

# HPLC 法测定复方大黄灌肠液中 枸橼酸的含量※

● 伍小燕\* 陈 朝 黄叔芳 莫小林 龚敏阳▲

**摘 要** 目的:建立复方大黄灌肠液中枸橼酸的含量测定方法。方法:采用 HPLC 法,色谱柱:WondaSil Superb C18(4.6×250mm,5 $\mu$ m),流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(5:95),检测波长:214nm,流速:0.5mL·min<sup>-1</sup>,柱温:25℃。结果:枸橼酸的线性范围分别为 22.10~265.20mg·L<sup>-1</sup>( $r=0.9999$ ),加样回收率为 100.57%,RSD 为 2.43%。结论:该方法快速、准确,可作为复方大黄灌肠液质量控制的有效方法。

**关键词** 复方大黄灌肠液 枸橼酸 高效液相色谱法

复方大黄灌肠液是我院肝病科毛德文主任基于大肠论治的“通腑开窍”治疗理论研制的中药复方制剂<sup>[1,2]</sup>,由大黄、乌梅药材组成,具有通腑开窍、清热解毒的功效。临床研究证实,复方大黄灌肠液能显著降低肝性脑病患者的血氨(NH<sub>3</sub>)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,从而提高重型肝炎患者的存活率<sup>[1,3]</sup>。乌梅在处方中的固涩和降低血氨作用与有机酸密切相关,因此将有机酸中含量最高的枸橼酸作为复方的有效成分之一。本实验建立了高效液相色谱法测定复方大黄灌肠液中枸橼酸含量的方法,为该新制剂的开发研究提供质量控制依据。

## 1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪,包括:DGU-20A5 泵、SPD-20A 型紫外检测器、HCT-360 柱温箱(天津市恒科技发展有限公司);GH-252 电子分析天平(日本 A&D 公司);TU-1901 紫外分光光度计(北京普析通用仪器公司);CD-UPT-II-10L 超纯水机

(成都越纯科技有限公司);KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

复方大黄灌肠液(批号:20121203、20121221、20130109)和阴性样品均为广西中医药大学第一附属医院制剂室制备;枸橼酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100396-200301);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:WondaSil Superb C<sub>18</sub>(4.6×250mm,5 $\mu$ m);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(5:95);检测波长:214nm;流速:0.5mL·min<sup>-1</sup>;柱温:25℃;进样量:20 $\mu$ l。理论塔板数按枸橼酸峰计算应不低于 7000。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取枸橼酸对照品 11.05mg,置 25ml 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,制成质量浓度为 0.4420g·L<sup>-1</sup>的溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 精密吸取灌肠液 1ml 置于蒸发皿中,水浴蒸干后加入甲醇 10ml 溶解,转移至具塞锥形瓶,超声(功率 135W)提取 30min,滤纸过滤,水浴蒸干后精密加入水 10ml 溶解后吸取 1ml 至 25ml 量瓶,加水定容,摇匀,0.45 $\mu$ m 针式滤膜过滤,取续滤液,即得。

**2.2.3 阴性样品溶液** 按处方比例及工艺制备不含

※基金项目 广西壮族自治区中医药管理局立项课题(No:GZYZ-10-10)

\* 作者简介 伍小燕,主任中药师。主要从事药事管理与中药制剂研发。

▲通讯作者 龚敏阳,副主任中药师,主要从事中药制剂研发。  
E-mail: gongminyang@163.com

• 作者单位 广西中医药大学第一附属医院药学部(530023)

乌梅的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

**2.3 专属性试验** 取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液,按“2.1”项下的色谱条件分别进样。结果表明阴性样品溶液在枸橼酸峰相同的保留时间处基本无干扰,证明此法具有良好的专属性,见图1。

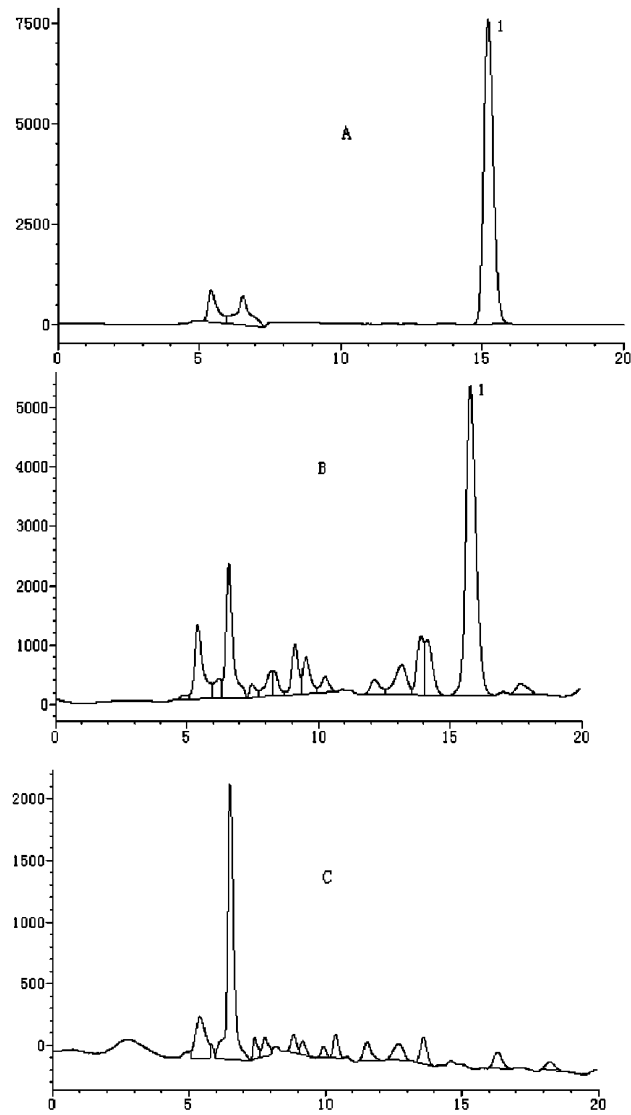


图1 HPLC 色谱图

A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 枸橼酸

**2.4 线性关系考察** 精密吸取对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0ml 置 10ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的对照品溶液。以对照品质量浓度( $X, \text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程:  $Y = 1.98 \times 10^3 X + 181.92, r = 0.9999 (22.10 \sim 265.20 \text{ml} \cdot \text{L}^{-1})$ ;线性回归曲线说明,枸橼酸的浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系,故可采用外标法测定样品中枸橼酸的含量。

**2.5 精密度试验** 精密吸取浓度为  $176.8 \text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液,连续进样 6 次,按“2.1”项下条件测定。枸橼酸峰面积的 RSD 为 0.34% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取复方大黄灌肠液样品(批号 20121203),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在室温下 0、1、2、4、6、12h 测定,记录峰面积,枸橼酸峰面积的 RSD 为 1.78% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液在 12h 内基本稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一批样品(批号 20121203)6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样,计算枸橼酸含量。枸橼酸的含量分别为 66.74、69.03、69.52、67.59、67.50、68.10  $\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD 为 1.52% ( $n = 6$ ),表明试验方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 精密吸取同一批(批号 20121203)已知枸橼酸含量的样品 9 份,平均分为 3 组,按低、中、高 3 个量级分别精密加入枸橼酸对照品适量,混匀,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定峰面积并计算含量、回收率。结果见表1。

表1 回收率试验结果( $n = 9$ )

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 /%	RSD /%
16.28	8.21	24.76	103.29	100.57	2.43
		24.65	101.95		
		24.81	103.89		
16.88	16.41	32.82	97.18		
		33.62	102.01		
		32.82	97.14		
16.39	24.62	40.97	99.84		
		41.01	100.02		
		40.95	99.76		

**2.9 样品含量测定** 取 3 批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定峰面积并计算含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果

批号	峰面积	浓度/ $\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$	样品含量/mg
20121203	130039	65.56	16.39
20121221	137584	69.37	17.34
20130109	133870	67.49	16.87

### 3 讨论

方中乌梅为辅药,既能防止大黄泻下太过,又能酸化汤液,使煎剂成弱酸性,促使  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ ,而血中的氨又不断通过酸透析作用扩散到肠腔,使静脉血氨迅速降低,减少血氨的蓄积和吸收,从而起到清除内毒素、降低血氨,减轻肝性脑病的作用。成熟乌梅所含的有机酸中,含量最高是枸橼酸<sup>[5]</sup>,因此研究将枸橼酸作为乌梅的质量控制指标。

为了能在适宜的分析时间内获得指标成分的完全分离,选择了乙腈-0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ <sup>[6]</sup>、0.8%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  水溶液<sup>[7]</sup>、甲醇-0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  和甲醇-0.1% 磷酸4套流动相进行对比洗脱,发现乙腈-0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、0.8%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  水溶液洗脱基线不平稳,分离度差,甲醇-0.5%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  洗脱分离度较好,但基线仍不平稳,而甲醇-0.1% 磷酸洗脱基线稳定性和分离度最好。实验中还对流动相比比例、不同波长、流速、和柱温进行了考察,结果发现:甲醇:0.1% 磷酸=5:95 时峰形最佳;检测波长为214nm时的基线较210nm 平稳;流速为0.5ml·min<sup>-1</sup>比较适合

本样品枸橼酸的分离,高于0.5ml·min<sup>-1</sup>会降低枸橼酸的分离度。

HPLC 法测定复方大黄灌肠液中枸橼酸,供试品用量小、制备方法简单,测定结果准确,重复性好,可有效地控制复方大黄灌肠液的质量,依据本试验数据:本制剂含枸橼酸的量每毫升应不低于16mg。

### 参考文献

- [1]刘茵,毛德文,王振常,等. 大黄煎剂与乳果糖灌肠治疗肝硬化并发肝性脑病疗效比较[J]. 中医药导报,2006,12(12):23-24.
- [2]毛德文,武建华,邱华,等. “通腑开窍”法治疗肝性脑病的理论探讨[J]. 四川中医,2008,26(10):22-24.
- [3]廖树棋,毛德文. 大黄煎剂保留灌肠治疗重型肝炎40例总结[J]. 湖南中医杂志,2002,18(4):9-10.
- [4]邱华,毛德文,韦艾凌. 大黄煎剂对急性肝衰竭大鼠肝性脑病防治机制的实验研究[J]. 中国中医急症,2007,16(2):195-197.
- [5]陈琳,刘丽梅,王瑞海,等. 高效液相色谱法测定乌梅丸中枸橼酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):30-32.
- [6]国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药工业出版社,2010:72.
- [7]唐慧慧,蔡清宇,毛翼. HPLC 法测定净乌梅及乌梅炭中柠檬酸和苹果酸的含量[J]. 中药材,2007,30(1):52-54.

### 医论

### 君臣佐使逆从反正说

君为主。臣为辅。佐为助。使为用。置方之规也。逆则攻。从则顺。反则异。正则宜。治症之要也。必热必寒。必散必收者。君之主也。不宜不明。不授不行者。臣之辅也。能受能令。能合能分者。佐之助也。或击或发。或劫或开者。使之用也。破寒必热。逐热必寒。去燥必润。除湿必泄者。逆则攻也。治惊须平。治损须温。治留须收。治坚须溃者。从则顺也。热病用寒药。而导寒攻热者必热。阳明病发热。大便硬者。大承气汤。酒制大黄热服之类也。寒病用热药。而导热去寒者必寒。少阴病下利。服附子干姜不止者。白通汤加人尿猪胆之类也。塞病用通药。而导通除塞者必塞。胸满烦惊。小便不利者。柴胡加龙骨牡蛎汤之类也。通病用塞药。而导塞止通者必通。太阳中风下利。心下痞硬者。十枣汤之类也。反则异也。治远以大。治近以小。治主以缓。治客以急。正则宜也。至真要论曰。辛甘发散为阳。酸苦涌泄为阴。咸味涌泄为阴。淡味渗泄为阳。六者或收或散。或缓或急。或燥或润。或软或坚。所以利而行之。调其气而使平。故味之薄者。阴中之阳。味薄则通。酸苦咸平是也。气之浓者。阳中之阳。气浓则发热。辛甘温热是也。气之薄者。阳中之阴。气薄则泄。辛甘淡平寒凉是也。味之浓者。阴中之阴。味浓则泄。酸苦咸气寒是也。易曰。同声相应。同气相求。水流湿。火就燥。云从龙。风从虎。圣人作而万物睹。本乎天者亲上。本乎地者亲下。物各从其类也。故置方治病如后。

(摘自明·傅仁宇《审视瑶函·卷二》)