

HPLC法同时测定镇惊泻火颗粒中4种成分的含量^Δ

许丽雯*,奚之骏(上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

中图分类号 R283.6;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3687-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.14

摘要 目的:建立同时测定镇惊泻火颗粒中芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Capcell Pak C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为20 ℃。结果:芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚的质量浓度分别在10.180~101.800、2.016~20.160、1.072~10.720、1.024~10.240 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*分别为0.999 8、0.999 6、0.999 5、0.999 6);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.4%(*n*均为6);平均加样回收率分别为98.05%、97.39%、97.91%和98.93%,RSD分别为1.3%、1.5%、1.2%和1.4%(*n*均为6)。结论:该方法准确、稳定、重复性好,可用于镇惊泻火颗粒的质量控制。

关键词 芒果苷;芦荟大黄素;大黄素;大黄酚;镇惊泻火颗粒;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of 4 Components in Zhenjing Xiehuo Granules by HPLC

XU Li-wen, XI Zhi-jun (Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of mangiferin, aloe-emodin, emodin, chrysophanol in Zhenjing xiehuo granule. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Capcell Pak C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm. The column temperature was 20 ℃. RESULTS: The linear ranges were 10.180-101.800 μg/ml for mangiferin (*r*=0.999 8), 2.016-20.160 μg/ml for aloe-emodin (*r*=0.999 6), 1.072-10.720 μg/ml for emodin (*r*=0.999 5) and 1.024-10.240 μg/ml for chrysophanol (*r*=0.999 6), respectively. RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.4% (*n*=6). The average recoveries were 98.05% (RSD=1.3%, *n*=6), 97.39% (RSD=1.3%, *n*=6), 97.91% (RSD=1.4%, *n*=6) and 98.93% (RSD=1.5%, *n*=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, reproducible and specific, and is suitable for quality control of Zhenjing xiehuo granules.

KEYWORDS Mangiferin; Aloe-emodin; Emodin; Chrysophanol; Zhenjing xiehuo granule; HPLC

镇惊泻火颗粒为上海中医药大学附属龙华医院研制开发的中药复方制剂,由甘草、淮小麦、大枣、知母、大黄等药味组成,临床用于治疗抑郁症、广泛性焦虑和精神障碍等多种精

神、情志疾病^[1-3]。为更全面地控制产品质量,本试验采用高效液相色谱(HPLC)法测定了方中芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚的含量。

胃木犀草素-7-*O*-β-葡糖苷后,在其血浆样品中检测不到木犀草素苷,而只检测到其苷元木犀草素。因此,为准确测量早莲草中木犀草素和芹菜素的质量分数,笔者考察了盐酸质量浓度、水解时间、温度对样品中所含黄酮苷元质量分数的影响。结果表明,未经水解处理,游离木犀草素和芹菜素很少,经水解后木犀草素和芹菜素的质量分数大大增加。最后经正交试验法确定水解条件为:在2.5 ml提取物稀释液中加入5 μl浓盐酸,于70 ℃水浴下水解2 h。

综上所述,本方法快速、简便,结果准确、可靠、简单、快速,可用于不同产地早莲草药材的质量评价。

参考文献

- [1] 营大礼. 墨旱莲化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(36): 2 876.
- [2] 张梅, 邸晓辉, 刘梅. 早莲草中黄酮类成分的免疫调节作

用[J]. 中草药, 1997, 28(10): 615.

- [3] 林朝朋, 芮汉明, 许晓春. 墨旱莲黄酮类提取物抗自由基作用及体内抗氧化功能的研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(4): 344..
- [4] 屈凌波, 王玲, 杨冉, 等. 木犀草素、芹菜素与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 药学学报, 2006, 41(4): 352.
- [5] 孙斌, 瞿伟菁, 张晓玲. 芹菜素的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(7): 68.
- [6] 刘翔, 曹云飞, 窦金凤. 不同产地墨旱莲中木犀草素含量测定[J]. 药物鉴定, 2007, 16(23): 12.
- [7] 杨海英, 王雪梅, 杜刚, 等. 高效液相色谱法测定早莲草中木犀草素和芹菜素的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2 994.
- [8] 袁继承, 蒋永和, 沈志滨. 早莲草化学成分的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(01): 125.
- [9] Shimoi K, Saka N, Nozawa R, et al. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(12): 1 521.

(收稿日期:2014-03-20 修回日期:2014-08-10)

^Δ 基金项目:上海市卫生局中药新药及院内制剂研发项目(No.2010Y013A)

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:021-64385700-7303。E-mail:lhyyxlw@163.com

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1311B型四元泵、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1314F型可变波长检测器(美国Agilent公司);DL-120D型智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);AG135型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

镇惊泻火颗粒(龙华医院院内制剂,批号:20120615、20120712、20120726);芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111607-200402、110795-201007、110756-200110、110796-201118);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Capcell Pak C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);预柱:Phenomenex C₁₈(4.0 mm×3.0 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~30 min, 10%→27% A; >30~40 min, 27%→55% A; >40~60 min, 55%→90% A);检测波长:254 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:20 °C;进样量:10 μl。

2.2 混合对照品贮备液的制备

取经五氧化二磷干燥48 h后的芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚对照品各适量,精密称定,用甲醇配制成质量浓度分别为101.8、20.16、10.72、10.24 μg/ml,即得混合对照品贮备液。

2.3 供试品溶液的制备

取镇惊泻火颗粒约1 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(功率:120 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,续滤液经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按处方量分别制备缺知母和大黄的阴性样品,按“2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 系统适用性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照样品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明,芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚与样品中其他组分色谱峰可达基线分离,分离度>1.5;所测成分理论板数均不低于10 000;阴性样品无干扰。色谱见图1。

2.6 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品贮备液1.00、2.50、5.00、7.50 ml,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得不同质量浓度的混合对照品溶液。取混合对照品溶液和“2.2”项下混合对照品贮备液各适量,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以混合对照品溶液的质量浓度(x , μg/ml)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程,结果见表1。

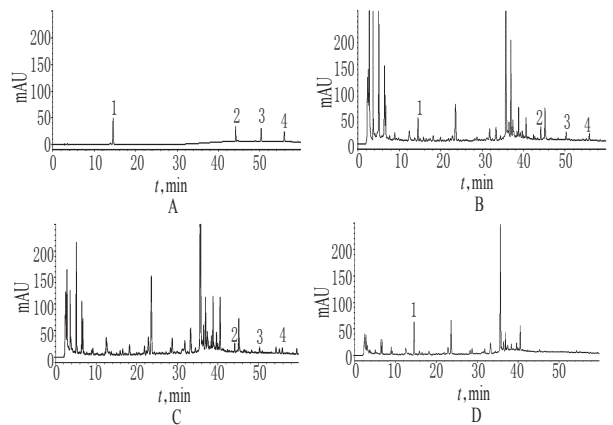


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.知母阴性对照;D.大黄阴性对照样;1.芒果苷;2.芦荟大黄素;3.大黄素;4.大黄酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B.test sample; C.Anemarrhena asphodeloides negative control; D.Rheum palmatum negative control; 1.mangiferin; 2. aloe-emodin; 3. emodin; 4. chrysophanol

表1 线性关系考察结果($n=4$)

Tab 1 Linearing relationship($n=4$)

成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
芒果苷	$y=9.682x-1.959$	10.180~101.800	0.999 8
芦荟大黄素	$y=19.74x-1.407$	2.016~20.160	0.999 6
大黄素	$y=41.47x-4.863$	1.072~10.720	0.999 5
大黄酚	$y=37.61x-2.749$	1.024~10.240	0.999 6

2.7 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液10 μl,按上述色谱条件连续进样6次,测定峰面积。结果,芒果苷、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚的RSD分别为0.71%、0.65%、0.73%、0.89%(n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

取“2.3”项下的同一批(批号:20120615)供试品溶液适量,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,芒果苷、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚的平均含量分别为1.117 0、0.215 3、0.084 6、0.082 7 mg/g, RSD分别为1.30%、0.97%、1.10%、1.40%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取“2.3”项下的同一批(批号:20120615)供试品溶液适量,室温下放置,按上述色谱条件分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,芒果苷、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚的平均含量分别为1.109 0、0.214 1、0.083 9、0.083 3 mg/g, RSD分别为0.78%、0.92%、0.89%、1.10%(n 均为6),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.10 加样回收率试验

取已知质量分数的同一批(批号:20120615)样品6份,每份约0.5 g,精密称定,分别加入一定量的混合对照品溶液(芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚的质量浓度分别为0.564 5、0.115 7、0.048 7、0.043 4 mg/ml),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

成分	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
芒果苷	0.498 7	0.557 0	0.564 5	1.114 6	98.78	98.05	1.3
	0.502 3	0.561 1	0.564 5	1.120 6	99.11		
	0.513 4	0.573 5	0.564 5	1.115 3	95.98		
	0.507 1	0.566 4	0.564 5	1.114 2	97.04		
	0.497 2	0.555 4	0.564 5	1.109 3	98.12		
芦荟大黄素	0.511 7	0.571 6	0.564 5	1.132 0	99.27	97.39	1.5
	0.498 7	0.107 4	0.115 7	0.218 7	96.20		
	0.502 3	0.108 1	0.115 7	0.221 2	97.75		
	0.513 4	0.110 5	0.115 7	0.221 0	95.51		
	0.507 1	0.109 2	0.115 7	0.221 2	96.8		
大黄素	0.497 2	0.107 0	0.115 7	0.221 7	99.14	97.91	1.2
	0.511 7	0.110 2	0.115 7	0.224 7	98.96		
	0.498 7	0.042 2	0.048 7	0.090 6	99.53		
	0.502 3	0.042 5	0.048 7	0.090 4	98.36		
	0.513 4	0.043 4	0.048 7	0.090 3	96.26		
大黄酚	0.507 1	0.042 9	0.048 7	0.090 4	97.53	98.93	1.4
	0.497 2	0.042 0	0.048 7	0.090 1	98.77		
	0.511 7	0.043 3	0.048 7	0.090 5	97.02		
	0.498 7	0.041 2	0.043 4	0.085 2	101.31		
	0.502 3	0.041 5	0.043 4	0.084 5	99.17		
大黄酚	0.513 4	0.042 4	0.043 4	0.085 1	98.39	98.93	1.4
	0.507 1	0.041 9	0.043 4	0.084 0	96.93		
	0.497 2	0.041 1	0.043 4	0.084 1	99.19		
	0.511 7	0.042 3	0.043 4	0.085 0	98.57		

2.11 样品含量测定

取3个批次的镇惊泻火颗粒各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液适量,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,按双点校正法计算各成分含量,样品含量测定结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 3 Results of content determination of samples(mg/g, n=3)

批号	芒果苷	芦荟大黄素	大黄素	大黄酚
20120615	1.117 0	0.215 3	0.084 6	0.082 7
20120712	1.086 0	0.201 5	0.086 5	0.082 5
20120726	1.129 0	0.221 4	0.088 7	0.083 1

3 讨论

3.1 流动相的选择

文献中芒果苷的分离多用乙腈-0.2%冰醋酸溶液、乙腈-0.5%磷酸水溶液、乙腈-33 mmol/L磷酸二氢钾溶液、甲醇-0.4%冰醋酸水溶液等流动相体系^[4-7];分离大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚多用甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液体系^[8-10]。本试验参考上述条件进行分离,结果均不理想;后采用乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相并作梯度洗脱,各成分的峰形和

柱效有明显改善,所测成分得到了良好的分离。

3.2 提取溶剂的选择

在预试验中,分别采用60%、80%、100%甲醇作为提取溶剂,比较各成分的提取率,结果显示,100%甲醇的提取率较高,故选择其为提取溶剂。

3.3 检测波长的选择

芒果苷、芦荟大黄素、大黄素和大黄酚在254 nm波长处均有较大吸收,可保证定量的准确性,故选择254 nm为检测波长。

综上所述,本方法准确、稳定、重复性好,可用于镇惊泻火颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 李俊.镇惊泻火合剂治疗失眠症临床观察[J].上海中医药杂志,2007,41(11):33.
- [2] 庞武耀,李明亚,李娟好.甘麦大枣合百合地黄汤加减抗抑郁作用研究[J].广东药学院学报,2008,24(6):587.
- [3] 叶青,袁灿兴.镇惊泻火合剂治疗广泛焦虑症临床研究[J].上海中医药杂志,2012,46(6):69.
- [4] 孟建升,蒋俊春.HPLC测定孕妇清火丸中芒果苷[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):146.
- [5] 杨晓娟,邹萍萍,周观燊,等.HPLC法测定白木香叶和远志地上部分芒果苷的含量[J].药物分析杂志,2012,32(7):1 175.
- [6] 何梅凤,吴伟,唐细兰,等.HPLC法同时测定知柏八味口服液中芒果苷、盐酸小檗碱和丹皮酚[J].中成药,2012,34(9):1 700.
- [7] 钟可,王文全,靳风云,等.UPLC法同时测定不同产地知母药材中新芒果苷和芒果苷的含量[J].中国药房,2013,24(15):1 386.
- [8] 何素琴,欧阳吉德,肖琳.HPLC法测定胆石通胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量[J].西北药学杂志,2011,26(3):180.
- [9] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等.HPLC法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2010,30(10):1 841.
- [10] 薛小平,鹿燕敏,王倩,等.HPLC法测定清热解毒方芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7):6.

(收稿日期:2013-10-30 修回日期:2014-06-04)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅