

双波长 RP-HPLC 同时测定龙砂颗粒中 7 种成分

瞿 燕¹, 李春雪¹, 曾 锐^{2*}, 任桂友², 张 晨¹

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 建立同时测定龙砂颗粒中黄柏碱、芦丁、黄芩苷、黄芩素、盐酸小檗碱、槲皮素、苍术素 7 种成分的 RP-HPLC 方法。方法 采用全时段双波长 RP-HPLC, Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.02%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长为 205 nm (黄柏碱、芦丁、黄芩苷、黄芩素、槲皮素) 和 340 nm (盐酸小檗碱、苍术素)。结果 黄柏碱、芦丁、黄芩苷、黄芩素、盐酸小檗碱、槲皮素、苍术素分别在 0.011~0.168 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.010~0.160 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.053~0.842 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.014~0.228 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.016~0.266 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.009~0.144 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.002~0.024 mg/mL ($r=0.999\ 7$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.83%、100.09%、99.98%、99.54%、100.14%、99.67%、100.06%, RSD 分别为 1.9%、2.6%、3.7%、2.4%、2.1%、1.8%、3.2%。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可用于龙砂颗粒的质量控制。

关键词: RP-HPLC; 龙砂颗粒; 黄柏碱; 芦丁; 黄芩苷; 黄芩素; 盐酸小檗碱; 槲皮素; 苍术素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0221-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.013

Simultaneous determination of seven constituents in Longsha Granules by dual-wavelength RP-HPLC

QU Yan¹, LI Chun-xue¹, ZENG Rui², REN Gui-you², ZHANG Chen¹

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Institute of Ethnic Medicine, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish the RP-HPLC method for the simultaneous determination of phellodendrine, rutin, baicalin, baicalein, berberine hydrochloride, quercetin, and atracylodin in Longsha Granules. **Methods** The seven components were measured on a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) of Kromasil with a gradient elution of acetonitrile-0.02% phosphoric acid solution at the wavelengths of 205 nm (phellodendrine, rutin, baicalin, baicalein, and quercetin) and 340 nm (berberine hydrochloride and atracylodin), a flow rate of 1.0 mL/min, and the column temperature of 30 ℃. **Results** Phellodendrine, rutin, baicalin, baicalein, berberine hydrochloride, quercetin, and atracylodin showed a good correlation in the ranges of 0.011—0.168 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.010—0.160 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.053—0.842 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.014—0.228 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.016—0.266 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.009—0.144 mg/mL ($r=0.999\ 9$), and 0.002—0.024 mg/mL ($r=0.999\ 7$). The average recovery rates were 99.83%, 100.09%, 99.98%, 99.54%, 100.14%, 99.67%, and 100.06%. The RSD were 1.9%, 2.6%, 3.7%, 2.4%, 2.1%, 1.8%, and 3.2%. **Conclusion** The method is simple, accurate, and excellent repetition, and can be used to control the quality of Longsha Granules.

Key words: RP-HPLC; Longsha Granules; phellodendrine; rutin; baicalin; baicalein; berberine hydrochloride; quercetin; atracylodin

糖尿病 (diabetic mellitus, DM) 是一种常见的、严重危及人类健康的全身性慢性代谢性疾病, 且糖尿病的发生、发展往往伴随多种并发症^[1]。其中高尿酸血症是一种嘌呤代谢障碍性疾病, 并与糖尿病

相互影响, 糖尿病可导致高尿酸血症, 高尿酸血症可诱发 II 型糖尿病^[2]。目前, 高尿酸血症的发病逐年上升且呈低龄化趋势。研究和开发高效低毒作用的糖代谢酶调节剂来有效预防和治疗糖尿病及其并

收稿日期: 2014-08-22

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BA127B07); 四川省科技厅科技支撑项目 (2011SZ0071)

作者简介: 瞿 燕 (1976—), 女, 博士, 副教授, 主要从事中药新制剂与新剂型的研究。Tel: (028)61800231 E-mail: quyan028@126.com

*通信作者 曾 锐 (1976—), 男, 博士, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药的研究。Tel: (028)85522315 E-mail: Mackzeng@gmail.com

发症是现代医药学及生命科学界重点和难点研究课题之一。中药复方在治疗糖尿病等慢性疾病方面的研究报道很多,也显示其独特的优势,如降血糖作用温和持久、疗效稳定、副作用小等。龙砂颗粒为成都中医药大学附属医院在研的一种颗粒剂,由黄芩、苍术、黄柏、黄连等9味中药组成,具有清热利湿、活血祛毒的功效。处方原为该医院临床经验方,主要用于糖尿病合并高尿酸血症的治疗,经长期临床使用效果良好。汤剂虽能临证加减,但对于慢性病患者存在配方、煎煮、携带不方便等问题,故而将该方进行了制剂学研究,制备为颗粒剂^[3]。方中黄芩、黄连和黄柏是临床中的常用配伍药对,所含主要成分黄芩苷、黄芩素、盐酸小檗碱、黄柏碱、芦丁、槲皮素等不仅可以降低血糖,还能改善糖尿病并发症^[4-6],且临床上运用苍术,具有健脾、燥湿、解郁、辟秽的功效,与黄柏组成二妙系列方治疗高尿酸血症取得了明显的疗效^[7]。研究表明,中药降糖活性成分主要有生物碱类、黄酮类、皂苷类、酚类等^[8-9]。本研究通过建立一种双波长RP-HPLC 梯度洗脱法同时测定黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、槲皮素、黄芩素、苍术素7种成分,以期更好地控制龙砂颗粒的质量,确保临床应用安全有效。

1 仪器与材料

Waters-2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司,包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、2996 型二极管阵列检测器和 Empower 色谱工作站;KQ5200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Mettler AE240S 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、黄芩素、苍术素对照品,均购于成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为 121120、121023、130829、121128、130119、130216,质量分数均大于 98%;槲皮素对照品,四川省维克奇生物技术有限公司,批号为 110627,质量分数大于 98%。色谱纯乙腈,欧森巴克;分析纯甲醇、磷酸,成都市科龙化工试剂厂;水为纯化水。龙砂颗粒样品,批号 130901、130902、130903、131201、131202、131203;规格 15 g/袋,由成都中医药大学附属医院制剂室制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相为乙腈-0.02%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~8 min, 15%~25%乙腈;8~10 min, 25%~30%乙腈;10~25 min, 30%~35%乙腈;25~30 min, 35%~73%乙腈;30~45 min, 73%~90%乙腈;柱温 30 ℃;黄柏碱、芦丁、黄芩苷、黄芩素、槲皮素的检测波长 205 nm, 盐酸小檗碱、苍术素的检测波长为 340 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、槲皮素、黄芩素、苍术素各对照品适量,精密称定,置于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶液配制成含黄芩苷 0.842 mg/mL、黄柏碱 0.168 mg/mL、盐酸小檗碱 0.266 mg/mL、黄芩素 0.228 mg/mL、芦丁 0.160 mg/mL、苍术素 0.024 mg/mL、槲皮素 0.144 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取龙砂颗粒(批号 130901) 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 20 mL,称定质量,超声(功率 250 W, 频率 40 kHz)处理 20 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品溶液。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 按龙砂颗粒的处方和制备工艺制得不加黄芩、黄柏、黄连、苍术的阴性对照品样品,按“2.2.2”项下方法制备得阴性供试品溶液。

2.3 专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液各 10 μL,按“2.1”项下色谱条件进行测定,结果样品中黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、槲皮素、黄芩素、苍术素色谱峰的保留时间与对照品一致,7 种成分分离度良好,并且阴性供试品对预测成分测定无干扰,色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

取上述混合对照品储备溶液,分别加甲醇稀释成不同质量浓度的对照品溶液,得黄柏碱的质量浓度分别为 0.168、0.084、0.042、0.021、0.011 mg/mL,芦丁的质量浓度分别为 0.160、0.080、0.040、0.020、0.010 mg/mL,黄芩苷的质量浓度为 0.842、0.421、0.211、0.105、0.053 mg/mL,槲皮素的质量浓度为 0.144、0.072、0.036、0.018、0.009 mg/mL,黄芩素的质量浓度分别为 0.228、0.114、0.057、0.028、0.014 mg/mL,盐酸小檗碱的质量浓度分别为 0.266、0.133、0.066、0.033、0.016 mg/mL,苍术素的质量

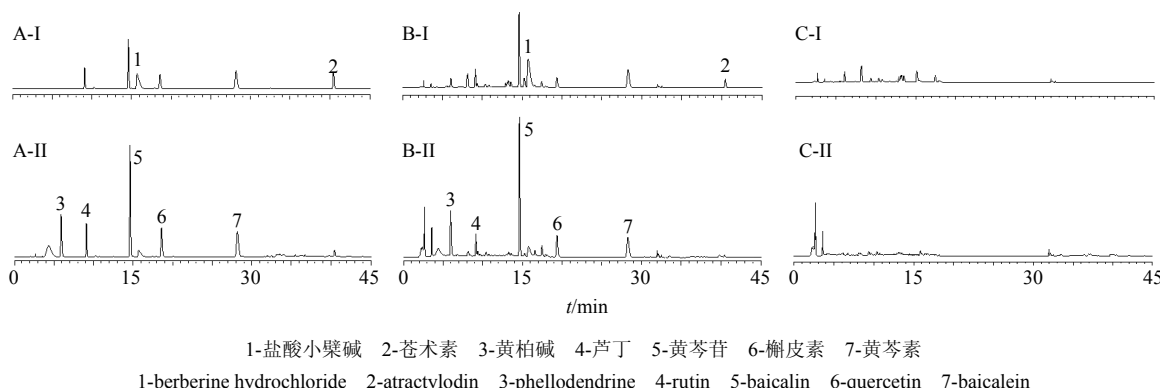


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B)、阴性供试品 (C) 在 340 nm (I) 和 205 nm (II) 处 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), samples (B), and negative samples (C) at 340 nm (I) and 205 nm (II)

浓度分别为 0.024、0.012、0.006、0.003、0.002 mg/mL。精密吸取各混合对照品溶液 10 μ L，按“2.1”项下方法测定，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品的质量浓度为横坐标 (X) 绘制回归曲线，进行线

性回归，得到回归方程和相关系数 (r)；吸收信号为噪音信号 10 倍时的进样量确定为定量限，吸收信号为噪音信号 3 倍时的进样量确定为检测限，结果见表 1。

表 1 7 种成分的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of seven constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
黄柏碱	$Y=5.2 \times 10^7 X+1.8 \times 10^6$	0.999 9	0.011~0.168	0.683	2.239
芦丁	$Y=3.3 \times 10^7 X+7.8 \times 10^5$	0.999 9	0.010~0.160	0.436	1.635
黄芩苷	$Y=2.5 \times 10^7 X+3.3 \times 10^6$	0.999 9	0.053~0.842	0.012	0.054
盐酸小檗碱	$Y=2.0 \times 10^7 X+6.4 \times 10^5$	0.999 8	0.016~0.266	0.233	0.842
槲皮素	$Y=5.4 \times 10^7 X+1.4 \times 10^6$	0.999 9	0.009~0.144	0.145	0.615
黄芩素	$Y=5.1 \times 10^7 X+1.3 \times 10^6$	0.999 8	0.014~0.228	0.369	1.211
苍术素	$Y=1.1 \times 10^8 X+3.5 \times 10^5$	0.999 7	0.002~0.024	0.562	1.942

2.5 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液 10 μ L，连续进样 6 次，按“2.1”项下色谱条件下进行测定，计算黄柏碱、芦丁、黄芩苷、槲皮素、黄芩素、盐酸小檗碱、苍术素峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.58%、0.40%、0.52%、0.63%、1.01%、0.60%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号 130901)，分别于配制后 0、1、2、4、8、12、24、36、48 h，按“2.1”项下方法测定。黄柏碱、芦丁、黄芩苷、槲皮素、黄芩素、盐酸小檗碱、苍术素峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.45%、0.76%、0.44%、1.47%、0.50%、0.65%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取龙砂颗粒 (批号 130901)，按“2.2.2”项下

方法制备样品溶液 6 份，按“2.1”项下方法测定，计算黄柏碱、芦丁、黄芩苷、槲皮素、黄芩素、盐酸小檗碱、苍术素质量分数的 RSD 分别为 1.69%、2.28%、1.37%、3.42%、2.29%、1.46%、1.54%，表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已测定的龙砂颗粒样品 (批号 130901) 9 份，每份约 0.5 g，精密称定，按对照品加入量为样品中质量分数的 80%、100%、120% 分别精密加入黄柏碱 5.83 mg/mL、芦丁 4.22 mg/mL、黄芩苷 29.05 mg/mL、槲皮素 4.34 mg/mL、黄芩素 7.156 mg/mL、盐酸小檗碱 8.35 mg/mL、苍术素 0.288 mg/mL 对照品适量，按照“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液，以“2.1”项下方法测定，结果黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、槲皮素、黄芩素、苍术素的平均回收率分别为 99.83%、100.09%、99.98%、100.14%、

99.67%、99.54%、100.06%，RSD 分别为 1.9%、2.6%、3.7%、2.4%、1.8%、2.1%、3.2%。

2.9 样品定量测定

取 6 批龙砂颗粒样品（批号 130901、130902、130903、131201、131202、131203），每个样品平

行 2 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品，按“2.1”项下色谱条件分别进行测定，根据标准曲线回归方程计算得出各个批次龙砂颗粒中的黄柏碱、芦丁、黄芩苷、槲皮素、黄芩素、盐酸小檗碱、苍术素 7 种成分的量，结果见表 2。

表 2 6 批样品中 7 种成分的定量测定 ($n=2$)

Table 2 Determination of seven constituents in six batches of samples ($n=2$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	黄柏碱	芦丁	黄芩苷	槲皮素	黄芩素	盐酸小檗碱	苍术素
130901	1.508	1.091	7.299	1.116	1.777	2.162	0.069
130902	1.412	1.043	6.941	1.147	1.779	2.105	0.074
130903	1.435	1.051	7.546	0.982	1.792	2.002	0.075
131201	1.389	0.967	6.937	1.017	1.672	2.025	0.064
131202	1.446	1.013	7.118	1.025	1.658	1.911	0.071
131203	1.491	0.915	7.112	0.996	1.703	2.057	0.068

3 讨论

3.1 样品处理方法的筛选

本实验考察了超声提取法的溶剂、超声时间、超声温度等因素对样品提取的影响，结果表明超声提取的温度与时间对样品成分的提取影响不大。水提液中强极性组分较多，不适宜用反相色谱柱进行分离检测，而甲醇提取的样品成分色谱峰信息大，各个成分能很好地分离，故采用甲醇超声提取法处理样品。

3.2 色谱条件的筛选

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水系统，结果发现乙腈-水系统干扰较小且分离效果较好，分析时间短，且梯度洗脱过程中基线平稳，因此选择乙腈-水系统。为了改善峰形，把流动相调整为弱酸性，提高分离度。本实验考察了在水相中添加 0.02%、0.05%、0.1% 的磷酸溶液，结果发现 0.02% 的磷酸溶液可以达到改善峰形、提高分离度的效果，且较低浓度的酸溶液有利于保护色谱柱，因此选用 0.02% 磷酸溶液。此外，对柱温、体积流量、进样量等色谱参数进行优化最终确定色谱条件。

3.3 波长的确定

通过 PDA 检测器对龙砂颗粒色谱图进行紫外全波长（190~700 nm）扫描，结果发现检测波长为 205 nm 处黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、黄芩素、槲皮素、苍术素 7 种成分均有吸收。黄柏碱、芦丁、槲皮素均是在 205 nm 处是最大吸收，但苍术素吸收有干扰。在 340 nm 盐酸小檗碱与苍

术素是最大吸收，但其他成分吸收小，且黄柏碱无吸收。黄芩苷、黄芩素在 275 nm 处有最大吸收，其次在 205 nm 处较 340 nm 吸收更好。因此，选择 205 nm 为黄柏碱、芦丁、黄芩苷、黄芩素、槲皮素的检测波长，340 nm 为盐酸小檗碱与苍术素的检测波长。

3.4 定量测定指标成分的选择

本处方中，苍术、黄柏同用，取二妙散之意，二药合用共奏健脾燥湿、清热之功。根据中医药理论，再结合黄芩、黄连、砂仁、地龙等 7 味中药，经临床验证对糖尿病合并高尿酸血症疗效确切。对于龙砂颗粒质量标准的建立，因芦丁和槲皮素是常见的黄酮类成分，通过对芦丁和槲皮素的定量测定可以较好地控制制剂质量的稳定性；而黄柏碱、黄芩苷、黄芩素、盐酸小檗碱、苍术素均为方中黄柏、黄芩、黄连、苍术素的代表性活性成分，为本方治疗糖尿病及并发症的主要活性成分，且均可采用 HPLC 法测定，因此选择上述 7 种成分作为龙砂颗粒质量控制中定量测定的指标成分。

本实验建立了全时段双波长 RP-HPLC 同时测定龙砂颗粒中黄柏碱、芦丁、黄芩苷、盐酸小檗碱、黄芩素、槲皮素、苍术素 7 种成分定量测定的方法。经实验验证，该方法操作简便，准确，重复性好，可以用于控制龙砂颗粒的质量。

参考文献

- [1] 邓远雄, 杨昌华, 年玲丽. 黄连解毒汤中黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠体内的药动学 [J]. 中草药, 2008,

- 39(2): 227-229.
- [2] 蔡丰穗, 陈进杰, 梁福贵. 开郁清热法结合降尿酸汤治疗Ⅱ型糖尿病合并高尿酸血症的临床研究 [J]. 中国当代医药, 2013, 20(14): 232-235.
- [3] 曾 锐, 任桂友, 王 爽, 等. 星点设计-效应面法优选复方龙砂颗粒成型工艺 [J]. 中药材, 2013, 36(8): 1347-1350.
- [4] Tang L Q, Wei W, Chen L M, *et al.* Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat / high-cholesterol diet in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(1): 109-115.
- [5] 董二会, 王爱国, 杨建波, 等. 川黄柏抗糖尿病活性部位化学成分研究 [J]. 中药材, 2012, 35(9): 1441-1443.
- [6] 邹晨辉, 申竹芳. 黄连生物碱抗糖尿病机制的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(11): 附 2-附 5.
- [7] 史学军, 张立群. 二妙丸与四妙丸的组方及临床合理应用 [J]. 药物不良反应杂志, 2005(6): 427.
- [8] 张 辛. 抗糖尿病生物碱类成分研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2013(17): 19-20.
- [9] 李 丹, 彭 成, 谢晓芳. 黄酮类化合物治疗糖尿病及其并发症的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 11(20): 239-242.