

β-环糊精修饰毛细管区带电泳测定三黄片中 大黄有效成分含量*

曾雪^{1,4,5}, 陈竹^{2,3}, 刘应杰¹, 杨元娟^{1△}, 夏培元⁴

(1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 3. 重庆市化学药品质量控制与评价协同创新中心, 重庆 401121; 4. 中国人民解放军第三军医大学西南医院, 重庆 400050; 5. 重庆市药物制剂工程技术研究中心, 重庆 401331)

摘要:目的 建议同时测定三黄片中大黄素和大黄酚含量的β-环糊精修饰毛细管区带电泳法。方法 采用超声辅助方法提取大黄有效成分, 分离柱为熔融石英毛细管柱(75 μm×67.4 cm, 有效长度51 cm), 缓冲溶液为60 mmol/L Na₂B₄O₇+40 mmol/L Na₂CO₃, 缓冲溶液添加剂为40 mmol/L β-环糊精(pH=8.9), 检测波长为254 nm。结果 三黄片中大黄素和大黄酚重复性试验的RSD分别为1.76%和1.53%(n=6), 质量浓度线性范围分别为2.0~18.5 μg/mL和2.50~1.56×10³ μg/mL, 平均加样回收率分别为93.53%和97.26%, RSD分别为0.83%和2.52%(n=3)。结论 该方法简单, 结果准确, 重复性好, 可用于三黄片中大黄有效成分的含量测定。

关键词:三黄片; 高效毛细管电泳法; 大黄素; 大黄酚

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)05-0010-03

Content Determination of Active Ingredient of *Rheum Palmatum* in Sanhuang Tablets by β-Cyclodextrin Modified Capillary Electrophoresis

Zeng Xue^{1, 4, 5}, Chen Zhu^{2, 3}, Liu Yingjie¹, Yang Yuanjuan¹, Xia Peiyuan⁴

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China 401331; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 3. Collaborative Innovation Center for Chemical Medicine Quality Control and Evaluation, Chongqing, China 401121; 4. The First Hospital Affiliated to AUM, Southwest Hospital, Chongqing, China 400050; 5. Chongqing Engineering Technology Research Center of Pharmaceutical Preparation, Chongqing, China 401331)

Abstract: Objective To establish a β-cyclodextrin modified capillary electrophoresis method for content determination of emodin and chrysophanol in Sanhuang Tablets. **Methods** Active ingredient of *Rheum palmatum* was acquired with ultrasonic-assisted extraction. The detection was carried out with an uncoated fused-silica capillary (75 μm×67.4 cm, the effective length was 51 cm). The buffer was consisted of 60 mmol/L Na₂B₄O₇+40 mmol/L Na₂CO₃, and buffer additives was 40 mmol/L β-cyclodextrin (pH=8.9). The detection wavelength was 254 nm. **Results** RSDs of repeatability test of emodin and chrysophanol were 1.76% and 1.53% (n=6). The linear ranges of active ingredient were 2.0~18.5 μg/mL and 2.50~1.56×10³ μg/mL. The average recoveries were 93.53% and 97.26%, and RSD were 0.83% and 2.52% (n=3). **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for content determination of active ingredient of *Rheum palmatum* in Sanhuang Tablets.

Key words: Sanhuang Tablets; high performance capillary electrophoresis; emodin; chrysophanol

三黄片是2015年版《中国药典(一部)》所载的中成药, 主要由大黄、盐酸小檗碱和黄芩浸膏组方, 具有清热解毒、泻火通便功效^[1-3], 主治三焦热盛、目赤肿痛、口鼻生疮、咽喉肿痛、心烦口渴、尿黄便秘。2015年版《中国药典(一部)》采用高效液相色谱(HPLC)法测定三黄片中大黄有效成分的含量^[4], 但液相色谱存在操作过程复杂, 流动相处理要求高, 试剂消耗量大等问题^[5-9]。高效毛细管电泳(HPCE)法是一种由经典电泳技术发展起来的分离分析技术, 具有高灵敏度、高分辨率和低成本等优点, 缓冲溶液处理简单, 操作简便。该方法是液相色谱法的有力补充, 但国内相关研究非常少^[10-11]。本研究中采用β-环糊精修饰毛细管区带电泳同时检测三黄片中大黄活性成分大黄素和大黄酚的含量, 现报

道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent CE7100 型高效毛细管电泳仪(美国安捷伦公司); SPD-15C 型紫外检测器(日本岛津公司); GWA-UN1 型超纯水器(北京普析通用仪器有限公司); SK-1 型涡旋混合器(常州市国旺仪器制造有限公司); AUX220 电子天平(日本岛津公司)。

1.2 试剂

三黄片(广西金诺制药有限公司, 批号为120612201603); Na₂B₄O₇·10H₂O(分析纯, 重庆北碚精细化工工厂, 批号为SJY160724); 无水碳酸钠(分析纯, 重庆北碚精细化工工厂, 批号为SJG160724); 羟

*基金项目: 重庆市委基础与前沿项目[estc2014jcyjA10125]; 重庆市卫计委中医项目[zy20150242]; 重庆市卫计委医学项目[2012-1-093]; 重庆市教育委员会新技术推广项目[GZTG201604]; 重庆医药高等专科学校科学技术研究项目[ygz2015101]。

第一作者: 曾雪, 男, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为药学和中药学药物分析, (电子信箱)1310891885@163.com。

△通信作者: 杨元娟, 女, 硕士研究生, 教授, 研究方向为药学及药物分析, (电子信箱)yang-1889@sina.com。

丙基- β -环糊精(HP- β -CD, 相对分子质量 1 459.8, ACROS ORGANICS, New Jersey, USA, 批号为 QG11031); 大黄素($C_{15}H_{10}O_5$, 批号为 20160711), 大黄酚($C_{15}H_{10}O_4$, 纯度 $\geq 98.0\%$, 批号为 20160848), 均购于美仑生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 电泳参数设置

分离柱: 熔融石英毛细管柱($75\ \mu\text{m} \times 67.4\ \text{cm}$, 有效长度 51 cm, 河北永年瑞丰色谱配件有限公司); 缓冲溶液: $60\ \text{mmol/L Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 40\ \text{mmol/L Na}_2\text{CO}_3 + 40\ \text{mmol/L HP-}\beta\text{-CD}$ (pH = 8.9), 供试品缓冲溶液与此相同; 分离电压: 15 ~ 30 kV; 进样方式: 压差进样; 进样时间: 5 s; 操作温度: $25\ ^\circ\text{C}$; 检测波长: 254 nm。

2.2 溶液制备

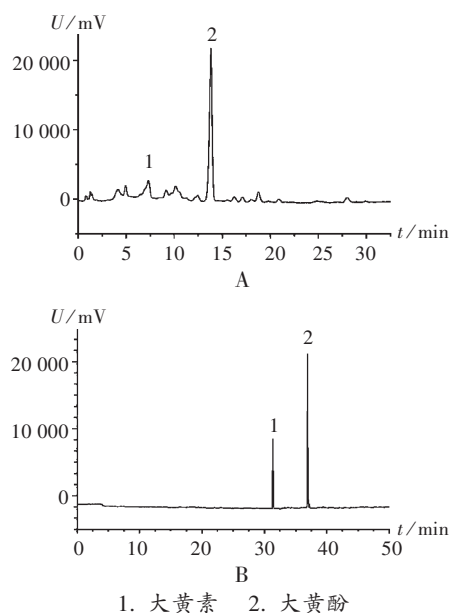
取大黄素对照品和大黄酚对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)的混合溶液, 制成每 1 mL 含大黄素 10 μg 、大黄酚 25 μg 的混合对照品溶液。取样品(批号为 120612201603)20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细(过 3 号筛), 取约 0.26 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置烧杯中, 蒸干, 加 30% 乙醇-盐酸(10:1)的混合溶液 15 mL, 置水浴中加热回流 1 h, 立即冷却, 用三氯甲烷强力振摇提取 4 次, 每次 15 mL, 合并三氯甲烷, 蒸干, 残渣用无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)的混合溶液溶解, 转移至 25 mL 容量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 电泳条件优化

毛细管预处理: 毛细管柱分别用 $0.1\ \text{mol/L NaOH}$ 冲洗活化 10 min, 水洗 5 min, 再用缓冲溶液冲洗 5 min。每次进样前都分别用 $0.1\ \text{mol/L NaOH}$ 冲洗 3 min, 水洗 1 min, 再用缓冲溶液冲洗 2 min。

进样方式选择: 毛细管电泳的进样方式对分离效率和重复性有重要影响。压力进样和电动进样为最常见的 2 种进样方式, 电动进样对黏度较大的生化样品比较适合, 但测量重复性较差, 且可能因各组分扩散系数的差异而导致迁移速率的改变, 三黄片中大黄有效成分的提取物相对生化样品黏度较低, 且需注重重复性, 因此选择压力进样作为进样方式。进样压力 0.5 psi, 进样时间 0.5 s。

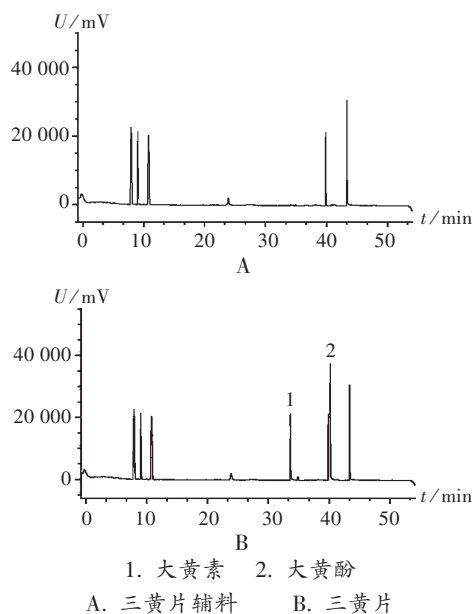
缓冲溶液优化: 大黄素和大黄酚的化学结构相似, 电荷差异小, 且大黄提取中成分较多, 采用区带电泳分离模式(CZE)较难实现 3 种目标组分的完全分离。因此, 本试验中通过加入在缓冲体系中加入低浓度 HP- β -CD, 在传统的 CZE 电泳模式下引入胶束电色谱模式, 增加不同组分在分配系数上的差异。当 HP- β -CD 浓度达到 $40\ \text{mmol/L}$ 时, 实现完全分离, 高效毛细管电泳图见图 1。



1. 大黄素 2. 大黄酚
A. CZE 模式下 B. HP- β -CD 修饰后 CZE 模式
图 1 大黄混合对照品的高效毛细管电泳图

2.4 方法学考察

专属性试验: 依照 2015 年版《中国药典(一部)》中三黄片的制法^[4], 除不加入大黄药材, 其余制法步骤与三黄片制法一致, 并将制作的样品按 2.2 项下方法配制供试品溶液, 与三黄片实际样品在相同条件下进行毛细管电泳分析。结果三黄片中辅料与其他成分对大黄有效成分无干扰(见图 2), 方法专属性良好。



1. 大黄素 2. 大黄酚
A. 三黄片辅料 B. 三黄片
图 2 三黄片辅料和三黄片高效毛细管电泳图

检出限与定量限试验: 分别取 2.2 项下对照品溶液, 按拟订电泳条件测定检出限和定量限。结果大黄素和大黄酚的检出限分别为 $0.78\ \mu\text{g/mL}$ 和 $0.51\ \mu\text{g/mL}$, 定量限分别为 $2.0\ \mu\text{g/mL}$ 和 $2.5\ \mu\text{g/mL}$ 。

重复性试验: 精密量取 2.2 项下对照品溶液适量,

按拟订电泳条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果大黄素和大黄酚的 *RSD* 分别为1.76%和1.53% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下大黄素和大黄酚对照品溶液,以加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)的混合溶液为稀释液,配置成质量浓度分别为1,5,10,15,20 $\mu\text{g/mL}$ 的大黄素对照品溶液和质量浓度分别为2.5 $\mu\text{g/mL}$,12.5 $\mu\text{g/mL}$,312.5 $\mu\text{g/mL}$,1.56 g/L,7.8 g/L的大黄酚对照品溶液。并分别以拟订电泳条件进行电泳分析检测,以质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行回归分析,得回归方程,大黄素 $Y=0.07811X-0.0381$ ($r=0.9951$),大黄酚 $Y=0.08211X-0.0421$ ($r=0.9957$)。结果表明,大黄素和大黄酚的质量浓度线性范围分别为2.0~18.5 $\mu\text{g/mL}$,2.50~1.56 $\times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 。

加样回收试验:取样品(批号为120612201603)粉末约0.26 g,精密称定,共3份,分别置5个锥形瓶中,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订电泳条件检测并记录每份样品的电泳谱图,再在每份供试品中加入等量的大黄素和大黄酚对照品各0.3 mg,再次测定其含量,分别计算大黄素和大黄酚的平均回收率。结果见表1。结果显示该方法单组分回收率较好,多组分 *RSD* 偏高,分析可能是由于大黄提取物成分较多,且本方法是同时考察两组分在电泳中的含量,目标组分间存在化学性质差异,导致检测效率不一致。

2.5 样品含量测定

分别取不同批次三黄片样品粉末约0.26 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订电泳法测定含量。结果见表2。

表1 加样回收试验结果($n=3$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}(\%)$		<i>RSD</i> (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.6432	0.7893	0.3	0.3	0.9231	1.0732	93.30	94.63				
0.6427	0.7901	0.3	0.3	0.9214	1.0831	92.90	97.67	93.53	97.26	0.83	2.52
0.6433	0.7899	0.3	0.3	0.9265	1.0883	94.40	99.47				

注:A为大黄素,B为大黄酚。下表同。

表2 3批样品中大黄素和大黄酚含量测定结果($n=3$)

批号	含量(mg)		总含量(mg)	<i>RSD</i> (%)
	A	B		
120612201603	0.6992	0.7873	1.4865	
120612201605	0.6981	0.7911	1.4892	1.75
120612201607	0.6849	0.7991	1.4840	

3 讨论

三黄片中大黄有效成分主要为大黄素和大黄酚,两种组分化学结构相似,带电差异小,传统区带电泳(CZE)模式分离效果较差。本试验中采用HP- β -CD修饰毛细管区带电泳的方式分离检测,由于环糊精分子具有略呈锥形的中空圆筒立体环状结构,具有一定的疏水性,在传统缓冲体系中增加了一定的多相特性,待分离组分在具有环糊精的缓冲体系中,由于不同的疏水性而呈现出不同的分配系数,导致组分在毛细管电泳中表明,不仅受电渗流的影响,同时也受到分配色谱的影响,有利于组分的完全分离。

方法学考察发现,含量测定的 *RSD* 偏高,分析原因,该方法是建立在保证三黄片中大黄有效成分的分离度之上的,在实现各指标组分的完全分离情况下,一定程度上影响了含量测定的准确度,导致结果 *RSD* 偏高,后期可在方法优化上进一步改进。

本试验中并未对缓冲溶液pH进行系统优化,因为大黄素和大黄酚均为弱酸性,且其带电荷特性相近,在保证电渗流的情况下,pH对大黄素和大黄酚的分离并非主要影响因素。

参考文献:

- [1] 江丹,吴伟,林明欣,等. 降糖三黄片对早期糖尿病肾病大鼠肾组织TGF- β 1/Smad1信号通路的影响[J]. 世界中医药,2014,9(8):1067-1072.
- [2] 田凤胜,王佟,王霞,等. 三黄片对糖尿病大鼠胸主动脉细胞间黏附分子-1及血管细胞间黏附分子-1表达的影响[J]. 中国医药导报,2016,12(35):19-25.
- [3] 潘海邦,易华,吴国泰,等. 三黄片不同调和物外用抗炎、镇痛作用的实验研究[J]. 中国中药科技,2015,22(5):502-503.
- [4] 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,2015:494.
- [5] 江美芳,胡晓茹,林瑞超,等. 三黄片一测多评的方法学研究[J]. 药物分析杂志,2015,9(12):2148-2157.
- [6] 张海红,王树,薛贵平,等. 四季三黄片制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究[J]. 中草药,2014,45(21):3087-3091.
- [7] 杜闻杉,刘喜纲,李忠思,等. 市售三黄片中游离和结合蒽醌含量的比较及聚类分析[J]. 中华医院药理学杂志,2016,36(22):1950-1956.
- [8] 林远凤,黄燕萍. 高效液相色谱法测定三黄片中盐酸小檗碱含量的不确定度分析[J]. 医学导报,2011,30(1):106-108.
- [9] 李晓花,郭允,李佳,等. RP-HPLC法同时测定三黄片中7种指标成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2016,8(8):637-642.
- [10] 高苏亚,党高潮,李华. 高效毛细管区带电泳法测定三黄片中黄芩苷[J]. 中草药,2007,38(7):1012-1014.
- [11] 刘丹,毋福海,曾承辉. 毛细管电泳法同时测定三黄片中7种有效成分的含量[J]. 中国药房,2011,22(28):2672-2675.

(收稿日期:2017-11-28)