

[质 量]

RP-HPLC 法同时测定白头翁汤中 8 种成分

何燕飞¹, 闫先超¹, 康佑汐¹, 韩春杨¹, 顾金刚^{2*}, 刘翠艳^{1*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230000; 2. 农业部农业微生物资源收集与保护重点实验室, 北京 100081)

摘要: **目的** 建立 RP-HPLC 法同时测定白头翁汤 (白头翁、黄连、黄柏、秦皮) 中 8 种成分的含有量。**方法** 白头翁汤水提液的分析采用 Agilent ZOBAX XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以 0.1% 磷酸 (pH = 3.7) - 乙腈为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.7 mL/min; 检测波长 315 nm (秦皮甲素、秦皮乙素)、284 nm (黄柏碱)、345 nm (表小檗碱、盐酸小檗碱、巴马汀、黄连碱)、210 nm (白头翁皂苷 B₄)。**结果** 秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱、白头翁皂苷 B₄ 分别在 0.5 ~ 160、64 ~ 640、0.75 ~ 150、0.5 ~ 100、1.35 ~ 550、0.12 ~ 140、0.7 ~ 140、0.5 ~ 170 ng/mL 范围内线性关系良好, 平均回收率均大于 96%, RSD 均在 2.5% 以下。**结论** 该方法准确灵敏, 可用于白头翁汤的质量控制。

关键词: 白头翁汤; 化学成分; RP-HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1943-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.014

Simultaneous determination of eight constituents in Baitouweng Decoction by RP-HPLC

HE Yan-fei¹, YAN Xian-chao¹, KANG You-xi¹, HAN Chun-yang¹, GU Jin-gang^{2*}, LIU Cui-yan^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Microbial Resources Collection and Preservation, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: AIM To establish an RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography) method for the simultaneous determination of eight constituents in Baitouweng Decoction (*Pulsatillae Radix*, *Coptidis Rhizoma*, *Phellodendri Chinensis Cortex* and *Fraxini Cortex*). **METHODS** The analysis of aqueous extract of Baitouweng Decoction was carried out on an Agilent ZOBAX XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), with the mobile phase comprising of 0.1% phosphoric acid (pH = 3.7) - acetonitrile flowed at 0.7 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 315 nm for aesculin and aesculetin, 284 nm for phellodendrine, 345 nm for epiberberine, berberine hydrochloride, palmatine and coptisine, and 210 nm for anemoside B₄. **RESULTS** Aesculin, phellodendrine, aesculetin, epiberberine, palmatine, coptisine, berberine hydrochloride and anemoside B₄ showed good linear relationships within the ranges of 0.5 - 160 ng/mL, 64 - 640 ng/mL, 0.75 - 150 ng/mL, 0.5 - 100 ng/mL, 1.35 - 550 ng/mL, 0.12 - 140 ng/mL, 0.7 - 140 ng/mL and 0.5 - 170 ng/mL, respectively. All of the average recoveries were over 96% with the RSDs of less than 2.5%. **CONCLUSION** This accurate and sensitive method can be used for the quality control of Baitouweng Decoction.

KEY WORDS: Baitouweng Decoction; chemical constituents; RP-HPLC

收稿日期: 2016-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172358); 安徽农业大学第十三批大学生科技创新基金项目 (XJ2014143)

作者简介: 何燕飞 (1989—), 男, 硕士, 研究方向为中药药理学。Tel: (0551) 6576328, E-mail: 1092823640@qq.com

* 通信作者: 顾金刚 (1973—), 男, 硕士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为农业微生物资源与利用。Tel: (010) 82108651, E-mail: jgg@caas.ac.cn

刘翠艳 (1970—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理与临床应用。Tel: (0551) 6576328, E-mail: cyliu@ahau.edu.cn

白头翁汤是中医临床常用的经典方剂,由白头翁、黄连、黄柏、秦皮组成,对多种原因引起的热毒血痢有较好疗效^[1-3]。由于中药复方成分复杂,故制定科学合理的相关质量标准难度较大^[4],目前大多以所含主要指标成分的含有量为依据,指标成分设定的越多,对制剂质量的评价就越准确客观,反之则科学性就越差^[5]。文献[6-8]以白头翁汤中个别指标成分为标准,或者通过TLC法进行定性,但定性鉴别只能解决各组成药材的“真伪”问题,对个别指标成分含有量的测定也不能全面评价该制剂的质量。本研究建立RP-HPLC法同时测定白头翁汤中8种指标成分(秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱和白头翁皂苷B₄)的含有量,旨在为该制剂质量标准的制定提供更科学的实验依据。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂 盐酸小檗碱(201212)、黄连碱(201112)、巴马汀(201510)、表小檗碱(201007)、秦皮甲素(201204)、秦皮乙素(201107)和白头翁皂苷B₄(201101)对照品均购自中国食品药品检定研究院。白头翁、黄柏、黄连、秦皮均购自合肥乐家老铺中药饮片有限公司,经安徽科技学院食品药品学院时维静教授鉴定为正品。甲醇、乙腈为色谱纯(美国J. T. Baker公司);磷酸二氢钾、十二烷基磺酸钠为色谱纯(美国ACS恩科化学公司);磷酸为色谱纯(美国Fisher公司)。

1.2 仪器 Agilent 1100液相色谱仪(配置G1379A型自动脱气机、G1311A型四元泵、G1313A型自动进样器、G1316型柱温箱、G1312A型可变波长紫外检测器和色谱工作站)、ZOBAX色谱柱(美国安捷伦公司);BSA224S分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);Genpure UV-WC实验室超纯水系统(美国Thermo公司);XH-D涡旋振荡器(无锡沃信仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 标准溶液配制 精密称取盐酸小檗碱1.4 mg、表小檗碱1.0 mg、巴马汀1.1 mg、黄连碱1.4 mg、黄柏碱1.7 mg、秦皮甲素1.3 mg、秦皮乙素1.5 mg、白头翁皂苷B₄1.0 mg,置于10 mL量瓶中,甲醇定容,即得。

2.2 供试品溶液制备 按药典组方及比例称取白头翁、黄柏、黄连和秦皮适量,去离子水常规水提,定容至100 mL,得白头翁汤水提液供试样品,

同法制备3批。从中吸取1 mL,置于10 mL量瓶中,乙腈定容,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3 阴性溶液制备 按组方比例,制备缺白头翁、秦皮、黄连、黄柏的阴性样品。从中吸取1 mL,置于10 mL量瓶中,乙腈定容,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.4 流动相确定 采用多波长梯度洗脱方式进行测定。考察了乙腈-磷酸、甲醇-磷酸流动相系统,将流动相B(乙腈)和流动相D(0.1%磷酸,pH=3.7)以不同比例梯度洗脱,得到分离度较好、时间较短的洗脱程序;体积流量0.7 mL/min;进样量10 μL;柱温30℃。

2.5 检测波长确定 根据《中国药典》^[9],各成分的最大吸收波长约为300 nm左右。故本研究选择300 nm波长,然后单独进样以逐个考察该成分出峰时间,最后确定波长变化程序。

2.6 液相色谱条件确定 梯度洗脱(0~10 min,5%~6%乙腈;10~15 min,6%~25%乙腈;15~45 min,25%~35%乙腈),检测波长315 nm(0~18.5 min)、284 nm(18.5~20 min)、315 nm(20~25 min)、345 nm(25~40 min)、210 nm(40~60 min);体积流量0.7 mL/min;柱温30℃;进样量10 μL。

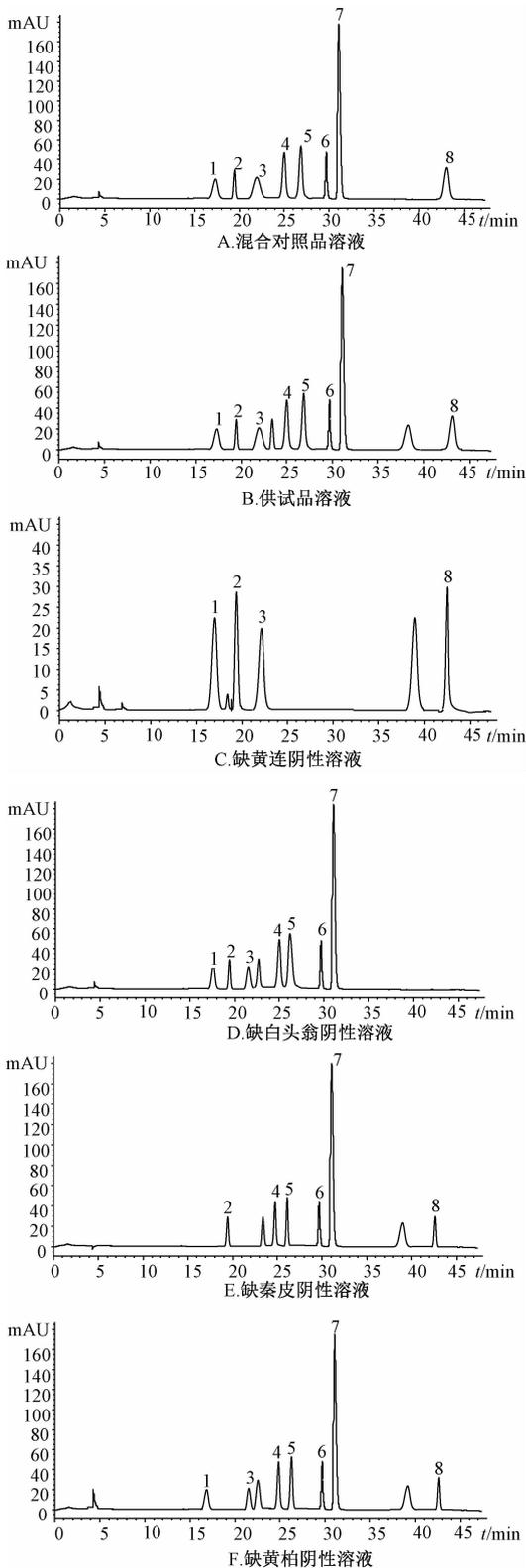
2.7 HPLC检测 HPLC色谱图见图1。由图可知,各成分保留时间分别为秦皮甲素17.05 min、黄柏碱19.25 min、秦皮乙素21.52 min、表小檗碱25.35 min、巴马汀26.31 min、黄连碱29.74 min、盐酸小檗碱31.35 min、白头翁皂苷B₄42.83 min,分离度良好,阴性无干扰。

2.8 系统性试验

2.8.1 线性关系考察 取标准品溶液母液各50 μL,置于1.5 mL离心管中,氮吹仪挥干,定容至1 mL,倍比稀释后分别得到5个梯度的混合标准品溶液,在“2.2”项色谱条件下测定。以质量浓度为纵坐标(Y),峰面积为横坐标(X)进行线性回归,得到各标准物质的标准曲线,结果见表1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.8.2 精密度试验

2.8.2.1 日内精密度 于制备后第0、2、4、6、8、12 h精密吸取高、中、低3个质量浓度的混合对照品溶液,在上述色谱条件下测定。结果,秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱、白头翁皂苷B₄峰面积RSD分别为0.28%~0.41%、0.38%~0.42%、0.41%~0.69%、



1. 秦皮乙素 2. 黄柏碱 3. 秦皮甲素 4. 表小檗碱 5. 黄连碱 6. 巴马汀 7. 盐酸小檗碱 8. 白头翁皂苷 B₄
1. esuletine 2. phellodendrine 3. aesculin 4. epiberberine 5. coptisine 6. palmatine 7. berberine 8. anemосide B₄

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 8种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of eight constituents

成分	标准曲线	R ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
表小檗碱	$Y = 178.99X + 2.6353$	0.9992	0.5 ~ 100
黄连碱	$Y = 508.97X + 3.9844$	0.9990	0.12 ~ 140
巴马汀	$Y = 368.91X - 5.9279$	0.9950	1.35 ~ 550
盐酸小檗碱	$Y = 332.46X - 0.2947$	0.9997	0.7 ~ 140
黄柏碱	$Y = 1.171X + 13.87$	0.9992	64 ~ 640
秦皮甲素	$Y = 385.55X + 1.4869$	0.9951	0.5 ~ 160
秦皮乙素	$Y = 198.97X + 0.8334$	0.9991	0.75 ~ 150
白头翁皂苷 B ₄	$Y = 326.27X + 7.5585$	0.9991	0.5 ~ 170

0.19% ~ 0.42%、0.11% ~ 0.53%、0.28% ~ 0.41%、0.11% ~ 0.74%、0.29% ~ 0.34%，表明仪器精密度高。

2.8.2.2 日间精密性 于制备后第1、2、3、4、5天精密吸取高、中、低3个质量浓度的混合对照品溶液，在上述色谱条件下测定。结果，秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱、白头翁皂苷 B₄ 峰面积 RSD 分别为 0.46% ~ 0.73%、0.51% ~ 0.72%、0.20% ~ 0.61%、0.45% ~ 1.18%、0.42% ~ 1.03%、0.61% ~ 1.61%、0.28% ~ 1.17%、0.43% ~ 0.51%，表明仪器精密度高。

2.8.3 重复性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液5份，在上述色谱条件下进样，测得秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱、白头翁皂苷 B₄ 峰面积 RSD 分别为 2.12%、2.41%、2.09%、1.94%、2.17%、2.47%、1.82%、1.47%，表明该方法重复性良好。

2.8.4 稳定性试验 取同一供试品溶液，每隔4h在上述色谱条件下测定，共6次，测得秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱和白头翁皂苷 B₄ 峰面积 RSD 分别为 0.37%、0.52%、0.63%、0.39%、0.46%、0.32%、1.24%、1.08%，表明供试品溶液在24h内稳定性良好。

2.8.5 加样回收率试验 取各成分含有量已知的供试品6份，每份1mL，精密加入盐酸小檗碱(17.5 μg)、黄连碱(17.5 μg)、巴马汀(27.5 μg)、表小檗碱(25 μg)、秦皮甲素(32.5 μg)、秦皮乙素(37.5 μg)、黄柏碱(42.5 μg)、白头翁皂苷 B₄(25.0 μg)对照品溶液，定容，在上述色谱条件下测定，计算回收率，结果见表2。

2.9 含有量测定 将供试品溶液于第1、3、5天进样测定。结果见表3，均符合药典要求(表小檗

表2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)

成分	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收率/%
	ng	ng	ng	%	(RSD/%)
表小檗碱	50	25.0	74.3	97.2	98.5
	50	25.0	74.8	99.2	(2.3)
	50	25.0	75.3	101.2	
	50	25.0	73.8	95.2	
	50	25.0	74.1	96.4	
	50	25.0	75.5	102.0	
黄连碱	35	17.5	52.4	99.4	98.0
	35	17.5	51.8	96.0	(2.04)
	35	17.5	52.3	98.9	
	35	17.5	51.5	94.3	
	35	17.5	52.8	101.7	
	35	17.5	52.1	97.7	
巴马汀	55	27.5	81.1	94.9	96.2
	55	27.5	81.6	96.7	(1.51)
	55	27.5	82.1	98.5	
	55	27.5	81.9	97.8	
	55	27.5	80.8	93.8	
	55	27.5	81.3	96.7	
盐酸小檗碱	35	17.5	51.9	96.5	97.1
	35	17.5	52.1	97.7	(0.98)
	35	17.5	51.7	95.4	
	35	17.5	52.1	97.7	
	35	17.5	51.9	96.6	
	35	17.5	52.3	98.8	
黄柏碱	85.0	42.5	125.6	95.5	96.0
	85	42.5	126.1	96.7	(0.61)
	85	42.5	125.9	96.2	
	85	42.5	125.7	95.8	
	85	42.5	126.2	96.9	
	85	42.5	125.4	95.1	
秦皮甲素	65	32.5	96.1	95.7	96.1
	65	32.5	96.3	96.3	(1.1)
	65	32.5	97.2	99.1	
	65	32.5	95.9	95.1	
	65	32.5	95.8	94.8	
	65	32.5	96.1	95.7	
秦皮乙素	60	37.5	97.1	98.9	97.0
	60	37.5	95.4	94.4	(1.9)
	60	37.5	95.9	95.7	
	60	37.5	96.9	98.4	
	60	37.5	97.2	99.2	
	60	37.5	95.8	95.5	
白头翁皂苷 B ₄	50	25.0	74.1	96.6	97.5
	50	25.0	73.8	95.2	(2.5)
	50	25.0	76.1	104.3	
	50	25.0	74.5	98.0	
	50	25.0	73.8	95.2	
	50	25.0	73.9	95.6	

表3 含量测定结果 (n=6)

Tab. 3 Results of content determination (n=6)

成分	含量/mg				相对含量 (全方)/%
	第1天	第3天	第5天	平均值	
表小檗碱	370.5	368.4	371.3	370.1	1.89
黄连碱	331.5	330.4	330.8	330.9	1.69
巴马汀	351.4	351.1	350.4	351.0	1.80
盐酸小檗碱	820.3	819.4	819.7	819.8	4.21
黄柏碱	99.8	100.1	99.6	99.8	0.51
秦皮甲素	234.4	234.0	235.4	234.6	1.20
秦皮乙素	116.8	117.2	116.9	116.9	0.60
白头翁皂苷 B ₄	818.4	819.5	818.5	818.8	4.10

含量分别为 0.8%、1.6%、1.5%、1.6% 和 5.5%，秦皮甲素和秦皮乙素之和超过 1.0%，白头翁皂苷 B₄ 为 4.6%，黄柏碱为 0.34%。

3 讨论和结论

白头翁汤源自《伤寒论》，具有清热解毒、凉血止痢之功效，主治热毒痢疾，临床常用于阿米巴痢疾、细菌性痢疾等疾病的治疗，而且因其以临床疗效好、毒副作用小、在肉食品中残留少等优势，还被广泛用于动物各种细菌性、病毒性疾病的治疗。随着中药现代化发展，白头翁汤在传统汤剂的基础上推陈出新，出现了散剂、灌肠剂、结肠缓释片、颗粒剂等多种新剂型^[10-13]。因此，建立一套科学完善的白头翁汤质量检测标准显得尤为必要。

本实验考察了乙腈-磷酸、甲醇-磷酸、乙腈-三乙胺流动相系统对成分测定的影响，发现甲醇-磷酸、乙腈-三乙胺系统均会对测定造成干扰，推测三乙胺紫外吸收波长较大，造成负吸收，严重干扰基线，导致基线不平，从而干扰定量结果，故选择乙腈-磷酸系统，并以适量三乙胺调节 pH。同时，对不同体积比例下的色谱图进行比较，发现当乙腈所占比例为 50% 时，各成分保留时间均在 30 min 以上，分离度较差，达不到测定要求；为 30% 左右时，虽然缩短了大多数成分的保留时间，但分离度仍达不到定量要求，故最终采用梯度洗脱检测法，在此条件下各成分分离度良好，无相互干扰。

本研究建立 RP-HPLC 法同时测定白头翁汤中 8 种指标成分（秦皮甲素、黄柏碱、秦皮乙素、表小檗碱、巴马汀、黄连碱、盐酸小檗碱和白头翁皂苷 B₄）的含量，通过方法学考察，表明该方法准确可靠，所得各成分分离度较好，能够满足定量测定要求。

参考文献：

[1] 刘海峰, 陈有明, 赵军, 等. 白头翁汤加减治疗痢疾体

- 会[J]. 中国中医急症, 2014, 23(1): 180-181.
- [2] 施大军. 加减白头翁汤治疗痢疾的临床体会[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(2): 206-206.
- [3] 娄靓珂. 中西医结合治疗痢疾42例疗效观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(6): 81.
- [4] 张贻昌, 王明耿. 中药产品质量过程控制的重要性[J]. 中成药, 2012, 34(8): 1581-1585.
- [5] 周刚, 何燕萍. 中药复方新药研发中质量标准研究需关注的问题[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3389-3391.
- [6] 蔡乐, 刘萍, 周忻, 等. HPLC法同时测定加味白头翁汤凝胶灌肠剂中秦皮甲素和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(3): 244-246.
- [7] 汤瑾, 刘文, 冯果, 等. 复方白头翁结肠片的质量标准研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(2): 28-30.
- [8] 袁立, 雷鹏, 黄丽, 等. 白头翁汤传统饮片汤剂与配方颗粒汤剂中盐酸小檗碱、巴马汀含量比较[C] //湖南省药学会第12次会员代表大会暨2008年学术年会论文集. 北京: 中国药学会; 长沙: 湖南药学会, 2008: 278-280.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [10] 王慧, 王亮, 殷中琼, 等. 正交法优选中药复方“加味白头翁散”有效部位提取工艺[J]. 中国农学通报, 2011, 27(26): 73-78.
- [11] 刘萍, 蔡乐, 李游, 等. 加味白头翁汤凝胶灌肠剂止泻、镇痛、止血作用的研究[C] //2010年中国药学会大会暨第十届中国药师周大会论文集. 北京: 中国药学会, 2010: 1-6.
- [12] 冯果, 刘文, 汤瑾, 等. 复方白头翁结肠靶向片中白头翁皂苷B4兔体内药动学研究[J]. 中成药, 2012, 34(3): 439-442.
- [13] 杨璐, 王亮, 李福杏, 等. “加味白头翁”颗粒剂的制备及稳定性考察[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(10): 238-241.

GC法同时测定羚羊感冒片中7种成分

林林, 刘广楨, 刘洪超, 焦阳, 徐丽华, 林永强*
(山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101)

摘要: 目的 建立GC法同时测定羚羊感冒片(羚羊角、连翘、金银花等)中7种成分的含有量。方法 羚羊感冒片乙酸乙酯提取液的分析采用HP-5毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.32 μm); 进样口温度230 ℃, 检测器温度250 ℃; 分流比15:1。结果 α-蒎烯、β-蒎烯、柠檬烯、薄荷酮、薄荷脑、胡薄荷酮、乙酸薄荷酯分别在0.010 08~0.504 0、0.011 73~0.586 5、0.038 94~1.924、0.021 93~1.096、0.314 2~15.71、0.029 98~1.499、0.017 36~0.868 0 μg范围内线性关系良好, 平均加样回收率(n=6)分别为98.2%、98.7%、98.4%、99.0%、99.5%、98.9%、98.4%, RSD分别为1.1%、0.75%、0.84%、0.69%、0.39%、0.48%、1.2%。17批样品中, 仅8批检测出所有7种成分, 有4批测得成分少于4种, 有1批上述成分均未检出。结论 羚羊感冒片的质量不理想, 需加强监管。

关键词: 羚羊感冒片; 化学成分; GC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1947-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.015

Simultaneous determination of seven constituents in Lingyang Ganmao Tablets by GC

LIN Lin, LIU Guang-zhen, LIU Hong-chao, JIAO Yang, XU Li-hua, LIN Yong-qiang*
(Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: AIM To develop a GC method for simultaneously determining the contents of seven constituents in Lingyang Ganmao Tablets for common cold (*Saigae Tataricae Cornu*, *Forsythiae Fructus*, *Lonicerae Japonicae Flos*,

收稿日期: 2015-09-21

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307-002); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2013HM074)

作者简介: 林林(1980—), 女, 主管药师, 从事中药质量标准研究工作。Tel: (0531) 81216523, E-mail: linlinsda@163.com

* 通信作者: 林永强(1975—), 男, 副主任药师, 从事中药质量标准研究工作。Tel: (0531) 81216521, E-mail: 13864067104@