

## HPLC 法测定养血安神分散片中大黄素

杨鹤华<sup>1</sup>, 石森林<sup>2\*</sup>, 戴文芸<sup>2</sup>

(1. 诸暨市人民医院 药剂科, 浙江 诸暨 311800; 2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

养血安神分散片是由仙鹤草、墨旱莲、首乌藤等7味中药组成的复方制剂, 具有滋阴清热之功效, 适用于阴虚火旺所致心悸、失眠、头晕、心烦等。其化学成分较为复杂, 质量控制较难。本实验以大黄素为指标成分, 建立其HPLC测定法, 控制制剂质量, 结果较为满意。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪, 浙江大学 N2000 色谱工作站; Sartorius BP211D 电子天平(感量 0.1、0.01 mg); USC-502 超声波清洗器, TU-11901 紫外分光光度计。

养血安神分散片(自制, 0.5 g/片), 大黄素对照品(批号 756-200211)由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱纯, 水为自制重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 436 nm。理论塔板数以大黄素峰计算应大于 4 000。

#### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取大黄素对照品 10.35 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀。再精密吸取 10 mL 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(含大黄素 20.7 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取本品约 0.8 g, 研细, 2 份, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 分别精密加入甲醇、乙醇各 20 mL, 称定质量, 超声处理(300 W, 25 kHz) 60 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 分别用各自溶媒补足减失质量, 摇匀, 滤过。精密吸取续滤液 10 mL 置 50 mL 圆底烧瓶中, 挥去甲醇, 加 2 mol/L 硫酸溶液 10 mL, 超声处理 5 min, 再加氯仿 10 mL, 加热回流 1 h, 冷却, 移置分液漏斗中, 用少氯仿洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取氯仿层, 酸液用氯仿提

取 2 次, 每次 10 mL, 合并氯仿液, 以无水硫酸钠脱水, 氯仿液挥干, 残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 阴性对照液的制备: 取缺首乌藤阴性样品 0.8 g, 按供试品溶液的制备方法制备缺首乌藤的阴性溶液。

2.3 阴性对照试验: 取大黄素对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 结果在与对照品峰保留时间一致的位置上, 阴性对照无干扰峰。

2.4 线性关系考察: 精密吸取大黄素对照品溶液 1、2、4、6、8、10、14、18 mL 分别置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 备用。精密吸取上述溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 测定峰面积。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:  $Y = 3.0 \times 10^6 X + 1558$ ,  $r = 0.9995$ 。可见大黄素在 8.28~149.04 ng 与峰面积呈很好的线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取 2.41 μg/mL 大黄素对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 按上述分离条件进行分析, 测定 5 次, 测定大黄素峰面积。结果对照品溶液中大黄素峰面积 RSD 为 0.41%, 供试品溶液中大黄素峰面积 RSD 为 0.21%。

2.6 重现性试验: 取样品 0.8 g, 共 5 份, 精密称定, 按样品分析方法进行测定, 结果大黄素质量分数的平均值为 59 μg/g, RSD 为 2.07%。

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液适量, 室温下放置, 分别于 4、8、12、16 h 精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪, 按上述方法进行测定, 记录色谱图, 结果供试品溶液在配制后 16 h 内, 大黄素峰面积 RSD 为 1.34%。

2.8 加样回收率试验: 取含大黄素 59 μg/g 样品约 0.4 g, 6 份, 精密称定, 分别精密加入 2.56 μg/mL

(下转第 1868 页)

表 1 依肝达含药血清对 2215 细胞分泌、HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Inhibition of Yiganda drug-containing serum on 2215 cells secretion of HBsAg and HBeAg ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/ %	HBsAg		HBeAg	
		A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
对照	20	1.28±0.06	—	1.68±0.18	—
	10	1.27±0.11	—	1.71±0.11	—
ADF	20	0.60±0.11**	53.13	0.81±0.19**	51.79
	10	0.67±0.10**	47.24	1.23±0.15**	28.07
依肝达	20	0.54±0.06**	57.81	0.74±0.12**	55.95
	10	0.73±0.10**	42.52	1.19±0.15**	30.41

与对照组比较: \*\*P<0.01

\*\*P<0.01 vs control group

4 讨论

2215 细胞模型是 Sells 等<sup>[1]</sup>在 1987 年将克隆的 2 个头尾相连的 HBV DNA 全基因及抗 G418 质粒直接导入受体细胞—人肝癌细胞株 HepG2 细胞构建而成。该细胞不仅支持 HBV DNA 的复制,且支持 Dane 样颗粒的包装与分泌<sup>[2]</sup>。目前,该细胞模型已被国内外学者公认且广泛用于抗 HBV 药物筛选和评价等研究,现已成为申报抗 HBV 新药必须进行的体外实验模型<sup>[3]</sup>。中药血清药理学方法是近年来兴起的一种适合中药特点的更科学的中药药理

学实验方法。它可防止中药粗制剂本身的理化性质对实验的干扰,还能反映中药在胃肠道消化吸收、再经生物转化、最后产生药理效应的真实过程,并代表了药物在体内产生作用的真正有效成分,尤其是适合中药及中药复方化学成分复杂的特点,为中药及其复方的药理学研究开辟了新纪元<sup>[4]</sup>。本实验采用 2215 细胞模型和中药血清药理学方法,采用 ELISA 法检测依肝达含药血清在作用 2215 细胞 72 h 后上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的量。实验结果表明依肝达有一定的抑制 2215 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的作用,提示其抗病毒作用是通过抑制 HBV 的复制而产生疗效的。

参考文献:

- [1] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (4): 1005-1009.
- [2] Sells M A, Zelent A Z, Shvartsman M, et al. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions [J]. *J Virol*, 1988, 62(8): 2836-2844.
- [3] Lampertico P, Malter J S, Gerber M A. Development and application of an *in vitro* model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics [J]. *Hepatology*, 1991, 13(3): 422-426.
- [4] 刘建文. 药理实验方法学—新技术与新方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.

(上接第 1824 页)

大黄素对照品溶液 8、10、12 mL,制备供试品溶液,按上述方法测定,计算回收率,结果本方法加样回收平均回收率为 96.8%,RSD 为 0.90%(n=6)。

2.9 样品测定:取 3 批样品,每批 2 份,依法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样,每份平行测定 2 次,采用外标二点法计算大黄素的质量分数,结果见表 1。

3 讨论

《中国药典》记载首乌藤具有养血安神、祛风通络的功效,用于失眠多梦、血虚身痛、风湿痹痛,为养血安神分散片处方中主要养心安神药,是反映制剂功能主治的重要组成部分。而大黄素是首乌藤中主

表 1 养血安神分散片中大黄素的测定结果(n=2)

Table 1 Determination of emodin in Yangxue Anshen Dispersible Tablets (n=2)

批号	大黄素/( $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ )
20050302	29.5
20050310	29.9
20050321	30.0

要成分,因此选用大黄素作为指标成分以控制养血安神分散片的质量。

实验结果显示,HPLC 法测定养血安神分散片中大黄素的方法简便、准确、重现性好,可为本品的质量控制提供依据。