

## RRLC MS/MS 法测定三黄片中小檗碱、黄芩苷和大黄素

解军波<sup>1,2</sup>, 张彦青<sup>1,2</sup>, 戚务勤<sup>1,2</sup>

(1 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134; 天津商业大学 制药工程系, 天津 300134)

**摘要:**目的 建立 RRLC-MS/MS 法检测三黄片中小檗碱、黄芩苷与大黄素。方法 应用超声提取和 Agilent G6410B Triple Quad LC/MS 检测。Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 柱温为 25 °C, 流动相为(0.1% 醋酸溶液)-甲醇(80:20); 体积流量 0.2 mL/min, 进样量为 20 μL。以液相色谱分离、电喷雾离子化串联质谱进行检测。结果 在 12.5~200 ng/mL 时小檗碱、黄芩苷与大黄素线性关系良好, 三黄片中小檗碱、黄芩苷与大黄素平均加样回收率分别为 99.53%、100.24%、102.00%。结论 该方法快速简便、精密度好、灵敏度高, 可用于三黄片中小檗碱、黄芩苷与大黄素的测定。

**关键词:**三黄片; 小檗碱; 黄芩苷; 大黄素; RRLC-MS/MS

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)05-0739-03

三黄片是由大黄、黄芩、盐酸小檗碱组成的复方制剂, 具有清热泻火、消炎利便之功效, 用于三焦热盛、目赤肿痛、口鼻生疮、咽喉肿痛、牙龈出血、心烦口渴、尿黄便秘、急性胃肠炎、痢疾等。《中国药典》2005 年版中该制剂仅有大黄有效成分的测定<sup>[1]</sup>。为有效控制产品质量, 保证临床用药的安全、有效, 采用 HPLC 法对三黄片中有效成分进行了测定<sup>[2-6]</sup>。高分离度快速液相色谱(RRLC)是近几年来推出的一种新的液相色谱技术, 其峰容量、分析效率、灵敏度和分辨率较常规 HPLC 有了很大的提高, 为复杂中药体系的多指标成分分析提供了良好的技术手段<sup>[7]</sup>。目前, 已经逐渐应用于中药及其制剂分析的研究<sup>[8,9]</sup>。本研究建立了 RRLC-MS/MS 法同时测定三黄片中盐酸小檗碱、大黄素、黄芩苷 3 种有效成分, 结果显示建立的方法快速简便、精密度好、灵敏度高。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪、G1322A 在线脱气机、G1312B 二元泵、G1316B 柱温箱、G1315C DAD 紫外检测器、G1367D 自动进样器、G6410B Triple Quad LC/MS; Masshunter 色谱工作站(Agilent, 美国); BP211D 型十万分之一电子天

平(Satorius, 德国); ZH-2 型涡流混合器(天津大学无线电厂); AS10200A 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

三黄片由市场购得; 盐酸小檗碱(批号 0713-9906)、大黄素(批号 0756-9707)、黄芩苷(批号 715-200010)对照品均购自中国药品生物制品检定所; 色谱纯甲醇与超纯水均购自 J. T. Baker 公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件: Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 柱温为 25 °C, 流动相为 0.1% 醋酸溶液-甲醇(80:20); 体积流量 0.2 mL/min, 进样量为 20 μL。

2.1.2 质谱条件: 离子源: 电喷雾 ESI 源, 检测方式: 多反应检测(MRM), 电喷雾电压: 4 000 V, 雾化气体: N<sub>2</sub>, 雾化气压力: 2.4×10<sup>5</sup> Pa; 干燥气体: N<sub>2</sub>, 干燥气体体积流量: 8 L/min; 离子源温度: 350 °C, 碰撞气体: 高纯氮气, 碰撞气压力: 0.15 MPa。小檗碱、黄芩苷和大黄素质谱分析的条件参数见表 1。

按前述色谱和质谱条件对三黄片样品中各成分进行测定, 记录色谱图。三黄片样品总离子流图及三种目标化合物的提取离子流图见图 1。可知三黄

表 1 小檗碱、黄芩苷和大黄素质谱分析的条件参数

Table 1 MS Analysis on parameters of berberine hydrochloride, baicalin, and emodin

时间段/min	化合物	ESI(+/-)	MRM 反应	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	Dwell/ms
0.0~4.5	小檗碱	ESI(+)	336 2 <sup>+</sup> →320 2	160	30	100
	黄芩苷	ESI(+)	447 1 <sup>+</sup> →271 0	160	10	100
4.5~6.8	大黄素	ESI(-)	269 0 <sup>-</sup> →225 1	160	30	200

片中各组分峰型良好,方法具有较好的分离度和灵敏度。可以进行定量分析。

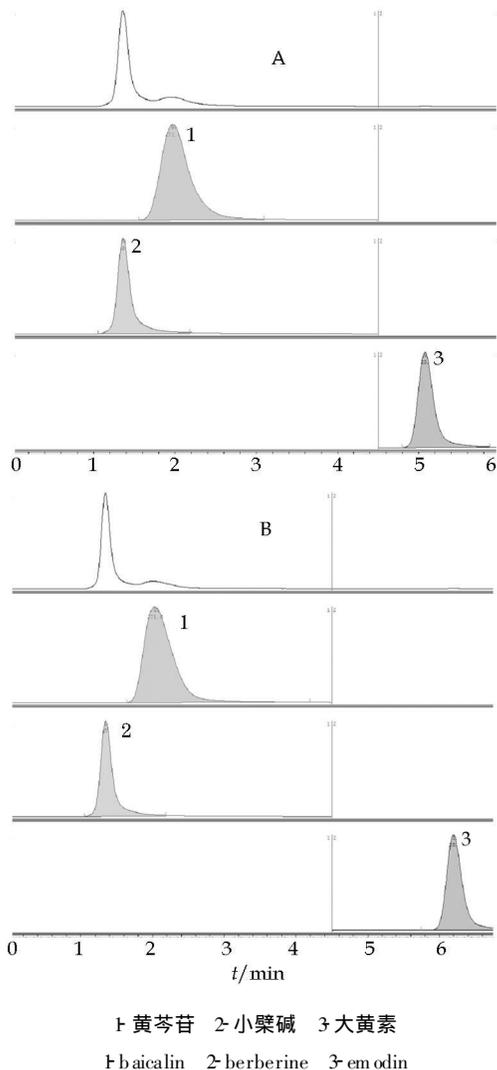


图 1 对照品(A)和三黄片(B)的 RRLC MS/MS 色谱图

Fig 1 RRLC MS/MS Chromatograms of reference substances (A) and Sanhuang Tablet (B)

2.2 对照品溶液的配制: 分别精密称量盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀后即得质量浓度均为 100 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 精密称取 0.1 g, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声处理 30 min, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 针芯式微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备: 分别精密量取各对照品溶液适量置 10 mL 量瓶中, 配成含各对照品 1 μg/mL 的混合对照品溶液。精密量取上述混合对照品溶液 2、1、0.5、0.25、0.125 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度 摇匀 按前述色谱和质谱条件测

行线性回归, 得标准曲线方程。3 种组分在 12.5~200 ng/mL 线性关系良好, 标准曲线方程分别为盐酸小檗碱:  $Y = 8907.1 X + 9157.7, r = 0.9998$ ; 黄芩苷:  $Y = 35406 X - 28621, r = 0.9997$ ; 大黄素:  $Y = 42484 X + 25863, r = 0.9998$ 。

2.5 精密度试验: 制备 D15028 批次三黄片供试品溶液, 精密吸取该供试品溶液 100 倍稀释液 20 μL 进样, 连续进样 5 次, 测定峰面积, 计算得盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素提取离子流色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.96%、1.45%、2.72%。

2.6 稳定性试验: 制备 D15028 批次三黄片供试品溶液, 精密吸取该供试品溶液 100 倍稀释液 20 μL 进样, 分别于 0、2、4、6、8 h 进行分析, 测定色谱峰面积, 计算得盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素提取离子流色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.56%、2.71%、2.93%。

2.7 重现性试验: D15028 批三黄片 5 份, 制备供试品溶液, 依法测定, 结果盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素质量分数的 RSD 分别为 1.82%、2.37%、2.85%。

2.8 加样回收率试验: 精密称取 D15028 批三黄片 0.1 g, 按检出量精密加入质量浓度为 100 μg/mL 的盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素对照品溶液各 19.5、13.4、1.4 mL, 制备供试品溶液共 5 份, 依法测定, 结果盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素的平均加样回收率分别为 99.53%、100.24%、102.00%。

2.9 样品测定: 取生产厂家河北世济唐威药业有限公司批号为 D150283, 规格为 0.25g/片; 药都制药集团股份有限公司批号为 D80402, 规格为 0.25g/片; 天津隆顺裕发展制药有限公司批号为 0610002, 规格为 0.20g/片, 共 3 批三黄片, 每批重复测定 3 次, 按标准曲线方程计算盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的质量分数, 结果见表 2。

表 2 三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的测定结果 (n=3)

批号	盐酸小檗碱		黄芩苷		大黄素	
	mg/片	mg/g	mg/片	mg/g	mg/片	mg/g
D15028	4.87	19.48	3.34	13.36	0.34	1.36
D80402	3.02	12.08	3.57	14.28	0.42	1.68
0610002	3.19	15.95	9.33	46.65	0.38	1.90

### 3 讨论

液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS)因其高灵敏度、高选择性, 多组分同时测定不需完全分离, 在复方制剂药动力学研究中具有其他传统方法不可比拟

的复方制剂, 本实验采用 RRLC-MS/MS 法建立了同时检测三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的测定方法。研究结果发现以甲醇-水(0.1% 醋酸) 80:20 作为流动相, 体积流量 0.2 mL/min, 得到较好的分离度, 且保留时间适当。方法学考察发现本方法可以很好地测定三黄片中小檗碱、黄芩苷与大黄素质量分数, 不仅为三黄片的质量控制提供了一定参考和依据, 同时为下一步研究大鼠口服三黄片后体内指标成分的药动学特征奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 蔡为群, 顾雪中. 高效液相色谱法测定三黄片中黄芩苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(3): 136
- [3] 蒋 晔, 郝晓花, 刘红菊. 非水反相液相色谱法测定三黄片中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 中草药,

2005, 36(3): 378-380

- [4] 田书霞, 蒋晔. RP-HPLC 同时测定三黄片中 4 种有效成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(3): 220-222
- [5] 蒋 晔, 李艳荣, 田书霞, 等. RP-HPLC 测定不同厂家三黄片 4 种指标成分含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 351-352
- [6] 祝忠民, 卢晓荣. HPLC 法同时测定三黄片中 4 种成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(5): 300-301
- [7] 杨义芳. 超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1259-1263
- [8] Huang H Q, Zhang X, Xu Z X, et al. Fast determination of saikosaponins in *Bupleurum* by rapid resolution liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49(4): 1048-1055.
- [9] Liang X, Zhang L, Zhang X, et al. Qualitative and quantitative analysis of traditional Chinese medicine Niu Huang Jie Du Pill using ultra performance liquid chromatography coupled with tunable UV detector and rapid resolution liquid chromatography coupled with time of flight tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2010, 51(3): 565-571.

## 氧化铝柱纯化吴茱萸提取液中总生物碱和柠檬苦素的研究

许海玉<sup>1</sup>, 刘 莹<sup>1</sup>, 张铁军<sup>2\*</sup>, 刘昌孝<sup>3</sup>, 朱雪瑜<sup>2</sup>, 许 浚<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2 天津药物研究院, 天津 300193; 3 天津药物研究院天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

**摘要:**目的 研究中性氧化铝柱纯化吴茱萸总生物碱和柠檬苦素的工艺。方法 以转移率和质量分数为评价指标, 对水沉工艺的 pH 值, 氧化铝柱色谱的上样量、洗脱剂的种类、洗脱剂体积和洗脱体积分流量进行考察。结果 水沉工艺的 pH 值为 3, 氧化铝柱色谱的上样量 20 g, 洗脱剂为醋酸乙酯-二氯甲烷 (70:30), 洗脱剂用量为 5 BV 和洗脱速度为 2 BV/h。结论 氧化铝柱色谱对吴茱萸活性成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的纯化方法可行, 经济简便, 效率较高。

**关键词:** 吴茱萸; 总生物碱; 柠檬苦素; 纯化; 氧化铝柱色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)05-0741-04

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinialis* (Dode) Huang、疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 干燥的近成熟果实, 广泛分布在贵州、江西、湖南、广东、广西等省。吴茱萸始载于《神农本草经》, 列为中品, 性辛, 苦热, 有小毒, 归肝、脾、胃、肾经, 具有温中止呕, 散寒止痛, 助阳止泻的功效且用于治疗疼痛症、胃寒呕吐、呃逆症、虚寒泄泻等症<sup>[1]</sup>。在传统经方左金丸、反左金丸、吴茱萸汤等中应用广泛。吴茱萸含有多种化学成分, 目前从中分离的主要有生物碱、柠檬苦素、挥发油、多糖<sup>[2]</sup>

等化学成分。吴茱萸碱和吴茱萸次碱是吴茱萸中量较高的成分。临床实验表明, 吴茱萸生物碱包括吴茱萸碱和吴茱萸次碱的量与其疗效有正相关关系<sup>[3]</sup>。柠檬苦素具有抗菌、抗病毒、抗炎、镇痛以及抗肿瘤等活性<sup>[4]</sup>, 在吴茱萸中的量较高<sup>[5]</sup>。因此本实验先用水沉工艺, 然后采用中性氧化铝柱色谱对吴茱萸中生物碱和柠檬苦素进行纯化, 并优化其工艺。

### 1 仪器与试剂

Lab Alliance 高效液相色谱仪 (SPD-10AV 紫外检测器, LabAlliance HPLC 色谱工作室), Anke LXJ-11B 离心机 (上海安亭科学仪器厂)。