

超高效液相-二极管阵列法同时测定 马陆黄仙合剂中 5 个成分的含量

边梦瑒¹, 刘小花¹, 张 海¹, 韩正君¹, 李 萍¹, 周永茂², 封士兰¹

(1. 兰州大学 药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 临夏州中医药研究所, 甘肃 临夏 731100)

摘要: 建立了超高效液相-二极管阵列(UPLC-DAD)同时测定马陆黄仙合剂中 5 种成分的方法. 采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(Φ 1.7 μm, 100 mm×2.10 mm), 甲醇和体积分数为 1% 的醋酸水溶液按不同比例梯度洗脱, 流速 0.61 mL/min, 检测波长采用定制波长(0~3 min, 232 nm; 3~7 min, 274 nm; 7~10 min, 249 nm). 一次进样, 同时测定了马陆黄仙合剂中芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的含量. 在测定条件下线性关系良好(r 为 0.999 1~0.999 9), 平均回收率为 99.70%~100.70%. 方法简便、准确、可靠、重复性好, 可用于马陆黄仙合剂中 5 个有效成分的同时测定, 也可用于该制剂的质量控制.

关键词: 马陆黄仙合剂; 超高效液相-二极管阵列; 芍药苷; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 甘草酸铵

中图分类号: O657.7

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2015)04-0250-07

马陆黄仙合剂用于治疗胃肠道疾病尤其溃疡性结肠炎效果良好^[1-5]. 该合剂是由宽跗马陆、黄芩、仙鹤草、白芍和甘草等几味中药组成. 宽跗马陆为动物药, 其含有的壳聚糖具有抑制幽门螺杆菌和促进溃疡愈合的作用^[6-9]. 仙鹤草有治疗消化系统疾病的作用^[10]. 黄芩汤有效成分对方对大鼠实验性溃疡性结肠炎的免疫调节作用^[11], 黄芩苷和汉黄芩素对结肠癌和胃癌细胞均有抑制作用^[12-13]. 白芍总苷对实验性 UC 大鼠的结肠粘膜炎症状态有一定的治疗作用^[14-15]. 甘草酸也具有明确的抗溃疡作用^[16]. 由此可见, 马陆黄仙合剂具有良好的临床疗效, 因此建立一种全面控制其质量的方法, 可以为甘肃省临夏州中医药研究所将其开发为医疗机构制剂提供技术支持.

黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芍药苷和甘草酸为黄芩、白芍和甘草的指标性成分. 本文采用乙醇超声提取样品, 采用超高效液相-二极管阵列(UPLC-DAD)法测定, 各化合物使用定制波长的数据处理, 实现了一次进样同时测定马陆黄仙合剂中 5 种化学

成分的含量, 建立了该制剂的质量控制方法. 同时, 该方法简化了检测的操作过程.

1 试验部分

1.1 仪器

Waters 超高效液相色谱仪, Waters ACQ-QSM 型四元泵, Waters ACQ-FTN 型自动进样器, Waters ACQ-PDA 检测器, Empower³ 色谱工作站; KQ3200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BS224S 型电子分析天平(十万分之一, 德国 Sartorius 赛多利斯).

1.2 试剂

对照品芍药苷(批号为 110736-201337)、黄芩苷(批号为 110715-201318)、汉黄芩素(批号为 111514-201304)、黄芩素(批号为 111595-201306)和甘草酸铵(批号为 110731-201317)均购于中国药品生物制品检定所, 纯度大于 98%, 供质量浓度测定用. 马陆黄仙合剂的 3 批小试样品由本实验室自制, 3 批中试样品由甘肃省临夏州中医药研究所制

收稿日期: 2015-08-27; 修订日期: 2015-10-28

基金项目: 甘肃省中医药科研课题(czk-2012-18); 中央高校基本科研业务费专项资金(No. lzujbky-2015-59)

作者简介: 边梦瑒(1987-), 硕士研究生, 主要研究方向为中药制剂分析, Tel: 0931-8915685, E-mail: huntrel23@126.com.

通信作者: 封士兰, 教授, 博导, 《分析测试技术与仪器》第七届编委, 主要研究方向为中药中化学成分分离分析, Tel: 0931-8915686, E-mail: fengshl@Lzu.edu.cn.

备(批号为 20140401、20140402、20140403)。

甲醇(德国默克)均为色谱纯;水为超纯水。其余试剂均为分析纯。

1.3 色谱条件

色谱柱: Waters BEH C₁₈ 色谱柱(Φ1.7 μm, 100 mm×2.10 mm);流动相为甲醇和体积分数为 1% 的醋酸水溶液,梯度洗脱,洗脱程序如下表 1 所列。进样量:1 μL;柱温 30 ℃;检测波长为定制波长(0~3 min, 232.1 nm; 3~7 min, 274.8 nm; 7~10 min, 249.8 nm)。

表 1 色谱条件			
Table 1 Conditions of gradient elution			
时间 /min	流速 /(mL/min)	A /甲醇	B /醋酸水*
0	0.61	20	80
2.04	0.61	53	47
3.40	0.61	61.5	38.5
4.08	0.61	70	30
5.44	0.61	100	0
6.8	0.61	100	0
6.94	0.61	20	80
10	0.61	20	80

*:体积分数为 1%。

1.4 供试品溶液的制备

取马陆黄仙合剂 10 mL,精密吸取,置 50 mL 容量瓶中,精密加入水 5 mL 和无水乙醇 35 mL,称定重量,超声 30 min,放冷,再称定重量,用体积分数为 70% 的乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。用微孔滤膜(0.22 μm)过滤后备用。

1.5 对照品溶液的制备

精密称取芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵对照品,分别加甲醇制成 0.562、0.518、0.305、0.353 和 0.283 mg/mL 的混合对照品储备液,备用。

1.6 阴性对照溶液的制备

黄芩阴性:取除黄芩药材,其余中药材按本处方量制成阴性对照品,依样品溶液的配制同法制得黄芩阴性对照溶液。

甘草阴性:取除甘草药材,其余中药材按本处方量制成阴性对照品,依样品溶液的配制同法制得甘草阴性对照溶液。

白芍阴性:取除白芍药材,其余中药材按本处方量制成阴性对照品,依样品溶液的配制同法制得白芍阴性对照溶液。

1.7 测试

将各对照品溶液与供试品溶液过滤至自动进样瓶中,设置进样量为 1 μL,按照“1.3”色谱条件进行样品检测,测定得到各化合物的峰面积,按照标准曲线计算含量。

不同时段选不同波长方法为:调出仪器方法-找到衍生通道-点右键-新建衍生通道-点通道下的三角-找到 PDA 定时波长-设定时间和波长-保存即可。

2 结果与讨论

2.1 线性关系

分别取“1.5”节对照品储备液,用甲醇逐级稀释成一系列不同质量浓度的对照品溶液,进样 1 μL 测定。以芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,各回归方程呈良好的线性关系。结果如表 2 所列。

表 2 对照品的回归方程			
Table 2 Regression equations of reference substances			
对照品	回归方程	r	线性范围/μg
芍药苷	$Y=1.4\times10^5X-19\ 000$	0.999 1	0.562~16.86
黄芩苷	$Y=3.5\times10^5X-65\ 000$	0.999 9	0.581~15.54
黄芩素	$Y=6.2\times10^5X-60\ 000$	0.999 9	0.305~9.15
汉黄芩素	$Y=6.6\times10^5X-48\ 000$	0.999 5	0.353~8.825
甘草酸铵	$Y=5.4\times10^5X-10\ 000$	0.999 6	0.283~8.49

2.2 稳定性考察

取马陆黄仙合剂(批号:20140401)一份,精密称定,制成供试品溶液,按样品测定方法测定.分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样 1 μ L,记录峰面积,结果如

表 3 所列. 芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的 RSD 分别为 1. 71%、1. 64%、1. 87%、1. 65% 和 1.98%.

表 3 溶液稳定性试验结果
Table 3 Stability test of solutions (mg/mL)

时间/h	芍药苷	黄芩苷	汉黄芩素	黄芩素	甘草酸铵
0	0.736 5	6.129 4	0.404 5	0.190 6	1.024 7
2	0.734 4	6.105 7	0.405 6	0.199 9	1.023 1
4	0.745 6	6.001 1	0.401 6	0.193 4	1.074 6
6	0.734 6	6.104 9	0.423 1	0.196 5	1.023 4
12	0.748 9	6.309 4	0.405 9	0.193 6	1.027 9
24	0.767 4	6.109 1	0.407 3	0.196 2	1.024 5
$\bar{X}$	0.744 6	6.126 6	0.408 0	0.195 0	1.033 0
RSD/%	1.71	1.64	1.87	1.65	1.98

2.3 精密度试验

利用样品溶液测定日内精密度和日间精密度.取“2.2”节样品溶液一天连续进样 6 次,计算日内

精密度,结果如表 4 所列. 芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的 RSD 分别为 0. 59%、0.44%、1.64%、1.10% 和 1.30%.

表 4 日内精密度
Table 4 Precision test within one day (mg/mL)

进样	芍药苷	黄芩苷	汉黄芩素	黄芩素	甘草酸铵
第 1 次	0.736 5	6.129 4	0.404 5	0.193 8	1.024 7
第 2 次	0.734 4	6.105 7	0.405 6	0.199 9	1.023 1
第 3 次	0.731 2	6.108 9	0.403 4	0.199 1	1.022 8
第 4 次	0.732 8	6.106 7	0.413 7	0.196 4	1.024 9
第 5 次	0.733 7	6.049 0	0.419 2	0.198 2	1.057 2
第 6 次	0.743 4	6.107 7	0.415 9	0.197 8	1.029 3
$\bar{X}$	0.735 3	6.101 2	0.410 4	0.197 5	1.030 3
RSD/%	0.59	0.44	1.64	1.10	1.30

取“2.2”节样品溶液连续 3 天每天进样 2 次,计算日间精密度,结果如表 5 所列. 芍药苷、黄芩

苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的 RSD 分别为 1.59%、1.60%、2.44%、2.25% 和 2.27%.

表 5 日间精密度
Table 5 Precision test between days (mg/mL)

进样	芍药苷	黄芩苷	汉黄芩	黄芩素	甘草酸铵
第 1 次	0.736 5	6.129 4	0.404 5	0.193 8	1.024 7
第 2 次	0.734 4	6.105 7	0.405 6	0.199 9	1.023 1
第 3 次	0.724 5	6.135 4	0.403 4	0.201 3	1.022 4
第 4 次	0.742 8	6.138 2	0.413 7	0.204 9	1.025 2
第 5 次	0.756 7	6.320 1	0.419 2	0.198 2	1.069 5
第 6 次	0.751 6	6.315 7	0.428 8	0.206 1	1.069 3
$\bar{X}$	0.741 1	6.190 8	0.412 5	0.200 7	1.039 0
RSD/%	1.59	1.60	2.44	2.25	2.27

2.4 重复性试验

取马陆黄仙合剂(批号:20140401)6 份,精密称定,制成供试品溶液,按样品测定方法测定.测得芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的 RSD 分别为 1.93%、1.26%、1.66%、1.40% 和 1.84%.结果如表 6 所列.

表 6 重复性实验结果

Table 6 Repeatability test

(mg/mL)

样品号	芍药苷峰面积	黄芩苷峰面积	汉黄芩素峰面积	黄芩素峰面积	甘草酸铵峰面积
1	0.736 5	6.009 4	0.404 5	0.190 5	1.021 3
2	0.734 4	6.116 9	0.402 6	0.190 1	1.001 9
3	0.712 1	6.080 8	0.400 4	0.186 1	1.024 4
4	0.755 5	6.245 3	0.401 1	0.194 2	1.013 8
5	0.737 1	6.103 1	0.417 9	0.191 3	1.058 1
6	0.743 6	6.100 6	0.400 6	0.191 8	1.028 5
$\bar{X}$	0.736 5	6.109 4	0.404 5	0.190 7	1.024 7
RSD/%	1.93	1.26	1.66	1.40	1.84

2.5 准确度试验

以加样回收率考察准确度.取已知质量浓度的同一批马陆黄仙合剂 5 份,每份 0.2 mL,精密称定,各加入混合对照品溶液适量(芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵的质量浓度分别为 0.562、0.518、0.305、0.353 和 0.283 mg/mL),定容 5 mL,按供试品溶液制备项下(1.4 节)操作测定,计算 5 个成分的加样回收率.结果如表 7 所列.

表 7 加样回收率试验结果 (n=5)

Table 7 Results of recovery test sample

化合物	样品质量浓度 /(mg/mL)	加入质量浓度 /(mg/mL)	测得质量浓度 /(mg/mL)	平均回收率 /%	RSD /%
芍药苷	0.147 3	0.146 1	0.293 2	99.70	0.79
	0.147 3	0.146 1	0.291 3		
	0.147 3	0.146 1	0.292 2		
	0.147 3	0.146 1	0.293 8		
	0.147 3	0.146 1	0.294 3		
黄芩苷	1.221 9	1.217 3	2.439 0	101.46	0.99
	1.221 9	1.217 3	2.439 9		
	1.221 9	1.217 3	2.458 6		
	1.221 9	1.217 3	2.467 5		
	1.221 9	1.217 3	2.480 1		
黄芩素	0.080 9	0.079 3	0.160 4	100.35	1.26
	0.080 9	0.079 3	0.161 0		
	0.080 9	0.079 3	0.158 9		
	0.080 9	0.079 3	0.160 1		
	0.080 9	0.079 3	0.162 0		
汉黄芩素	0.038 1	0.035 3	0.075 1	101.70	1.98
	0.038 1	0.035 3	0.073 8		
	0.038 1	0.035 3	0.074 2		
	0.038 1	0.035 3	0.074 6		
	0.038 1	0.035 3	0.072 3		
甘草酸铵	0.204 9	0.212 2	0.417 6	100.34	1.87
	0.204 9	0.212 2	0.416 4		
	0.204 9	0.212 2	0.424 1		
	0.204 9	0.212 2	0.410 4		
	0.2049	0.2122	0.418 6		

2.6 样品测定

精密吸取 1 μ L 进样 UPLC 仪进行分析, 色谱图如图 1 所示, 测定结果如表 8 所列。

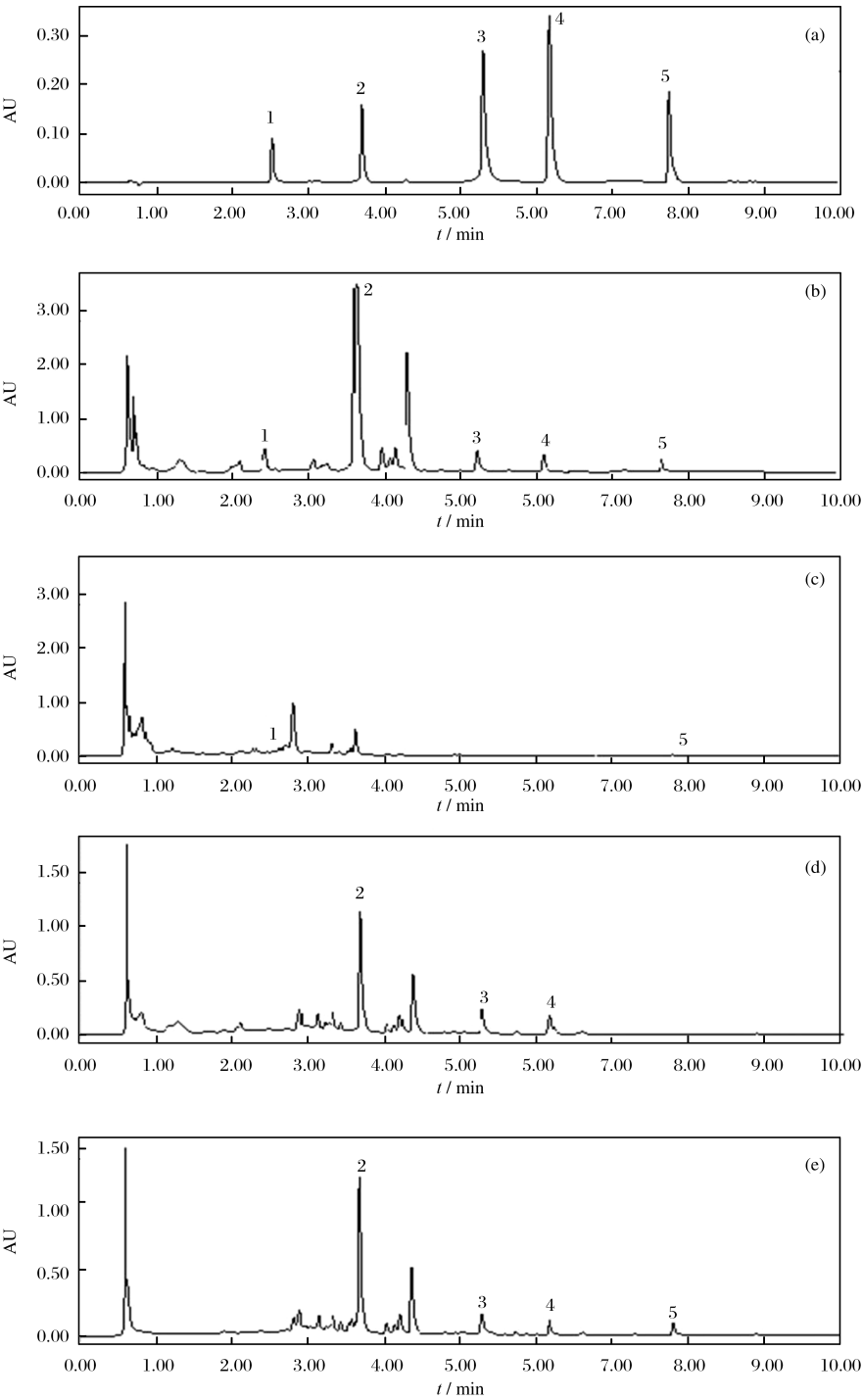


图 1 对照品与样品色谱图

Fig.1 UPLC profiles of reference substances and samples

(1) 芍药苷, (2) 黄芩苷, (3) 黄芩素, (4) 汉黄芩素, (5) 甘草酸铵

(a) UPLC-DAD 对照品, (b) UPLC-DAD 样品, (c) 甘草阴性样品 (249.8 nm),
(d) 白芍阴性样品 (232.1 nm), (e) 黄芩阴性样品 (274.8 nm)

表 8 6 批马陆黄仙合剂中 5 个成分的质量浓度

Table 8 Contents of five compounds in Malu Huangxi Mixture of 15 batches (mg/mL)

样品批号	化合物的质量浓度				
	芍药苷	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	甘草酸铵
20140401	0.736 5	6.109 4	0.404 5	0.190 7	1.024 7
20140402	0.745 0	6.468 1	0.328 9	0.159 9	0.988 6
20140403	0.772 4	6.209 4	0.378 8	0.156 2	1.034 9
小试 01	0.726 3	6.312 5	0.336 6	0.142 9	1.018 6
小试 02	0.675 0	6.511 5	0.298 8	0.137 8	0.937 9
小试 03	0.703 7	5.859 8	0.331 6	0.158 0	0.979 1

3 结果与讨论

3.1 提取方法的选择

比较了使用甲醇、体积分数为 70% 乙醇、乙醇等 3 种溶剂,回流、超声和索氏提取等 3 种方法处理样品,进样测定,结果不同溶剂、不同处理方法样品中各成分峰面积无显著性差异,因此选择最简单的体积分数为 70% 乙醇超声提取法处理样品。

3.2 检测波长的选择

芍药苷的最大吸收波长为 232.1 nm,黄芩苷的最大吸收波长为 277.1 nm,黄芩素的最大吸收波长为 274.8 nm,汉黄芩素的最大吸收波长为 274.8 nm,甘草酸的最大吸收波长为 249.8 nm,因此选择定制波长 0~3 min,232.1 nm 主要测定芍药苷质量浓度,3~7 min,274.8 nm 主要测定黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的质量浓度,7~10 min,249.8 nm 主要测定甘草酸铵的质量浓度。

4 结论

鉴于马陆黄仙合剂在临床治疗胃肠道疾病尤其溃疡性结肠炎效果良好,其中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、芍药苷和甘草酸均有治疗溃疡性结肠炎作用,因此选择他们作为指标性成分控制制剂的质量。本文采用乙醇超声提取样品,一次进样,使用 UPLC-DAD 法 10 min 内同时测定马陆黄仙合剂中芍药苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸的含量。该方法大大简化了检测过程,也可全面控制该制剂的质量。同时本文采用定制波长的检测手段,使得每个分析物均在最大波长处被检出,增加了检测的灵敏度。

参考文献:

[1] 徐淑琴,金权,张思胜. 枳实消痞汤合陇马陆胃药治疗胆汁反流性胃炎 34 例报告[J]. 甘肃中医,2006,19 (1):19-20.

[2] 周永茂. 陇马陆提取液对机体免疫功能的影响[J]. 卫生职业教育,2006,24(9):127-128.

[3] 张彩云,滕宝霞,刘玉玲,等. 复合陇马陆片对实验性胃溃疡的保护作用[J]. 华西药学杂志,2008,23 (1):52-53.

[4] 滕宝霞,刘适发. 复合陇马陆片对幽门螺杆菌的影响[J]. 中成药,2008,30(6):916-917.

[5] 何素萍. 复合陇马陆片对大鼠胃溃疡愈合的影响[J]. 兰州大学学报医学版,2011,37(3):30-32.

[6] 李天锡. 从宽跗陇马陆中提取和制备甲壳质与壳聚糖[J]. 中国中药杂志,1992,17(12):729-731.

[7] 刘利,李妮芝,苗寒梅. 健脾疏肝散治疗溃疡性结肠炎 88 例[J]. 现代中医药,2008,28(1):16-17.

[8] 张勇,邹世光. 四君半夏泻心合方治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎 141 例[J]. 实用中医药杂志,2009,25 (9):598-599.

[9] 胡卫海. 清肠益脾汤治疗溃疡性结肠炎 40 例[J]. 江西中医药,2006,37(11):28-29.

[10] 蒋望洪,王晓东,金杨君. 仙鹤草的临床应用进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2013,13(11):321.

[11] 丁晓刚. 黄芩汤. 有效成分配方对大鼠实验性溃疡性结肠炎的免疫调节作用[J]. 中医药学刊,2003,21 (1):126-127.

[12] 魏国丽,周宇. 汉黄芩素对人结肠癌 HT-29 细胞增殖及 STAT3 信号转导通路的影响[J]. 中国药物经济学,2015,6:32-34.

[13] 李峰,王根旺,钱彬彬,等. 黄芩苷对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制作用及其机制研究[J]. 中国药物警戒,2015,12(6):257-260.

[14] 肖娴,李秀琼,刁建新,等. 白芍总苷对葡聚糖硫酸钠致大鼠实验性结肠炎作用机制研究[J]. 佛山科学技术学院学报自然科学版,2012,30(2):79-81.

[15] 金英善,陈曼丽,陶俊. 芍药化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2013,12(4):745-75.

[16] 常廷民,韩宇,张超贤. 复方甘草酸苷注射液治疗溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 中国药房,2004,15(9):559-560.

Simultaneous Determination of Five Compounds in Malu Huangxian Mixture by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector

BIAN Meng-yang¹, LIU Xiao-hua¹, ZHANG Hai¹, HAN Zheng-jun¹, LI Ping¹,
ZHOU Yong-mao², FENG Shi-lan¹

(1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;
2. Institute of Traditional Chinese medicine in Linxia, Linxia 731100, Gansu China)

Abstract: To a method for the simultaneous quantification of five ingredients in Malu Huangxian Mixture is established. Ultra-high performance liquid chromatography-photodiode array detector (UPLC-DAD) was performed on a column of Waters BEH(Φ1.7 μm, 100 mm×2.10 mm) at the custom wavelengths including 232 nm for 0~3 min, 274 nm for 3~7 min, and at 249 nm for 7~10 min. Methanol-1% acetic acid was used as the mobile phase using gradient elution at a flow rate of 0.61 mL/min. The contents of paeoniflorin, baicalin, baicalein, wogonin and ammonium glycyrrhetate were simultaneously detected by a single injection. Good linear correlation were observed ($r=0.9991\sim0.9999$) and the average recovery rates were 99.70%~100.70%. The proved method is simple, accurate, reliable and repeatable that is suitable for the quality control of Malu Huangxian Mixture.

Key words: Malu Huangxian Mixture; UPLC-DAD; paeoniflorin; baicalin; baicalein; wogonin; ammonium glycyrrhetate

Classifying number: O657.7

