doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.23.015

高效液相色谱法测定左金丸和左金胶囊中9种成分含量

宫玉婷,刘晓倩,陈雅然
(新疆维吾尔自治区阿克苏地区药品检验所,新疆 阿克苏 843000)

摘要:目的 建立同时测定左金丸和左金胶囊中表小檗碱、盐酸小檗碱、去氢吴茱萸碱、黄连碱、柠檬苦素、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、盐酸药根碱、吴茱萸次碱9种活性成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱采用Phenomenexluna C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈－含0.1%磷酸和0.05%三乙胺水溶液(梯度洗脱),检测波长为225 nm。**结果** 表小檗碱、盐酸药根碱、去氢吴茱萸碱、黄连碱、柠檬苦素、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、盐酸小檗碱、吴茱萸次碱在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好(R^2=0.998),平均加样回收率分别为86.60%,89.64%,86.22%,86.77%,96.89%,86.52%,87.40%,88.39%,88.14%,*RSD*分别为5.03%,4.90%,2.67%,5.86%,2.50%,5.76%,5.14%,5.76%,4.00%(n=6)。**结果** 该方法灵敏度高、简便,可同时测定左金丸和左金胶囊中9种成分的含量,用于左金丸和左金胶囊的质量控制。

关键词:左金丸;左金胶囊;高效液相色谱法;活性成分;含量测定
中图分类号:R932;R284.1;R286.0 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)23－0056－04

Content Determination of Nine Components in Zuojin Pills and Zuojin Capsules by HPLC

GONG Yuting, LIU Xiaoqian, CHEN Yaran
(*Xinjiang Aksu Institute for Drug Control, Aksu, Xinjiang, China 843000*)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of epiberberine, berberine hydrochloride, dehydroaevodiamine, berberine, limonoids, palmatine hydrochloride, evodiamine, jatrorrhizine hydrochloride and rutaecarpine in Zuojin Pills and Zuojin Capsules. **Methods** The chromatographic column was Phenomenexluna C_{18} column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile－aqueous solution containing 0.1% phosphoric acid and 0.05% triethylamine (gradient elution), the detection wavelength was 225 nm. **Results** Epiberberine, berberine hydrochloride, dehydroaevodiamine, berberine, limonoids, palmatine hydrochloride, evodiamine, jatrorrhizine hydrochloride and rutaecarpine showed good linear relationship with the peak area in the ranges of their respective concentrations(R^2=0.998). The average recoveries were 86.60%, 89.64%, 86.22%, 86.77%, 96.89%, 86.52%, 87.40%, 88.39%, 88.14%, and the *RSD*s were 5.03%, 4.90%, 2.67%, 5.86%, 2.50%, 5.76%, 5.14%, 5.76%, 4.00%(n=6), respectively. **Conclusion** The method is sensitive and simple, it can be used for simultaneous determination of nine components in Zuojin Pills and Zuojin Capsules, and it also can be used for the quality control of Zuojin Pills and Zuojin Capsules.

Key words: Zuojin Pills; Zuojin Capsules; HPLC; active ingredients; content determination

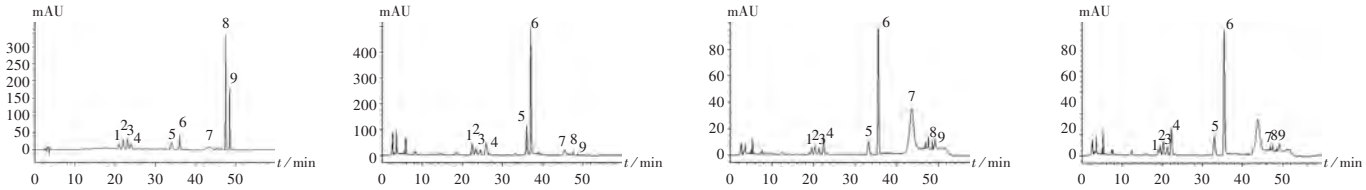
左金丸出自朱丹溪《丹溪心法·火六》[1],由黄连与吴茱萸按6∶1的配伍比例组方,两药相伍,一寒一热,辛开苦降,以苦降肝火为主,兼于辛开疏散火郁,对于肝经火郁、津液未伤者,用之甚为恰当[2]。可治疗脾胃功能失调、应激性胃溃疡、急性胃黏膜损伤等胃肠道引起的消化系统疾病[3－5],加味其他中药可治疗慢性胃炎、消化性溃疡和胆汁反流性胃炎等胃肠道疾病[6－8],效果佳且复发率低[10－11]。同时,左金丸对金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌等高度敏感,对大肠杆菌、痢疾杆菌等中度敏感[12]。陈懿[13]发现,左金丸能有效预防血管紧张素Ⅱ诱导的内皮炎症,其作用机制可能与NF－κB信号转导通路有关[14]。李冀等[15]用左金丸加味医治牙痛,服用3剂后齿龈肿消痛止[16]。黄连 *Coptis chinensis* Franch. 属毛茛科、黄连属多年生草本植物,为常用中药材。吴茱萸含有生物碱、黄酮类、香豆素、精油及其他成分,从吴茱萸中已分离鉴定出多种生物碱,主要有吲哚类、喹诺酮类、呋喃喹啉类和吖喧酮类生物碱,其中吴茱萸碱、去氢吴茱萸碱、吴茱萸次碱等[17－18]是主要化学成分;另外,吴茱萸中还包括苦味素类和挥发油类[19]。2015年版《中国药典(一部)》中左金丸和左金胶囊的质量控制方法之一是采用高效液相色谱(HPLC)法测定其盐酸小檗碱含量,但未对其他活性成分进行检测。本研究中采用HPLC法同时测定左金丸和左金胶囊中表小檗碱、盐酸小檗碱、去氢吴茱萸碱、黄连碱、柠檬苦素、盐酸巴马汀、吴茱萸碱、盐酸药根碱、吴茱萸次碱9种成分的含量,可为完善左金制剂的质量控制方法提供依据;同时应用仿生提取法来模拟胃肠道环境,观察不同比例配伍的黄连和吴茱萸药材中有效成分的溶出状况,为其临床使用配比提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LQ－A20002型电子天平(丹佛仪器北京有限公司,精度为0.000 1 g);安捷伦1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);TG16－WS型台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);SHB－Ⅲ型循环水多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);KQ－500VDB型

第一作者:宫玉婷,女,硕士研究生,研究方向为药品检验,(电子信箱)53429299@qq.com。



1. 表小檗碱 2. 盐酸药根碱 3. 黄连碱 4. 去氢吴茱萸碱 5. 盐酸巴马汀 6. 盐酸小檗碱 7. 柠檬苦素
8. 吴茱萸碱 9. 吴茱萸次碱

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 1 C. 供试品溶液 2 D. 供试品溶液 3

图 1 高效液相色谱图

三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 800 W,频率为 28/40 kHz);800Y 型高速多功能粉碎机(永康市柏欧五金制品有限公司);QYC-200 型恒温振荡器(上海福玛实验设备有限公司)。

1.2 试药

盐酸小檗碱(批号为 633-65-8,纯度≥98%),盐酸巴马汀(批号为 10605-02-4,纯度≥98%),黄连碱(批号为 3486-66-6,纯度≥98%),盐酸药根碱(批号为 960383-96-4,纯度≥94%),吴茱萸碱(批号为 518-17-2,纯度≥98%),吴茱萸次碱(批号为 84-26-4,纯度≥98%),柠檬苦素(批号为 1180-71-8,纯度≥98%),表小檗碱(批号为 6873-09-2,纯度≥98%),均购自成都曼斯特生物科技有限公司;去氢吴茱萸碱(上海安奈德化学技术中心,批号为 6588-15-3,纯度≥98%);左金丸(市售,温州海鹤药业有限公司,湖北香连药业有限公司,批号分别为 201906080,201911023);左金胶囊(市售,温州海鹤药业有限公司,批号为 201904120);甲醇、乙腈,均为色谱纯,均购自美国 Tedia“天地”公司;娃哈哈纯净水;盐酸、三乙胺、磷酸等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenexluna C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:含 0.1% 磷酸和 0.05% 三乙胺(A)-乙腈(B)水溶液,梯度洗脱,0~30 min 时 85% A→82% A,15% B→18% B;30~44 min 时 82% A→40% A,18% B→60% B;44~50 min 时 40% A→35% A,60% B→15% B;50~60 min 时 85% A→15% B;检测波长:225 nm;柱温:25 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:分别取表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、去氢吴茱萸碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱各 2 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,分别加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.179,0.191,0.208,0.235,0.213,0.191,0.223,0.187,0.238 mg/mL 的对照品溶液。精密量取上述溶液各 100 μL,混匀,即得混合对照品溶液。

供试品溶液:取左金丸(湖北、温州)10 丸,称定质量,放入研钵中研细,取细粉约 0.1 g,精密称定,置 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 80 mL 甲醇-水-盐酸(80∶20∶1,*V*/*V*/*V*)混合溶液,称定质量,超声处理 30 min,放至室温,补足减失的质量,吸取适量溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液 1,2。取左金胶囊,同法制备供试品溶液 3。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件进样 10 μL,记录色谱图,详见图 1。结果去氢吴茱萸碱、表小檗碱、盐酸巴马汀、柠檬苦素、黄连碱、吴茱萸碱、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、吴茱萸次碱的保留时间分别为 24.51,21.44,34.64,45.33,23.62,47.52,22.43,36.32,48.54 min,各成分间分离度良好,拖尾因子在 0.95~1.05 之间。

线性关系考察:取 9 种对照品 2 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加入甲醇,充分溶解并稀释至刻度,即得混合对照品溶液。表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、去氢吴茱萸碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量浓度分别为 0.165,0.205,0.202,0.203,0.203,0.205,0.201,0.201,0.204 mg/mL。分别取质量浓度为 200,100,40,20,10,4,2,1,0.5 μg/mL 的混合对照品溶液 10 μL,按质量浓度从低到高注入色谱仪,按拟订色谱条件进样分析,记录色谱图,以质量浓度(*X*)为横坐

表 1 9 种成分的线性关系考察结果(n=9)

成分	回归方程	R^2	线性范围(mg)
表小檗碱	Y=13.499X+24.457	0.998	1.5~120.6
盐酸药根碱	Y=24.282X+54.676	0.998	2.2~135.8
黄连碱	Y=28.162X+68.119	0.998	4.8~152.8
去氢吴茱萸碱	Y=18.882X+14.927	0.998	3.9~99.6
盐酸巴马汀	Y=29.191X+36.953	0.998	5.2~100.5
盐酸小檗碱	Y=28.759X+47.928	0.998	3.3~123.8
柠檬苦素	Y=2.279X+7.35	0.998	2.9~156.9
吴茱萸碱	Y=147.11X+47.021	0.998	3.2~111.6
吴茱萸次碱	Y=84.952X+23.286	0.998	12.3~198.6

标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

精密度试验：精密吸取混合对照品溶液10 μL，按拟订色谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、去氢吴茱萸碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的*RSD*分别为0.39%，0.29%，0.29%，0.41%，0.49%，0.83%，1.16%，0.12%，0.30%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

重复性试验：称取同一左金胶囊粉末6份，每份0.1 g，精密称定，依法制备供试品溶液，按拟订色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、去氢吴茱萸碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的*RSD*分别为1.30%，0.46%，1.18%，0.22%，0.44%，0.24%，0.74%，3.80%，1.81%（$n=6$），表明方法重复性良好。

稳定性试验：取同一左金胶囊粉末，依法制备供试品溶液，按拟订色谱条件分别在0，2，4，8，12 h时各进样10 μL，记录峰面积。结果表小檗碱、盐酸药根碱、黄连碱、去氢吴茱萸碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的*RSD*分别为0.22%，0.13%，0.27%，0.11%，0.80%，0.79%，0.90%，2.30%，1.08%（$n=6$），表明供试品溶液在12 h内稳定。

加样回收试验：称取已知含量的左金胶囊粉末0.025 g，精密称定，置50 mL容量瓶中，加入各对照品适量，依法制备供试品溶液，按拟订色谱条件进样测定，并计算回收率。结果表小檗碱回收率为86.60%、*RSD*为5.03%，盐酸药根碱回收率为89.64%、*RSD*为4.90%，黄连碱回收率为86.22%、*RSD*为2.67%，去氢吴茱萸碱回收率为86.77%、*RSD*为5.86%，盐酸巴马汀回收率为96.89%、*RSD*为2.50%，盐酸小檗碱回收率为86.52%、*RSD*为5.76%，柠檬苦素回收率为87.40%、*RSD*为5.14%，吴茱萸碱回收率为88.39%、*RSD*为5.76%，吴茱萸次碱回收率为88.14%、*RSD*为4.00%（$n=6$）。

2.4 样品含量测定

取左金丸（温州、湖北）、左金胶囊（温州）适量，依法制备供试品溶液，按拟订色谱条件测定3种样品中9种成分的含量。结果见表2。可见，左金胶囊中除了盐酸小檗碱的含量较低外，其他8个成分的含量均高于左金丸，其中表小檗碱的含量最高；不同厂家生产的左金丸含量也不相同。

2.5 黄连－吴茱萸药对配伍比例确定

模拟胃液配置：精密吸取2.25 mL浓盐酸，置250 mL容量瓶中，加入200 mL水，振摇混匀，再加2.5 mg胃蛋白酶，加水使其充分溶解，并稀释至刻度，置于冰箱冷藏储存。

表2 左金胶囊和左金丸中9种成分的含量测定结果（mg/g）

成分	左金胶囊	左金丸（温州）	左金丸（湖北）
表小檗碱	23.53	14.84	1.79
盐酸药根碱	16.02	6.92	2.16
黄连碱	7.97	1.92	0.71
去氢吴茱萸碱	53.02	14.97	12.61
盐酸巴马汀	45.20	14.17	8.09
盐酸小檗碱	205.90	68.60	52.46
柠檬苦素	3.73	2.58	0.29
吴茱萸碱	0.69	0.16	0.13
吴茱萸次碱	0.74	0.03	0.49

模拟肠液配置：称取1.402 7 g氢氧化钾（KOH）固体，精密称定，置250 mL容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，振摇混匀，得0.1 mol/L的KOH溶液，储存于冰箱冷藏处，备用。

试验设计与结果：将市售黄连、吴茱萸药材分别经药材粉碎机粉碎成药物粉末，装袋，备用。称取0.1 g不同比例黄连－吴茱萸药材粉末（取用量见表3），置10 mL离心管中，加入2 mL人工胃液，37 ℃恒温震荡30 min，再用0.1 mol/L的碱溶液调节pH为6～8，再加入4 mg胰蛋白酶，恒温震荡30 min，再将离心管放入离心机中，以4 000 r/min离心4 min，取上清液置10 mL容量瓶中，加纯净水定容。取250 μL药液，置1.5 mL EP管，加入750 μL甲醇，涡旋30 s，放入离心机中，以10 000 r/min的速率离心5 min，取上清液，过滤，进样测定。结果见表4。

仿生提取是提取中药复方化学成分的一种工艺手段，通过模拟人体胃肠道环境，其目的是提高有效成分。结果显示，当黄连－吴茱萸药材配伍比例为6∶1时，有效成

表3 不同配伍比例黄连－吴茱萸药材取用量

配伍比例	黄连（g）∶吴茱萸（g）	配伍比例	黄连（g）∶吴茱萸（g）
6∶1	0.085 6∶0.014 8	1∶2	0.033 5∶0.066 5
4∶1	0.080 3∶0.019 7	1∶4	0.020 2∶0.081 0
2∶1	0.067 1∶0.033 2	1∶6	0.014 4∶0.085 6
1∶1	0.050 3∶0.049 8		

表4 不同配伍比例黄连－吴茱萸药材中9种成分含量测定结果（mg/g）

成分	6∶1	4∶1	2∶1	1∶1	1∶2	1∶4	1∶6
表小檗碱	11.34	10.25	6.80	3.84	1.52	0.05	–
盐酸药根碱	8.52	7.87	5.77	1.62	–	–	–
黄连碱	3.28	2.88	1.97	0.13	–	–	–
去氢吴茱萸碱	129.17	77.40	29.20	8.36	2.87	0.78	0.07
盐酸巴马汀	15.90	15.00	11.98	7.11	4.21	1.72	–
盐酸小檗碱	65.84	61.04	47.36	28.68	20.05	12.62	7.78
柠檬苦素	54.54	39.53	39.27	17.78	13.37	10.42	13.46
吴茱萸碱	32.79	32.77	14.21	11.27	8.48	8.55	8.85
吴茱萸次碱	0.98	0.51	0.55	1.13	0.85	0.84	0.84

分含量最高，通过观察不同比例配伍有效成分的溶出情况，可为其临床使用配比提供参考。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

流动相选择：分别考察乙腈－水（每 1 000 mL 中含 1 mL 磷酸）和乙腈－水（每 1 000 mL 中含 1 mL 磷酸、0.5 mL 三乙胺）为流动相进行梯度洗脱，对目标化合物的分离程度、杂质峰的干扰、拖尾因子等进行考察，最终确定乙腈－水（每 1 000 mL 中含 1 mL 磷酸、0.5 mL 三乙胺）最佳流动相。

检测波长选择：为多种不同结构的生物碱能同时测定，分别考察于 210，225，265，280，360 nm 波长处的 9 种成分，各成分在 225 nm 波长处的分离效果最好，最终确定 225 nm 为检测波长。

3.2 溶液制备方法优化

分别考察了盐酸－甲醇（1∶100，*V*/*V*）、甲醇、甲醇－水（80∶20，*V*/*V*）和甲醇－水－盐酸（80∶20∶1，*V*/*V*/*V*）超声提取的效果，结果表明，甲醇－水－盐酸对各待测成分提取率最高。采用单因素分析方法，对提取溶剂体积 20，40，80，100 mL（甲醇－水－盐酸，80∶20∶1，*V*/*V*/*V*）和超声时间 60，50，40，30，20，10 min 分别进行考察，且用 80 mL 超声 30 min 时各待测成分的提取率最高。

3.3 不同制剂中 9 种成分测定结果

本研究中采用 HPLC 法对市售左金胶囊、左金丸（温州、湖北）的 9 种成分的含量测定结果进行了比较，2015 年版《中国药典（一部）》规定，左金胶囊每粒含黄连以盐酸小檗碱计，不得少于 40 mg，左金丸中每 1 g 含黄连以盐酸小檗碱计，不得少于 31 mg。本研究中所测左金胶囊每粒 0.35 g 中含有盐酸小檗碱 72.065 mg（大于40 mg）；左金丸（温州）中每 1 g 含盐酸小檗碱 68.602 mg，左金丸（湖北）中每 1 g 含盐酸小檗碱 52.468 mg（均大于 30 mg）。表明市售 3 种样品均为合格产品，但不同厂家的不同制剂中这 9 种成分的含量不同。

3.4 方法评价

本研究中采用 HPLC 法，以乙腈－含 0.1% 磷酸和 0.05% 三乙胺的水溶液为流动性进行梯度洗脱，建立了能同时测定左金丸和左金胶囊中 9 种成分含量的方法，该方法对该 9 种成分的分离效果及重复性均较好，简便易行，为制剂的质量控制和临床应用提供了依据。

参考文献：

[1] 张广中．柴胡疏肝散合左金丸加减治疗慢性糜烂性胃炎的效果[J]．世界最新医学信息文摘，2019，19（A5）：181.
[2] 张　璐，巫圣乾，王淑美，等．左金丸干预大鼠胃热证的 1H－NMR 代谢组学研究[J]．中药新药与临床药理，2020，31（1）：80－84.
[3] 王莲萍，李庆杰，刘晓艳，等．基于 UFLC－MS/分子模拟计算的吴茱萸醇提取物中胆碱酯酶抑制剂筛选[J]．高等学校化学学报，2020，41（1）：111－117.
[4] 叶旭星，何　钦，徐　斌，等．加味百合汤合左金丸治疗原发性胆汁反流性胃炎临床研究[J]．新中医，2020，52（2）：41－43.
[5] 郑罗棋，惠　慧，田　港，等．基于网络药理学吴茱萸致肝毒性机制研究[J]．中草药，2020，51（2）：419－425.
[6] 吴　翠，徐　靓，樊小瑞，等．鄱阳县中药材精准扶贫存在的问题及对策[J]．现代农业科技，2020（1）：87－88.
[7] 孙子洲，曹兰秀．吴茱萸常用对药配伍探析[J]．环球中医药，2020，13（1）：64－66.
[8] 韦　颖，王　建，任思陈，等．基于网络药理学的吴茱萸抗胃癌潜在有效成分及作用机制研究[J]．中国医院用药评价与分析，2020，20（1）：7－9.
[9] 李明秀，张丹妮，杨丹丹．吴茱萸热熨联合腹部穴位按摩改善胸腰椎术后胃肠功能的临床观察[J]．中外医学研究，2020，18（3）：155－157.
[10] GUO W，HUANG JH，WANG N，et al. Integrating Network Pharmacology and Pharmacological Evaluation for Deciphering the Action Mechanism of Herbal Formula Zuojin Pill in Suppressing Hepatocellular Carcinoma[J]. Frontiers in Pharmacology，2019，10：1185.
[11] 王　君，陈奕玮，赵　坤，等．基于网络药理学研究左金丸治疗高血压的分子机制[J]．中成药，2019，41（8）：1976－1981.
[12] 刘少康，林依娜．旋覆代赭汤合左金丸加减配合西药治疗反流性食管炎 40 例疗效观察[J]．新疆中医药，2019，37（4）：27－29.
[13] 陈　懿．丹栀逍遥散加减联合左金丸外敷涌泉穴治疗肝郁化火型失眠的临床观察[J]．中医临床研究，2019，11（19）：77－79.
[14] 何思敏，蔡小丽，赵　静，等．柴胡疏肝散合左金丸加减治疗慢性糜烂性胃炎疗效观察[J]．实用中医药杂志，2019，35（9）：1072－1073.
[15] 李　冀，张宸语，旺建伟，等．阐析左金丸之“和”与“变”[J]．中医杂志，2019，60（20）：1715－1717.
[16] 刘　斌，杨超茅．四逆散合左金丸加味治疗胃食管反流病 EE 型临床观察[J]．临床医药文献电子杂志，2019，6（70）：139.
[17] 任伯颖，康馨元，曲　朋，等．左金胶囊抗感染、抗胃溃疡的实验研究[J]．长春中医药大学学报，2014，30（2）：205－207.
[18] 盛　琳，罗海燕，刘　侠，等．左金胶囊的制备——药学综合设计性实验的教学探讨[J]．科技创新导报，2011（21）：254.
[19] YAN Q，SHAN Y，YIN M，et al. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Evodia rutaecarpa* var. o fficinalis[J]. Biochemical Systematics and Ecology，2020，88：103961.

（收稿日期：2020－03－16；修回日期：2020－06－18）