

表 3 霍山石斛与美花石斛多糖柱前衍生 HPLC 特征图谱相似度

Table 3 Pre-column derivation HPLC characteristic spectrum of polysaccharide of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium loddigesii*

霍山石斛编号	霍山石斛相似度		美花石斛编号	美花石斛相似度	
	霍山石斛模	美花石斛模		美花石斛模	霍山石斛模
	式为对照	式为对照		式为对照	式为对照
HS-1	0.994	0.815	MH-1	0.998	0.840
HS-2	0.994	0.811	MH-2	0.999	0.837
HS-3	0.998	0.898	MH-3	0.998	0.873
HS-4	1.000	0.862	MH-4	1.000	0.852
HS-5	1.000	0.877	MH-5	0.996	0.825
HS-6	0.997	0.907	MH-6	0.996	0.914
HS-7	1.000	0.878	MH-7	0.996	0.824
HS-8	0.999	0.894	MH-8	0.997	0.907
HS-9	0.999	0.894	MH-9	0.934	0.901
HS-10	0.997	0.828	MH-10	1.000	0.872
霍山石斛模式	1.000	0.871	美花石斛模式	1.000	0.871

露糖与葡萄糖峰面积的比值，结果霍山石斛甘露糖与葡萄糖峰面积比值均大于 2.0(2.05 ~ 3.71)，而美花石斛甘露糖与葡萄糖峰面积比值均小于 1.0(0.67 ~ 0.98)，与霍山石斛比较差异明显，因此采用多糖特征图谱相似度分析以及甘露糖与葡萄糖的峰面积比值来鉴别霍山石斛与美花石斛，具有一定意义。

参考文献：

[1] 包雪声, 顺庆生, 王新生, 等. 霍山石斛[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2012: 1-3, 39-41.

[2] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 75.

[3] 刘守金, 武祖发, 梁益敏, 等. 霍山石斛的资源及生物学特性[J]. 中药材, 2001, 24(10): 709-710.

[4] 冯耀南, 刘明, 刘俭, 等. 中药材商品规格质量鉴别[M]. 广州: 暨南大学出版社, 1995: 193-196.

[5] 李秀芳, 邓媛元, 潘利华, 等. 霍山石斛多糖对糖尿病性白内障大鼠眼球晶状体组织抗氧化作用的研究[J]. 中成药, 2012, 34(3): 418-421.

[6] 黄森. 霍山石斛多糖提取分离以及抗肿瘤活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.

[7] 李秀芳. 霍山石斛和四种药典石斛多糖降血糖活性比较研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.

[8] 陈程, 吴胡琦, 查学强, 等. 霍山石斛组织快繁中不同发育阶段多糖理化性质和免疫活性的比较研究[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1195-1199.

[9] 冯宝军. 霍山石斛多糖的分离纯化及结构鉴定[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2010.

[10] 刘明珍, 陈乃富, 刘秀珍, 等. 道地药材霍山石斛及其相似种的分子鉴定[J]. 生物学杂志, 2009, 26(5): 34-36.

[11] 周桂芬, 庞敏霞, 陈素红, 等. 铁皮石斛茎、叶多糖含量及多糖部位柱前衍生化高效液相色谱指纹图谱比较研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 795-802.

(编辑: 邓响潮)

UPLC 法同时测定止痒洗剂中盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素的含量

周芙琼^{1,2}, 夏崇才¹, 隆红艳^{2,3}, 高运军¹ (1. 南京市中医院中医药研究所, 江苏 南京 210001; 2. 南京市中医院中心实验室, 江苏 南京 210001)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱(UPLC)方法, 同时测定止痒洗剂中盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素的含量。**方法** 采用 Aglient ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1×50 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 进行梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长为 240 nm, 柱温为 30 ℃。**结果** 盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素分别在 0.0346~0.4152 μg, 0.3190~3.8280 μg, 0.0250~0.3000 μg 范围内呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 96.44%, 95.62%和 96.48%。**结论** 该方法简便、准确、重复性好, 可为制定止痒洗剂质量标准及产品质量控制提供依据。

关键词: 止痒洗剂; 盐酸小檗碱; 芍药苷; 大黄素; 超高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0730-04

收稿日期: 2014-07-31

作者简介: 周芙琼, 女, 中药师, 研究方向: 中药制剂及质量标准研究。Email: qiong860612@163.com。通讯作者: 隆红艳, 副主任中医师, 研究方向: 小儿神经及精神系统疾病、脾胃系统疾病的临床及实验研究。Email: hongyan3128@163.com。

基金项目: 南京市医学科技发展项目(ZKX13048)。

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.020

Simultaneous Determination of Berberine Hydrochloride, Paeoniflorin and Emodin in *Zhiyang* Lotion by Ultra Performance Liquid Chromatography

ZHOU Fuqiong^{1,2}, XIA Chongcai¹, LONG Hongyan^{2,3}, GAO Yunjun¹(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001 Jiangsu, China; 2. Central Laboratory, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To develop a UPLC method for simultaneous determination of berberine hydrochloride, paeoniflorin and emodin in *Zhiyang* Lotion by UPLC. **Methods** The analysis was performed on a column of Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 × 50 mm, 1.8 μm) with gradient mobile phase of methanol and 0.1 % phosphoric acid solution at the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 240 nm, and the column temperature was maintained at 30 °C. **Results** The linearity ranges of berberine hydrochloride, paeoniflorin and emodin were 0.0346~0.4152 μg, 0.3190~3.8280 μg, 0.0250~0.3000 μg, respectively, and the average recoveries were 96.44 %, 95.62 % and 96.48 %, respectively. **Conclusion** The established method is simple and quick, and can be used for simultaneous determination of berberine hydrochloride, paeoniflorin and emodin in *Zhiyang* Lotion.

Keywords: *Zhiyang* Lotion; Berberine hydrochloride; Paeoniflorin; Emodin; Ultra performance liquid chromatography

止痒洗剂止痒洗剂来源于我院临床验方,由黄柏、赤芍、羊蹄、苍术、地肤子等中药组成,功能燥湿止痒、清热解毒。经长期临床观察表明,该方疗效确切^[1],具有治“标”兼治“本”且副作用少等特点。方中黄柏为本制剂的君药,可清湿热,泻火毒;赤芍、羊蹄清热燥湿,行气活血;苍术、地肤子清热燥湿止痒。诸药合用,可使湿热清,瘙痒消,红肿退,共奏燥湿止痒、清热解毒之功效。2010 版《中国药典》一部收录的黄柏来源于芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮^[2],主要含小檗碱、黄柏碱等多种活性成分,而小檗碱具有抗菌、抗炎等作用,对多种革兰氏阳性、阴性菌以及真菌、霉菌、病毒、原虫、线虫具有抑制或杀灭作用,是一种广谱抗菌药物^[3-6]。赤芍主要成分为芍药苷,羊蹄主要成分为大黄素。原药品质量标准仅测定了盐酸小檗碱的含量,本实验采用超高效液相色谱(UPLC)法梯度洗脱,拟建立同时测定盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素含量的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1290 Infinity 超高效液相色谱仪(配置 VWD 型检测器),美国安捷伦公司;FA1104 电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司;

Barnstead LabTower EDI 15 超纯水仪,美国 Thermo Scientific 公司;KQ-300DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;1612-1 离心机,上海医疗器械有限公司。

1.2 试剂 止痒洗剂(自制),批号为:20130721, 20130725, 20130801;对照品盐酸小檗碱(批号:110713-200910)、芍药苷(批号:110736-201136)、大黄素(批号:110715-201016),中国药品生物制品检定所;甲醇,色谱纯,美国 Sigma 公司;水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 × 50 mm, 1.8 μm);以甲醇(A)-0.1 %磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~3 min, 10 %~24 % A; 3~5 min, 24 %~26 % A; 5~6 min, 26 %~30 % A; 6~8 min, 30 %~40 % A; 8~11 min, 40 %~90 % A);流速:0.4 mL·min⁻¹;检测波长:240 nm;柱温:30 °C;进样量:5 μL。本实验分别对盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素进行紫外全波长扫描,最大吸收分别为 265, 230 和 254 nm。经过多次实验,并参考文献^[7-9],最后选择 240 nm 为本实验的检测波长。

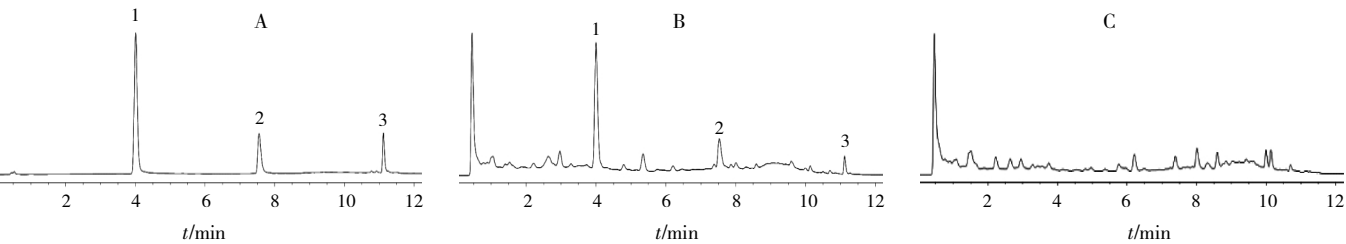
2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素对照品适量，用甲醇制成含盐酸小檗碱 $17.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、芍药苷 $159.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、大黄素 $12.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液，备用。

2.2.2 供试品溶液 精密量取止痒洗剂 1 mL 置 10 mL 容量瓶中，加入甲醇定容至刻度，密塞，超声 10 min，放冷摇匀，经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得供试品溶液，备用。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例称取除黄柏、赤芍、羊蹄以外的其余药材，按照止痒洗剂制备工艺制备缺黄柏、赤芍、羊蹄的阴性样品。按照 2.2.2 项下方法操作，制成缺黄柏、赤芍、羊蹄的阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取混合对照品、供试品以及阴性样品溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 进样，按照 2.1 项下的色谱条件进行分析，结果阴性样品溶液在对照品保留时间上无干扰，见图 1。



A. 混合对照品溶液；B. 供试品溶液；C. 阴性样品溶液；1. 芍药苷；2. 盐酸小檗碱；3. 大黄素

图 1 止痒洗剂 UPLC 色谱图

Figure 1 UPLC chromatograms of Zhiyang Lotion

2.4 线性范围 取混合对照品溶液，按 2.1 项下色谱条件，分别自动进样 2, 4, 6, 8, 12, 24 μL ，记录色谱图，测定峰面积，以峰面积的积分值(Y)对混合对照品的进样量(X)制备标准曲线方程，得到标准曲线方程：盐酸小檗碱为 $Y=136.55 X-9.8608$ ($r=0.9999$)，芍药苷为 $Y=462.99 X-8.2865$ ($r=0.9999$)，大黄素为 $Y=108.47 X+15.762$ ($r=0.9999$)。线性范围分别为： $0.0346\sim0.4152\text{ }\mu\text{g}$ ， $0.3190\sim3.8280\text{ }\mu\text{g}$ ， $0.0250\sim0.3000\text{ }\mu\text{g}$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品混合溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 注入超高效液相色谱仪，按 2.1 项下色谱条件，连续进样 6 次，记录色谱峰面积，结果盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.91 %、0.79 % 和 1.36 %，表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号（批号为：20130721）止痒洗剂制备 6 份供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件，分别进样 $5\text{ }\mu\text{L}$ ，测得峰面积并计算含量，结果测得盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素峰面积 RSD 分别为 0.36 %、0.76 % 和 1.58 %，表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号：20130721），室温下放置，分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样，按 2.1 项下色谱条件，分别进样 $5\text{ }\mu\text{L}$ ，记录色谱峰面积，测得盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素峰面积 RSD 分别为 0.64 %、0.82 % 和 1.66 %，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的止痒洗剂 6 份，分别精密加入一定量的盐酸小檗碱、芍药苷和大黄素对照品，按供试品溶液制备方法制备供试液，进样测定，计算回收率，见表 1。

2.9 样品测定 取 3 个批号的止痒洗剂样品，每个批

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Table 1 Result of recovery test						
成分	样品含量 / μg	加入量/ μg	测定量/ μg	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/%
盐酸小檗碱	25.33	22.46	46.39	93.76	96.44	2.42
	25.08	22.46	46.42	95.01		
	24.92	22.46	46.43	95.77		
	24.78	22.46	46.37	96.15		
	23.76	22.46	46.33	100.51		
	24.43	22.46	46.32	97.44		
芍药苷	221.57	207.31	416.98	94.26	95.62	2.06
	215.62	207.31	418.20	97.72		
	213.62	207.31	417.72	98.45		
	222.62	207.31	416.95	93.74		
	219.62	207.31	416.44	94.94		
	220.62	207.31	416.69	94.58		
大黄素	11.44	10.02	21.04	95.79	96.48	1.38
	11.51	10.02	21.06	95.29		
	11.39	10.02	21.14	97.26		
	11.74	10.02	21.34	95.86		
	11.63	10.02	21.23	95.83		
	11.37	10.02	21.27	98.83		

号 3 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行含量测定,按外标法计算盐酸小檗碱、芍药苷及大黄素的质量浓度,结果见表 2。

表 2 止痒洗剂样品测定结果($n=3$)

Table 2 Results of determination of Zhiyang Lotion

样品批号	盐酸小檗碱/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	芍药苷/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	大黄素/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%
20130721	0.2938	0.36	2.6344	0.76	0.0832	1.55
20130725	0.2953	0.28	2.6319	1.19	0.0801	1.04
20130801	0.2971	0.98	2.6397	0.43	0.0796	2.01

3 讨论

实验中以甲醇-水系统、乙腈-水系统和甲醇-磷酸水溶液系统为流动相,采用等度洗脱,结果各组分不能完全分离。采用梯度洗脱,以甲醇-水系统、乙腈-水系统为流动相时,各色谱峰拖尾严重,而以甲醇-磷酸水溶液系统做流动相后,各色谱峰峰形良好且能良好的分离,最终选用甲醇-0.1%磷酸水溶液为本实验的流动相。

实验中提取溶剂比较了 50%甲醇、75%甲醇、100%甲醇对止痒洗剂 3 种成分的提取率,发现 100%甲醇的提取效果较好,因此选择以甲醇提取。同时比较了超声提取 10, 20, 30 min,结果在各提取时间下,被测成分的提取量基本相等,因此选择提取时间为 10 min。

本实验采用的超高效液相色谱法(UPLC)是在传统高效液相色谱的基础上建立的一种新的色谱分析方法,使用了粒径低于 2 μm 的颗粒作为填料以达到增加柱效的目的。与普通的高效液相比较,具有更高

的分离速度、更好的分离度以及更高的灵敏度,尤其适用于中药复方多指标成分的定量检测^[10-11]。方法学考察结果表明,该分析方法准确、稳定、重复性好、灵敏度高,适用于止痒洗剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 吴崑崙,尹长恒. 丁氏止痒洗剂治疗肛门湿疹疗效观察[J]. 承德医学院学报, 2003, 20(4): 318-320.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 286.
- [3] 丁南南,童珊珊,丁丽霞,等. 小檗碱的分析方法及药理作用研究进展[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1296-1230.
- [4] 郑洪艳,徐为人. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(6): 708-711.
- [5] 张冠英,董瑞娟,廉莲. 川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(10): 812-820.
- [6] 梁园园,于天浩,陈萍,等. 黄柏的药理活性及在化妆品中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(1): 149-151.
- [7] 师永清,康淑荷,王爱军. HPLC 法同时测定黄连双清丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、盐酸小檗碱和大黄素的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1612-1616.
- [8] 唐洪梅,廖小红,何嘉伦. HPLC 法测定肠激安制剂中芍药苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中成药, 2012, 34(5): 853-857.
- [9] 张振凌,冯晨楠,贾利利. HPLC 同时测定黄连阿胶汤合煎液中芍药苷、黄芩苷、小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 75-77.
- [10] 吴剑威,赵润怀,陈波,等. 超高效液相色谱在中药领域的应用[J]. 中草药, 2009, 40: 79-81.
- [11] 陈佳,王钢力,姚令文,等. 超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1976-1981.

(编辑: 邓响潮)

HPLC-ECD 法同时测定青天葵中鼠李柠檬素、鼠李秦素的含量

王振华¹, 马国辉¹, 田 军², 曾令清², 孙丽娜¹, 窦晓蓉¹, 杜 勤¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学科技产业园有限公司, 广东 广州 510445)

摘要: **目的** 采用高效液相-库仑阵列电化学法(HPLC-ECD)同时测定青天葵中鼠李柠檬素和鼠李秦素含量,并对不同培养方法及不同生长阶段的青天葵进行测定分析。**方法** 采用 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇:乙腈(体积比 2:1)混合后加 5% 20 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄(A)-20 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 水溶液,用 H₃PO₄ 调 pH 至 2.50(B)为流动相, A:B=48:52 等度洗脱,流速:1 mL·min⁻¹,进样量 15 μL ,柱温:

收稿日期: 2014-07-31

作者简介:王振华,男,副教授,硕士研究生导师,研究方向:药物新剂型与新技术。Email: wzh@gzucm.edu.cn。通讯作者:杜勤,教授,硕士研究生导师,研究方向:药用植物开发利用。Email: duqin@gzucm.edu.cn。

基金项目:中柬第三方检测平台建设项目-2012 年广州市白云区国际科技合作计划项目(2012-KQ-23)。