HPCE 内标法比较戊己丸不同汤剂中 4 种有效成分量的差异

宋晓宁[2]，靳凤云[1*]，张 杰[3]，高 源[2]，杨正奕[2]

1. 贵阳中医学院，贵州 贵阳 550002
2. 贵州省食品药品检验所，贵州 贵阳 550004
3. 贵阳新天药业股份有限公司，贵州 贵阳 550001

摘 要：目的 通过毛细管区带电泳（HPCE）内标法，比较戊己丸传统汤剂、配方颗粒汤剂、复方颗粒汤剂中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷成分量差异。**方法** 采用 HPCE 法，以 50 mmol/L 硼砂缓冲液-甲醇（2∶1）的溶液作为缓冲液，工作电压为 25 kV，压力进样 5 kPa×15 s，电解质封口：5 kPa×10 s；柱温 15 ℃。**结果** 该方法简便、准确，其中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱 3 种生物碱的量在配方颗粒汤剂中明显高于传统汤剂与复方颗粒汤剂，芍药苷则是在传统汤剂中量最高。**结论** 本法对戊己丸配方和复方颗粒剂在临床的推广以及质量控制具有指导价值。

关键词：戊己丸；毛细管区带电泳；传统汤剂；配方颗粒汤剂；复方颗粒汤剂；内标法；盐酸小檗碱；盐酸巴马汀；盐酸药根碱；芍药苷

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2014)11 - 1573 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.014

Comparison on content differences of four bioactive compounds in different Wujiwan decoction by HPCE internal standard method

SONG Xiao-ning[2], JIN Feng-yun[1], ZHANG Jie[3], GAO Yuan[2], YANG Zheng-yi[2]

1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China
2. Guizhou Institue for Food and Drug Control, Guiyang 550004, China
3. Guiyang Xintian Pharmaceutical Stock Co., Ltd., Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To study the content difference of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, and paeoniflorin in Wujiwan traditional decoction, granule prescription, and compound granule using HPCE internal standard method. **Methods** Capillary zone electrophoresis (CZE) method was used for a complete separation of the components, which was achieved with 50 mmol/L borax buffer-methanol (2∶1), constant voltage of 25 kV, pressure injection 5 kPa × 15 s, electrolyle sealing 5 kPa × 10 s, and column temperature of 15 ℃. **Results** The capillary electrophoresis method is simple and accurate. The contents of the three alkaloids in the granule prescription were obviously higher than those in traditional decoction and compound granule. **Conclusion** This method is instructive for clinical application and quality control of Wujiwan prescription and compound granule.

Key words: Wujiwan; capillary electrophoresis; traditional decoction; granule prescription; compound granule; internal standard method; berberine hydrochloride; palmatine hydrochloride; jatrorrhizine hydrochloride; paeoniflorin

戊己丸最早见于宋代刘昉《幼幼新书》卷二十六，引《养生必用》（已遗）之方，现代临床上常用于治疗肠易激综合症、消化性溃疡等消化系统疾病[1]。近代研究发现单味中药配方颗粒剂与传统汤剂的化学组成虽然主要药效物质种类相近，但其量和部分药效往往有较大的差别，药效实验也显示二者有差异，可能影响其临床疗效，从而影响单味中药配方颗粒剂在临床上的推广应用。其原因可能主要是单味中药配方颗粒剂的制备采用分煎形式，传统汤剂多采用合煎方式导致的[2]。

收稿日期：2014-02-19

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30860364）；贵阳市科技局项目：2012 现代药业计划（筑科合同[2012204]44 号）

作者简介：宋晓宁（1969—），女，本科，副主任药师，从事中药研究。E-mail: songxiaoning1215@163.com

***通信作者** 靳凤云（1954—），女，教授，硕士研究生导师，研究方向为中药质量控制与新药开发。E-mail: gyjfy01@163.com

从理论上推测，中药复方颗粒与传统汤剂由于均采用合煎的方法制备，其药效物质组成、质量分数、药效和临床疗效方面应有更好的相似性，在临床上推广应有较好的前景[3-6]。目前，未见有运用 HPCE 法对戊己丸配方颗粒、复方颗粒、传统汤剂之间有效成分测定比较的相关报道。本实验运用 HPCE 技术对中药经方戊己丸配方颗粒、复方颗粒、传统汤剂之间有效成分差异情况进行比较，为进一步深入研究奠定基础。

1　仪器与材料

HPCE-3D 高效毛细管电泳仪（安捷伦公司），DAD 检测器，安捷伦化学工作站，自动进样器；AE—240 双量程电子分析天平，量程：万分之一和十万分之一两档（梅特勒-托利多上海有限公司）。

甲醇为色谱纯，水为娃哈哈纯净水，硼砂为基准试剂。对照品盐酸小檗碱（批号 110713-200609，质量分数 86.7%）、盐酸药根碱（批号 733-9203，质量分数 90.3%）、盐酸巴马汀（批号 110732-200506，质量分数 86.6%）、芍药苷（批号 110736-200320，质量分数 94.9%）、龙胆苦苷（批号 110770-200611，质量分数 99.1%）均购自中国食品药品检定研究院。

实验用药材均购自贵阳圣济堂药业有限公司，经贵阳中医学院王祥培教授鉴定，吴茱萸（产地贵州，批号 20081101）为芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth 的干燥近成熟果实、白芍（产地安徽，批号 20090301）为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。黄连（产地四川，批号 20090301）为毛茛科植物黄连 *Coplis chinensis* Franch. 的干燥根茎。按照《中国药典》方法检测，药材均为符合《中国药典》2010 年版的规定品种。

2　方法与结果

2.1　毛细管电泳条件

采用 50 μm×74.7 cm 的空心石英毛细管柱，有效长度 66.4 cm（河北永年锐沣色谱件有限公司）；DAD 检测器，盐酸小檗碱、巴马汀、药根碱、芍药苷检测波长为 230 nm，50 mmol/L 的硼砂缓冲液-甲醇（2∶1）的溶液作为缓冲液；工作电压为 25 kV，压力进样 5 kPa×15 s，电解质封口：5 kPa×10 s；柱温 15 ℃；每次进样前用缓冲液冲柱 10 min。进样结束后用水冲 15 min，甲醇冲 15 min。

2.2　供试品溶液的制备

2.2.1　配方颗粒（浸膏）汤剂的制备　精密称取由黄连、白芍（炒）和吴茱萸（制）的单味浸膏按折合量配制的戊己丸配方浸膏粉（表 1）约 1.43 g，加 80～100 ℃水溶解，冷却后定容至 100 mL，精密量取 2.5 mL 置 5 mL 量瓶中，加入甲醇至刻度，称定质量，超声提取 20 min，放冷，用甲醇补足损失质量，滤过，取续滤液，精密量取 0.5 mL 置 1 mL 量瓶中，加入 0.2 mL 龙胆苦苷内标，0.2 mL 水，用 50%甲醇溶液定容至刻度。0.22 μm 微孔滤膜滤过，精密量取 0.5 mL 置毛细管电泳样品瓶中，即得配方颗粒汤剂供试品溶液。

2.2.2　传统汤剂及复方颗粒剂（浸膏）的制备　精密称取黄连 60 g、白芍 60 g 和吴茱萸（制）10 g，加 6 倍量水（约至液面 3 cm）浸泡 20 min，煎煮 3 次，每次微沸 30 min，合并煎液，300 目尼龙纱布滤过，定容至 1 500 mL。精密量取 100 mL 为传统汤剂，传统汤剂提取方法同“2.2.1”项下，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得传统汤剂供试品溶液。其余部分常压浓缩至相对密度为 1.1～1.2（25 ℃），减压干燥（60 ℃）成浸膏（表 2），粉碎，取 1.5 g 加 80～100 ℃水溶解，冷却后定容至 100 mL，复方颗粒剂（浸膏）提取方法同“2.2.1”项下，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得复方颗粒汤剂供试品溶液。

表 1　戊己丸配方颗粒剂处方取样量 (n=10)

Table 1　Sampling volume of Wujiwan granule prescription (n=10)

药材名称	称样量 / g	浸膏量 / g	每克原药材相当于干浸膏粉的量 / g	各处方中所需的干浸膏粉量 / g	混合后配方颗粒剂取样量 / g
黄连	60	7.90	0.13	0.786 4	1.43
白芍（炒）	60	10.15	0.17	1.014 2	
吴茱萸（制）	10	3.46	0.34	0.345 5	

复方汤剂、颗粒剂与原药材比例见表 2。

2.3　阴性样品的制备

按“2.2.2”项下复方颗粒剂（浸膏）汤剂的制备方法分别制备缺黄连、缺白芍、缺制吴茱萸的阴性样品。

表 2 戊己丸传统汤剂与复方颗粒剂处方取样量

Table 2 Sampling volumes of Wujiwan traditional decoction and compound granule

药材名称	传统汤剂 / mL	浸膏量 / g	每毫升药液相当于处方药材量 / g	每克浸膏粉相当于原处方药材的量 / g	配制 100 mL 复方颗粒汤剂需取样复方浸膏 / g
黄连 60 g 白芍（炒）60 g 吴茱萸（制）10 g	100	20.90	0.087	5.8	1.5

2.4 对照品溶液的制备

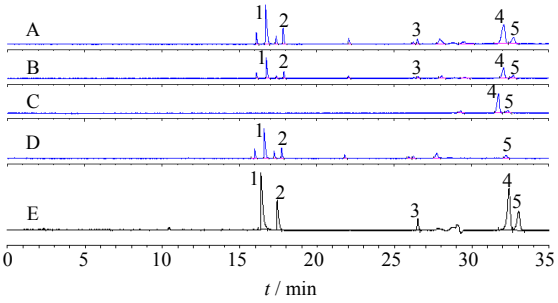
精密称取盐酸小檗碱 11.80 mg、盐酸巴马汀 12.22 mg、盐酸药根碱 9.97 mg、芍药苷 9.68 mg 置 25 mL 量瓶中，龙胆苦苷对照品精密称定 56.37 mg 置 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，即得。

2.5 线性关系考察

分别精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷对照品，加甲醇分别制成质量浓度分别为 472.0、488.8、398.8、387.2 μg/mL 的溶液，龙胆苦苷为内标物，精密称定，制成质量浓度为 563.7 μg/mL 的溶液，再分别精密吸取盐酸小檗碱、盐酸巴马丁、盐酸药根碱、芍药苷对照品溶液各 1 mL 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中，得混合对照品溶液，精密吸取混合对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 与 0.2 mL 龙胆苦苷内标溶液于 7 个 1 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得一系列质量浓度梯度，分别精密吸取每个质量浓度的对照品溶液 0.5 mL 于 6 个样品小瓶中。另取 387.2 μg/mL 的芍药苷溶液同法处理，按“2.1”项下的电泳条件进行电泳分离测定。以对照品与内标物峰面积之比为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，得回归方程：盐酸小檗碱 Y=22.359 X+0.096 9，r=0.999 6，线性范围 9.440～37.760 μg；盐酸巴马汀 Y=16.9 X+0.078 8，r=0.999 6，线性范围 9.776～39.104 μg；盐酸药根碱 Y=32.938 X+0.017 4，r=0.999 7，线性范围 7.976～31.904 μg；芍药苷 Y=13.549 X+0.383 3，r=0.999 5，线性范围 7.744～30.976 μg。

2.6 系统适应性考察

吸取戊己丸复方颗粒汤剂、阴性汤剂样品注入毛细管电泳仪，从色谱图（图 1）中可见，盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱的保留时间（t_R）分别约为 16、17、28 min，芍药苷的 t_R 约为 32 min。阴性样品图谱在盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷位置处无假阳性峰，内标物对待测成分无影响，即本实验条件内标物、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷与其他组分分离完全，分离度大于 1.5，理论塔板数按盐酸小檗碱计算为 130 393，按盐酸药根碱计算为 543 778，按盐酸巴马汀计算为 348 781，按芍药苷计算为 97 025。



A-戊己丸汤剂样品图谱 B-吴茱萸（制）阴性图谱 C-黄连阴性图谱 D-白芍阴性图谱 E-对照品图谱 1-盐酸小檗碱 2-盐酸巴马汀 3-盐酸药根碱 4-芍药苷 5-龙胆苦苷（内标）

A-Wujiwan traditional decoction B-*E. rutaecarpa* blank test C-*C. chinensis* blank test D-*P. lactiflora* blank test E-reference 1-berberine hydrochloride 2-palmatine hydrochloride 3-jatrorrhizine hydrochloride 4-paeoniflorin 5-gentiopicroside internal standard

图 1 戊己丸系统适应性试验

Fig. 1 System suitability test of Wujiwan

2.7 日间与日内精密度试验

在样品小瓶中精密加入供试品溶液，用待测物与内标物峰面积之比计算精密度，6 次测定结果为日内精密度。取同一份供试品溶液每日进样 3 次，连续进样 2 d，计算总精密度，为日间精密度。结果日内精密度中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷峰面积与内标物峰面积之比的 RSD 分别为 1.45%、1.90%、1.27%、1.86%。日间精密度中的 RSD 分别为 2.04%、2.45%、1.71%、2.58%。

2.8 稳定性试验

在 0、3、6、9、12、24 h 分别对同一戊己丸汤剂供试品溶液进行电泳分离，测定各盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷峰面积与内标物的比值，结果盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根

碱、芍药苷峰面积与内标物峰面积之比的 RSD 分别为 2.81%、2.71%、2.98%、2.18%，24 h 内 RSD 均＜3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9　重复性试验

精密量取戊己丸复方中药颗粒汤剂 6 份，置 10 mL 量瓶中，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样测定，结果盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷质量分数的 RSD 分别为 1.53%、1.27%、2.12%、2.73%，均＜3%，表明本方法重复性良好。

2.10　加样回收率试验

精密量取已测定的戊己丸复方中药颗粒汤剂 9 份，每份 2.5 mL，分别置 10 mL 量瓶中，精密加入 3 个不同质量浓度的对照品溶液，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，结果盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、芍药苷的平均回收率分别为 96.77%、100.20%、97.84%、96.63%，RSD 分别为 2.90%、2.75%、1.67%、2.32%。表明本法测定中药复方颗粒汤剂具有较好的加样回收率。

2.11　样品测定

分别精密量取戊己丸传统汤剂 5 mL、戊己丸复方中药颗粒和戊己丸配方颗粒适量（与传统汤剂 5 mL 相当），按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果见表 3。

表 3　戊己丸汤剂样品定量测定结果 ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

Table 3　Quantitative determination of Wujiwan decoction ($\bar{x}$ ±*s*, *n* = 3)

剂型	质量分数 / (mg·g^{-1})			
	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	盐酸药根碱	芍药苷
传统汤剂	5.37±2.00	1.73±1.66	0.31±2.25	9.72±2.44
复方颗粒剂	4.54±1.32	1.44±1.68	0.31±2.02	8.11±0.50
配方颗粒剂	7.99±2.10	2.55±1.49	0.49±1.73	8.32±2.39

3　讨论

由于目前的 HPCE 进样方法尚不成熟，实验中由于进样量与进样方式不同，容易引起数据偏差，因此使用内标法进行定量，可减小由于仪器稳定性差及进样不准确等而引起的误差。

根据已有的文献和研究表明，黄连中生物碱具有抗菌、抗幽门螺旋杆菌感染、止泻的效果，而吴茱萸中的生物碱类成分又有保护胃黏膜、抗胃黏膜损伤等作用，白芍中的没食子酸、芍药苷类成分具有抗炎保肝的功效，本实验所研究的化学成分在不同汤剂中的变化：黄连中生物碱类成分在传统汤剂小于配方颗粒剂，芍药苷成分在传统汤剂中略有上升，体现出戊己丸传统疗效中肝火犯胃、肝脾不和的中医基础理论机制，及其治疗泄泻、呕吐吞酸、胃脘灼热疼痛等病症的药效物质基础。

实验结果表明，复方颗粒剂、配方颗粒剂与传统汤剂的化学组成接近，均可用于临床，复方颗粒剂的有效成分量与传统汤剂更接近，进一步证明了复方颗粒剂应用于临床的合理性。

参考文献

[1] 太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.

[2] 姚焕英, 赵宁侠, 史恒军, 等. 配方颗粒剂临床利弊点滴谈 [J]. 现代中医药, 2006, 26(1): 66.

[3] 邓轶渊, 高文远, 陈海霞, 等. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1909-1910.

[4] 戎玲勤, 徐　鲑. 中药配方颗粒临床使用评价 [J]. 中医临床杂志, 2007, 19(1): 57-58.

[5] 周嘉琳. 试论发展中药配方颗粒的重要意义 [J]. 中医杂志, 2007, 48(2): 177-178.

[6] 刘丽娜, 邱家学. 对中药配方颗粒发展的思考 [J]. 上海医药, 2006, 27(10): 444-445.