

小承气汤的质量控制研究

李 康¹, 周海涛², 王媛媛³

1. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006

2. 深圳市福田区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518040

3. 广东药学院临床医学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 采用 RP-HPLC 法研究小承气汤质量控制方法, 同时测定橙皮苷、肉桂酸、大黄酸、芦荟大黄素、川陈皮素、和厚朴酚、大黄素、厚朴酚、大黄酚和大黄素甲醚的量。方法 采用 Apollo C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 1.1% 醋酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 洗脱程序: 0 min (83:17)、30 min (70:30)、50 min (45:55)、70 min (13:87)、75 min (83:17), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm。结果 得线性回归方程: 橙皮苷 $Y=2.4695X+0.0199$ ($r=0.9999$)、肉桂酸 $Y=2.9543X+0.0058$ ($r=0.9999$)、大黄酸 $Y=1.1764X+0.0364$ ($r=0.9992$)、芦荟大黄素 $Y=1.2414X-0.0022$ ($r=0.9999$)、川陈皮素 $Y=0.7221X+0.0071$ ($r=0.9999$)、和厚朴酚 $Y=1.8215X+0.0214$ ($r=0.9990$)、大黄素 $Y=1.8152X+0.0022$ ($r=0.9995$)、厚朴酚 $Y=1.7104X-0.0105$ ($r=0.9994$)、大黄酚 $Y=4.5748X-0.0075$ ($r=0.9993$) 和大黄素甲醚 $Y=0.4272X-0.0023$ ($r=0.9997$), 线性范围分别为 20.0~80.0、6.7~30.0、57.6~153.6、18.6~37.1、1.7~139.2、3.1~65.4、8.8~35.2、2.9~73.0、2.0~10.0、10.8~43.2 μg/mL; 回收率分别为 98.5%、98.9%、99.3%、99.1%、97.8%、98.6%、99.1%、98.7%、99.6%、98.9%, 日内和日间精密度分别小于 2.0% 和 2.1%。结论 此方法简单快速灵敏, 对于小承气汤的质量控制有一定的参考价值。

关键词: 小承气汤; RP-HPLC; 质量控制; 大黄; 厚朴; 枳实

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)05-0905-04

Quality control of Xiaochengqi Decoction

LI Kang¹, ZHOU Hai-tao², WANG Yuan-yuan³

1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Futian Control and Prevention for Disease Center, Shenzhen 518040, China

3. School of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Key words: Xiaochengqi Decoction; RP-HPLC; quality control; *Rhei Radix et Rhizoma*; *Magnoliae Officinalis Cortex*; *Aurantii Immaturus Fructus*

小承气汤源自汉代张仲景《伤寒论》^[1], 主要由大黄、厚朴和枳实组成。主治阳明腑实轻症而偏于痞满者, 临床多用于肠梗阻, 为中成药名方^[2]。关于其质量控制研究的文献不多, 且多为测定其中一个或几个成分^[3-6]。本实验采用 RP-HPLC 法建立了小承气汤质量控制图谱, 同时测定了其中的 10 个成分。其中肉桂酸、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚来自大黄, 和厚朴酚、厚朴酚来自厚朴, 橙皮苷和川陈皮素来自枳实。

1 仪器与材料

HP1100 液相色谱仪 (美国 HP 公司), 四元泵, 自动进样器, 控温箱和 UV 检测器; G2170A APC 色谱工作站。

大黄、厚朴 (姜炙)、枳实购自广州致信药业有限公司, 由北京大学深圳医院药剂科曾向总主任药师鉴定均为正品。大黄 (酒洗, 12 g)、厚朴 (去皮, 姜炙, 6 g)、枳实 (炙, 9 g)。橙皮苷 (批号 110721-200613)、肉桂酸 (批号 110786-200503)、大黄酸 (批号 110757-200206)、芦荟大黄素 (批号 110795-201007)、和厚朴酚 (批号 110730-201011)、大黄

收稿日期: 2010-08-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30801515)

作者简介 李 康 (1975—), 男, 四川万源人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及其质量评价方法研究。

Tel: (020)39352136 13829799587 E-mail: likang229@yahoo.com.cn

素 (批号 110756-00110)、厚朴酚 (批号 110729-200411)、大黄酚 (批号 110796-01017)、大黄素甲醚 (批号 110758-200912) 和甲基橙皮苷 (批号 111580-200503, 内标) 均购自中国药品生物制品检定所。川陈皮素 (批号 478-01-3, 质量分数 99.3%) 购自深圳市美荷生物科技有限公司。冰醋酸、醋酸乙酯、三氯甲烷和盐酸均为分析纯, 购自天津市化学试剂一厂; 甲醇和乙腈均为色谱纯, 购自迪马公司; 水为二次蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Appolo ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 1.1%冰醋酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序为: 0 min (83 : 17)、30 min (70 : 30)、50 min (45 : 55)、70 min (13 : 87)、75 min (83 : 17), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品: 橙皮苷 5.00 mg、肉桂酸 4.17 mg、大黄酸 2.40 mg、芦荟大黄素 1.16 mg、川陈皮素 4.35 mg、和厚朴酚 1.09 mg、大黄素 1.10 mg、厚朴酚 3.65 mg、大黄酚 0.50 mg、大黄素甲醚 1.35 mg 和甲基橙皮苷 (内标) 6.98 mg, 定容至 25 mL 量瓶, 得质量浓度分别为橙皮苷 200.0 μg/mL、肉桂酸 166.8 μg/mL、大黄酸 96.0 μg/mL、芦荟大黄素 46.4 μg/mL、川陈皮素 174.0 μg/mL、和厚朴酚 43.6 μg/mL、大黄素 44.0 μg/mL、厚朴酚 146.0 μg/mL、大黄酚 20.0 μg/mL、大黄素甲醚 54.0 μg/mL 和甲基橙皮苷 279.1 μg/mL 的对照品溶液。

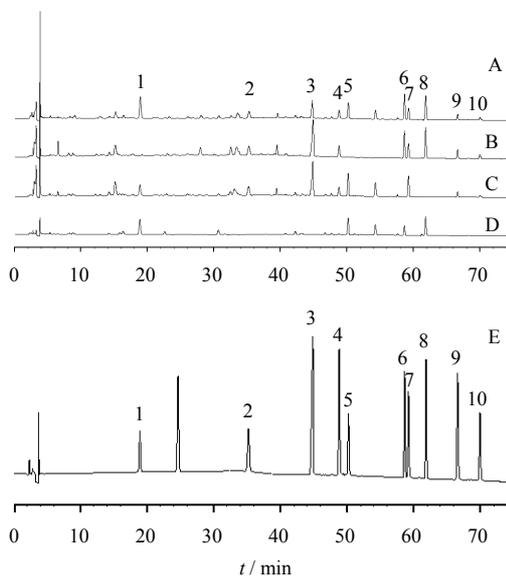
2.3 供试品溶液的制备

小乘气汤样品根据传统方法^[4]制备。称取各批次药材, 生大黄约 0.500 g, 厚朴约 0.250 g, 枳实约 0.375 g, 加 10 倍量的水煎煮 1 h, 滤过, 残渣再加 8 倍量的水煎煮 0.5 h, 合并水提取液, 减压浓缩至 10 mL, 放凉, 即得小乘气汤样品。共制备 6 批样品, 批号分别为 20100610、20100613、20100615、20100620、20100625、20100628。

2.4 阴性对照试验

按照样品制备方法, 分别制备不含大黄、厚朴、枳实的小乘气汤阴性样品, 按供试品溶液的处理方法制备阴性对照液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过。分别取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照液各进样 10 μL, 测定, 橙皮苷、肉桂酸、大黄酸、芦荟大黄素、

川陈皮素、和厚朴酚、大黄素、厚朴酚、大黄酚和大黄素甲醚的保留时间分别为 18.8、35.2、44.8、48.8、50.2、58.6、59.2、61.8、66.6、69.9 min。结果见图 1。表明阴性对照无干扰。



1-橙皮苷 2-肉桂酸 3-大黄酸 4-芦荟大黄素 5-川陈皮素
6-和厚朴酚 7-大黄素 8-厚朴酚 9-大黄酚 10-大黄素甲醚

1-hesperidin 2-cinnamic acid 3-rhein 4-aloe-emodin 5-nobiletin
6-honokiol 7-emodin 8-magnolol 9-chrysophanol 10-phycion

图 1 小乘气汤样品 (A)、缺枳实阴性对照 (B)、缺厚朴阴性对照 (C)、缺大黄阴性对照 (D) 及混合对照品 (E) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Xiaochengqi Decoction sample (A), negative reference substance without *Aurantii Immaturus Fructus* (B), negative reference substance without *Magnoliae Officinalis Cortex* (C), negative reference substance without *Rhei Radix et Rhizoma* (D), mixed reference substance (E)

2.5 线性关系考察

取不同体积的各对照品溶液分别置 2 mL 量瓶中, 再取 400 μL 内标溶液分别置各量瓶中, 定容, 制备成不同质量浓度的系列对照品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样 10 μL, 依法测定。结果见表 1。各对照品峰面积与内标峰面积的比值 (Y) 和其质量浓度 (X) 呈现良好线性关系。

2.6 精密度试验

取一定质量浓度的对照品溶液, 分别加入 400 μL 内标溶液, 1 d 重复进样 6 次测定日内精密度, 连续 3 d 测定日间精密度, 结果见表 2。

2.7 稳定性试验

表 1 回归方程

Table 1 Linear regression equation

成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
橙皮苷	$Y=2.4695X+0.0199$	0.9999	20.0~80.0
肉桂酸	$Y=2.9543X+0.0058$	0.9999	6.7~30.0
大黄酸	$Y=1.1764X+0.0364$	0.9992	57.6~153.6
芦荟大黄素	$Y=1.2414X-0.0022$	0.9999	18.6~37.1
川陈皮素	$Y=0.7221X+0.0071$	0.9997	1.7~139.2
和厚朴酚	$Y=1.8215X+0.0214$	0.9990	3.1~65.4
大黄素	$Y=1.8152X+0.0022$	0.9995	8.8~35.2
厚朴酚	$Y=1.7104X-0.0105$	0.9994	2.9~73.0
大黄酚	$Y=4.5748X-0.0075$	0.9993	2.0~10.0
大黄素甲醚	$Y=0.4272X-0.0023$	0.9997	10.8~43.2

表 2 日内精密度和日间精密度 (n=6)

Table 2 Intra-day and inter-day precision (n=6)

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	
		日内	日间
橙皮苷	50.00	0.4	1.9
肉桂酸	16.68	1.7	1.3
大黄酸	96.00	2.0	1.4
芦荟大黄素	27.84	1.8	1.8
川陈皮素	69.60	1.7	1.5
和厚朴酚	34.88	1.3	1.4
大黄素	17.60	1.5	1.7
厚朴酚	43.80	1.9	1.1
大黄酚	6.00	1.9	2.0
大黄素甲醚	21.60	1.8	2.1

取批号 20100615 的样品制备的供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8 h 进样 10 μL , 计算得橙皮苷、肉桂酸、大黄酸、芦荟大黄素、川陈皮素、和厚朴酚、大黄素、厚朴酚、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.53%、1.10%、2.03%、1.69%、0.96%、2.11%、0.88%、1.34%、1.29%、0.79%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 重现性试验

取批号 20100615 的样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 计算得橙皮苷、肉桂酸、大黄酸、芦荟大黄素、川陈皮素、和厚朴酚、大黄素、厚朴酚、大黄酚和大黄素甲醚质量分数的 RSD 分别为 1.85%、2.02%、0.75%、0.79%、1.81%、2.56%、2.84%、1.32%、1.45%、1.87%。

2.9 回收率试验

取批号 20100615 样品 6 份, 按供试品溶液制备方法制备, 分别加入对照品溶液适量 (橙皮苷 0.200 μg 、肉桂酸 0.067 μg 、大黄酸 0.576 μg 、芦荟大黄素 0.186 μg 、川陈皮素 0.017 μg 、和厚朴酚 0.031 μg 、大黄素 0.088 μg 、厚朴酚 0.029 μg 、大黄酚 0.002 μg 和大黄素甲醚 0.108 μg) 和 250 μL 内标溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样 10 μL , 测定。结果见表 3。

表 3 回收率试验结果

Table 3 Results of recovery test

成分	平均回收率/%	RSD/%
橙皮苷	98.5	1.9
肉桂酸	98.9	2.1
大黄酸	99.3	0.8
芦荟大黄素	99.1	1.3
川陈皮素	97.8	2.5
和厚朴酚	98.6	2.8
大黄素	99.1	1.6
厚朴酚	98.7	1.7
大黄酚	99.6	2.1
大黄素甲醚	98.9	1.5

2.10 样品测定

取样品 10 mL, 加 36.8% 盐酸两滴酸化游离, 醋酸乙酯 5 mL 萃取 2 次, 合并萃取液于蒸发皿, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干, 放凉, 残渣加入甲醇溶解, 定量转移至 5 mL 量瓶, 加入 1.0 mL 内标溶液, 甲醇定容, 摇匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 5 μL 进样测定。结果见表 4。测定结果表明各成分的量差异明显, 川陈皮素在 4 批样品中可以被检测到, 但在样品 20100615、20100620 中没有检测到, 提示药材来源可能不一样, 质量不稳定, 加强药材质量控制是必然趋势。

3 讨论

在本研究中, 这 10 个成分的极性相差很大, 采用梯度洗脱的方法才能完全分离。甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水不同比例, 由于含有酸性成分, 因此加入不同的酸: 冰醋酸、磷酸、盐酸来进行考察。甲醇-水溶剂系统由于醇水混合生热, 基线漂移。乙腈-水溶剂系统相对峰形尖锐, 基线稳定。磷酸和盐酸酸性过强, 对酸性成分影响过于灵敏, 很难完全分离, 所以选用弱酸性的冰醋酸。同时考察了不同体积比的冰醋酸水溶液 1%、0.1%、0.01%、0.011%

表4 样品测定结果
Table 4 Determination of samples

样 品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)									
	橙皮苷	肉桂酸	大黄酸	芦荟	川陈皮素	和厚朴酚	大黄素	厚朴酚	大黄酚	大黄素
20100610	58.3	14.7	124.4	36.4	1.8	2.7	23.6	20.5	8.3	33.3
20100613	31.6	20.5	95.5	32.4	84.9	19.7	18.6	48.0	4.1	12.2
20100615	35.6	14.4	100.6	27.6	—	3.2	24.7	4.7	4.8	21.6
20100620	31.6	8.6	71.7	20.3	—	6.0	10.9	24.0	3.0	12.2
20100625	49.0	16.7	70.0	34.8	55.8	37.3	10.9	48.6	3.4	14.6
20100628	45.8	15.0	79.4	32.4	100.1	52.6	28.5	57.3	6.1	33.3

和 0.001%，只有 0.011%冰醋酸水溶液既能使肉桂酸和大黄酸与其他成分完全分离，又能使大黄酸得到较好的峰形，减少拖尾。

考察了 4 种色谱柱：Gracesmart C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Appolo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Appolo C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)。Appolo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱能完全分离肉桂酸和其他成分，并得到好的峰形，而其他色谱柱很难得到满意的分离度。在 25 cm 长的 Appolo C₁₈ 色谱柱上，发现大黄素的保留时间长于和厚朴酚，而在 15 cm 长的 Appolo C₁₈ 色谱柱上却相反，这或许由于柱长短不一致导致洗脱时间不一致，从而导致流动相中乙腈比例不同，对大黄素的选择性不一致而造成。

甲基橙皮苷与橙皮苷具有相似的化学结构，能够与其他成分很好的分离，无干扰，选作内标。

橙皮苷和肉桂酸的紫外吸收在 280 nm 附近，川陈皮素在 332 nm 附近，和厚朴酚和厚朴酚在 294 nm 附近，大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚在 254 nm 附近。检测波长选在 254 nm 处，是由于样品中大黄酚和大黄素甲醚的含量很低，

而且在该波长处其他成分也能检测到。

在样品制备中，仍然保留了水提取工艺，小承气汤中具有很多酸性有效成分，水提可以充分溶出，具有良好的临床疗效。在水提取液中加入盐酸使酸性成分充分游离出来，含量增高，醋酸乙酯萃取避免乳化，大大提高提取率。

参考文献

- [1] 寇俊萍, 刘颖, 朱丹妮, 等. 小承气汤等三方泻下作用差异物质基础研究 [J]. 时珍国医国药, 1999, 10(6): 401-403.
- [2] 李广彬. 小承气汤的现代药理与临床应用 [J]. 中国医药指南, 2008, 6(15): 136-137.
- [3] 胡晓静, 高铁哲, 李飞, 等. HPLC 法测定小承气汤中大黄酸和厚朴酚的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(1): 26-28.
- [4] 裴刚, 郭锦明. RP-HPLC 测定小承气汤中番泻苷 A 的含量 [J]. 中国民族民间医药, 2008, 17(2): 14-15.
- [5] 刘艳娜, 刘潇潇, 王强. 台湾生产的大、小承气汤浓缩颗粒质量分析研究 [J]. 中成药, 2009, 31(4): 547-550.
- [6] Tang W F, Huang X, Yu Q, *et al.* Determination and pharmacokinetic comparison of rhein in rats after oral dosed with Da-Cheng-Qi decoction and Xiao-Cheng-Qi decoction [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(11): 1186-1190.