 10.9 μg ,大黄酸 15.8 μg ,大黄素 14.9 μg ,大黄酚 15.2 μg ,大黄素甲醚 18.5 μg)。供试品溶液:取复方大黄颗粒 20 g,研细,称取 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 25 ml 甲醇,称定质量,加热回流 1 h,放至室温,再称定,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 ml,置烧瓶中,蒸干溶剂,加 8% 盐酸溶液 10 ml,超声处理 2 min,加三氯甲烷 10 ml,加热回流 1 h,放冷,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸

液再用三氯甲烷提取 3 次,每次 10 ml,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至 10 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。阴性样品溶液:按复方大黄颗粒制备工艺分别制备不含大黄的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。

2.2.3 系统适用性试验 取对照品混合溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,在 2.2.1 项色谱条件下进样分析。理论塔板数按 5 种大黄蒽醌峰分别计算均不低于 3 000。5 种大黄蒽醌色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5,对称因子在 0.95~1.05 之间。供试品中其他成分对 5 种大黄蒽醌的测定无干扰。结果见图 2。

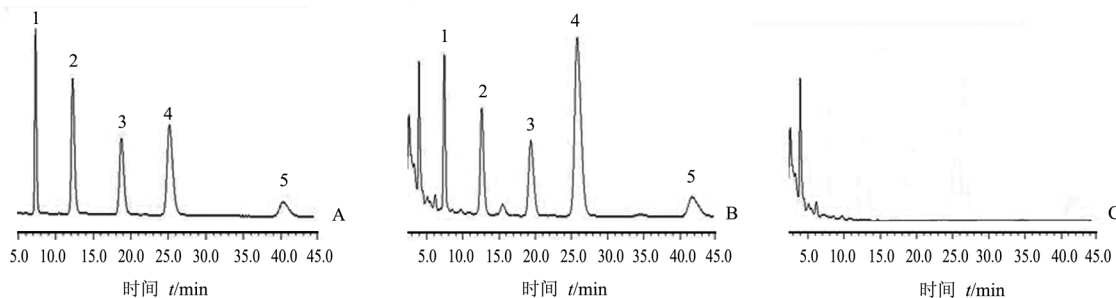


图2 混合对照品(A)、供试品(B)、缺大黄阴性样品(C)HPLC图谱

1:芦荟大黄素;2:大黄酸;3:大黄素;4:大黄酚;5:大黄素甲醚

2.2.4 线性关系考察 精密吸取 2、4、6、8、10、12 μl 对照品混合溶液,按 2.2.1 项色谱条件进样分析。以峰面积 Y 为纵坐标,进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,绘制标准曲线并进行回归计算。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚回归方程分别为: $Y=12\ 282X-14.884, r=0.999\ 9$; $Y=11\ 067X-33.327, r=0.999\ 9$; $Y=9\ 196.3\ X-24.302, r=0.999\ 9$; $Y=13\ 633X-23.758, r=0.999\ 9$; $Y=2\ 529.5X-6.850\ 4, r=0.999\ 9$ 。结果表明芦荟大黄素进样量在 0.022~0.131 μg 范围内、大黄酸进样量在 0.032~0.190 μg 范围内、大黄素进样量在 0.030~0.179 μg 范围内、大黄酚进样量在 0.030~0.182 μg 范围内、大黄素甲醚进样量在 0.037~0.222 μg 范围内,与峰面积具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取对照品混合溶液,在 2.2.1 项色谱条件下连续进样 6 次,连续进样 3 d,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚色谱峰面积的日内精密度 RSD 均 < 2.0%,日间精密度 RSD 均 < 2.0%,表明该方法的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 0801),室温放置,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 按 2.2.1 项色谱条件测定。测得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD($n=7$)分别为 0.61%、0.83%、1.37%、0.59%、1.82%。表明供试品溶液室温放置 12 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批号(0801)样品粉末 6 份,平行制备供试品溶液 6 份,在 2.2.1 项色谱条件下进行分析测定。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均含量($n=6$)和 RSD 分别为 0.486 mg/g(RSD=0.58%)、0.667 mg/g(RSD=0.88%)、0.778 mg/g(RSD=1.23%)、1.58 mg/g(RSD=0.63%)、1.41 mg/g(RSD=1.89%),表明该方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号 0801)约 0.1 g,共 9 份,按样品中 5 种大黄蒽醌的 80%、100%、120% 质量浓度分别精密加入 5 种大黄蒽醌对照品溶液适量,制备每一质量浓度的溶液各 3 份,按 2.2.1 项色谱条件测定,结果回收率为 96.5%~101.3%(RSD<2%)。表明以本法同时测定 5 种大黄蒽醌的含量回收率结果良好。

2.2.9 样品测定 取 3 批复方大黄颗粒,制备供试品溶液,在 2.2.1 项色谱条件下进样分析,记录色谱峰面积,外标一点法计算含量。结果见表 1。

3 讨论

参照《中华人民共和国药典》2005 年版(一部)大黄的含量测定方法及文献报道方法^[17-18],选择甲醇-0.1% H_3PO_4 (85:15) 为流动相,结果分离效果不甚理想,采用本研究中的色谱条件得到良好分离,且简便可行、重复性好。本研究确定的高效液相色谱法同时测定盐酸小檗碱与淫羊藿苷的含量,缩短了检验周期,为及时、准确的控制产品的质量提供了保障。

中药制剂的药效涉及多个成分,单一指标不足以代表处方的整体作用。本研究建立的含量测定方法简便、灵敏、准确且专属性较强,可有效控制复方大黄颗粒生产、使用过程中产品的质量,对于中药复方新药研究及质量控制具有一定的意义。

[参考文献]

- [1] 郭啸华,刘志红,戴春笋,李恒,刘栋,黎磊石. 大黄酸抑制 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞肥大及细胞外基质产生[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2001,10:101-105.

- [2] 王 谦,耿益民,魏 民,黄启福,朱陵群,贾 旭. 几种中药有效成分对大鼠系膜细胞 IL-6 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2001,17:23-24.
- [3] 黄燕飞,刘志红,陈惠萍,周 虹,王建平,朱茂艳,等. 大黄酸和罗格列酮对 db/db 糖尿病小鼠代谢紊乱和肾脏损伤的作用比较[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2004,13:215-221.
- [4] 宁英远,王俭勤,屈遂林. 大黄素对人肾成纤维细胞增殖的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2000,20:105-106.
- [5] 黄翠玲,李 才. 大黄对糖尿病大鼠肾皮质和尿前列腺素及血栓素水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10:23-25.
- [6] 陈季武,胡天喜. 大黄清除活性氧的作用[J]. 中国药学杂志,1996,31:461-463.
- [7] 周丽斌,杨 颖,唐金凤,李凤英,李荣英,陈名道. 小檗碱对脂肪细胞糖代谢的影响[J]. 上海第二医科大学学报,2002,22:412-414.
- [8] 郝 钰,邱全瑛,吴 珺,王娟娟. 小檗碱对 IL-1 或 TNF 诱导的多形核白细胞与内皮细胞粘附的影响[J]. 中国病理生理杂志,2000,16:585-587.
- [9] 华卫国,宋菊敏,廖 菡,李永方,莫启忠. 黄连素对糖尿病性神经病变大鼠神经传导速度的影响及激素的调节[J]. 标记免疫分析与临床,2001,8:212-214.
- [10] 刘长山,董砚虎,逢力男,沈守祥,朱禧星. 中药黄芩甙与黄连素对糖尿病鼠醛糖还原酶活性作用的观察[J]. 中国糖尿病杂志,1996,4:163-166.
- [11] 吴东方,马俊玲,周 健,罗顺德. 淫羊藿提取液对庆大霉素急性肾损伤的影响[J]. 中国医院药学杂志,2002,22:270-271.
- [12] 谢亮亮,王英锋,刘锁兰,刘海洋. HPLC 法测定六味安消片中大黄素和大黄酚的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27:1096-1099.
- [13] 白丽杰,王春梅,刘君富. 肝胃气痛片中大黄素和大黄酚含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志,2006,26:689-691.
- [14] 李鑫楠,黄毅岚,张 丹,李 婧,余 进. RP-HPLC 测定熊胆降热丸中的 5 种大黄蒽醌类化合物[J]. 华西药学杂志,2007,22:697-698.
- [15] 刘存军. RP-HPLC 测定连蒲双清片中盐酸小檗碱的含量[J]. 中成药,2007,29:1864-1865.
- [16] 张 红,陈静萍,陈 军. RP-HPLC 法测定前列回春胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27:1959-1961.
- [17] 范艳冰,丁群彬. HPLC 法测定益视颗粒中大黄素的含量[J]. 中药新药与临床药理,2009,20:158-160.
- [18] 韩桂茹,赵志军,许红辉,赵韶华,李晓燕. 多种药材与制剂中大黄酚与总大黄素含量测定改进方法[J]. 药物分析杂志,2008,28:461-465.

[本文编辑] 尹 茶