

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.15.008

高效液相色谱多波长法同时测定中风合剂中梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷含量

江建丽

(福建省南平市食品药品检验检测中心, 福建 南平 353000)

摘要:目的 建立同时测定中风合剂中梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷4种有效成分含量的高效液相色谱多波长法。方法 色谱柱为Welch XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相A为0.06%磷酸溶液、B为乙腈(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长分别为200, 231, 327 nm, 柱温为30℃, 进样量为10 μL。结果 梓醇、哈巴苷、绿原酸、芍药苷进样量分别在0.156~1.248 μg, 0.154~1.232 μg, 0.136~1.086 μg, 0.231~1.845 μg范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999, 0.9999, 1.0000, 0.9999$), 平均加样回收率分别为99.47%, 99.54%, 99.89%, 99.94%, RSD 分别为0.54%, 0.91%, 0.23%, 0.35% ($n=6$)。结论 该方法操作简单、专属性强, 可用于中风合剂的质量控制。

关键词: 高效液相色谱多波长法; 中风合剂; 梓醇; 哈巴苷; 绿原酸; 芍药苷; 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(2019)15-0023-03

Simultaneous Determination of Catalpol, Harpagide, Chlorogenic Acid and Paeoniflorin in Zhongfeng Mixture by Multiwavelength HPLC

JIANG Jianli

(Fujian Nanping of Food and Drug Inspection and Testing Center, Nanping, Fujian, China 353000)

Abstract: Objective To establish a multiwavelength HPLC method for simultaneous determination of 4 active components of catalpol, harpagide, chlorogenic acid and paeoniflorin in Zhongfeng Mixture. **Methods** The chromatographic column was Welch XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase A was 0.06% phosphoric acid solution, the mobile phase B was acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 200, 231, 327 nm, the column temperature was 30℃ and the sample size was 10 μL. **Results** The linear range was 0.156 - 1.248 μg ($r=0.9999$) for catalpol, 0.154 - 1.232 μg ($r=0.9999$) for harpagide, 0.136 - 1.086 μg ($r=1.0000$) for chlorogenic acid and 0.231 - 1.845 μg ($r=0.9999$) for paeoniflorin. The average recoveries were 99.47%, 99.54%, 99.89%, 99.94%, $RSDs$ were 0.54%, 0.91%, 0.23% and 0.35% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple and specific, which can be used for the quality control of Zhongfeng Mixture.

Key words: multiwavelength HPLC; Zhongfeng Mixture; catalpol; harpagide; chlorogenic acid; paeoniflorin; content determination

中风合剂是由太子参、黄芪、玄参、生地、忍冬藤、白芍、木瓜等11味中药组成的复方制剂, 具有益气养阴、活血通络的功效^[1], 用于中风恢复期的半身不遂、肢体麻木、口眼喎斜、舌强语蹇的治疗, 疗效较好。原标准中只是对制剂的性状、薄层色谱、检查项下进行检验, 未对

制剂中玄参、生地、忍冬藤、白芍的有效成分进行含量测定^[2-3]。为有效控制中风合剂的质量, 本研究中根据处方的剂型特点, 对制剂中哈巴苷(玄参的有效成分)、梓醇(生地的有效成分)、绿原酸(忍冬藤的有效成分)、芍药苷(白芍的有效成分)进行了含量测定^[4-9], 现报道如下。

第一作者: 江建丽, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品检验、质量标准与提高, (电子信箱)420418459@qq.com。

为10.00%, 酸不溶灰分为2.00%。

样品中挥发油含量的多少关系到药材的优劣, 结果8批留兰香药材挥发油平均值为0.36%, 按不低于平均值的80.00%制订标准, 留兰香药材挥发油不得少于0.26%, 建议留兰香药材挥发油含量不得少于0.25% (mL/g)。

此标准在原质量标准基础上增加显微鉴别、薄层色谱鉴别、各项检查及挥发油含量测定等方法, 形成了一个较完整的质量评价体系, 可进一步加强对该药材的质量控制, 保障民众用药安全。

参考文献:

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 第2版. 上海: 上海科

学技术出版社, 2006: 2676-2677.

[2] DB52/YC303-2003, 贵州省药材、民族药材质量标准[S].

[3] 曹继华, 朱聪明, 李艳丽. 薄荷及其伪品的鉴别[J]. 河南中医学院学报, 2004, 19(1): 30-31.

[4] 周建理, 杨青山. 中药微性状鉴定法[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(1): 66-68.

[5] 崔宇宏, 高天爱, 安志强. 薄荷及其伪品留兰香的鉴别[J]. 光明中医, 2011, 26(8): 1712-1714.

[6] 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: 377.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

(收稿日期: 2019-02-22)

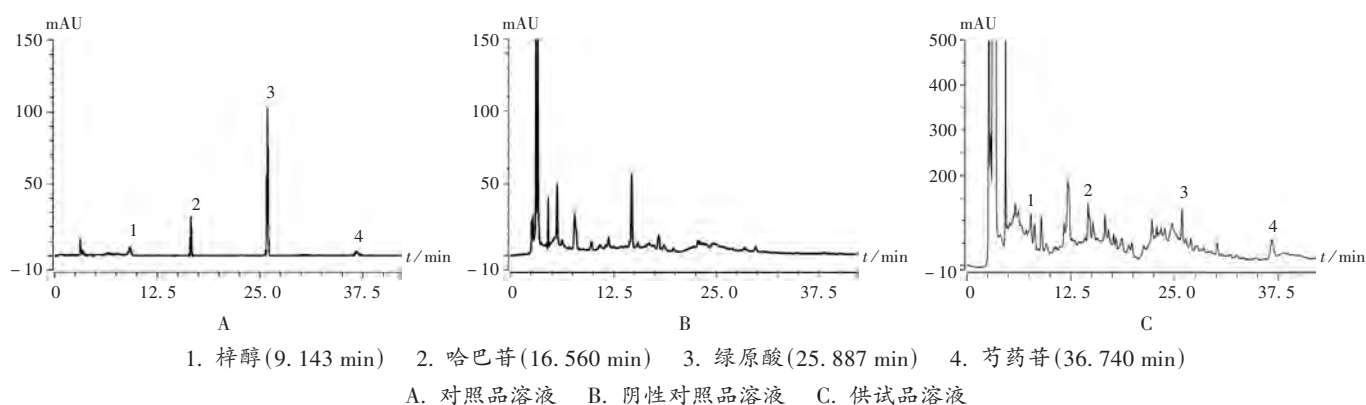


图1 高效液相色谱图

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo ultimate3000 型高效液相色谱仪(包括自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器,赛默飞世尔公司);梅特勒 XS205DU 型电子天平(德国赛多利斯公司);ABY-2001-U 型超纯水机(重庆艾科浦公司)。

1.2 试药

中风合剂(批号分别为 20161215, 20170114, 20170209,福建省南平市人民医院医院制剂);梓醇对照品(批号为 110808-201210,含量为 98.1%),哈巴苷对照品(批号为 111729-201204),绿原酸对照品(批号为 110753-201314,含量为 96.6%),芍药苷对照品(批号为 110736-201741,含量为 95.7%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welch XB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.06% 磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min 时 0→2% B,5~12 min 时 2%→10% B,12~25 min 时 10%→25% B,25~38 min 时 25%→2% B,38~40 min 时 2% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:200,231,327 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

分别取梓醇 19.88 mg、哈巴苷 19.25 mg、绿原酸 17.56 mg 和芍药苷对照品 30.12 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇,分别制成质量浓度梓醇为 0.780 1 g/L(I)、哈巴苷为 0.770 0 g/L(II)、绿原酸为 0.678 5 g/L(III)、芍药苷为 1.153 0 g/L(IV)的对照品贮备溶液,再分别精密吸取各 5.0 mL,置 25 mL 棕色容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(V,梓醇为 0.156 g/L、哈巴苷为 0.154 g/L、芍药苷为 0.230 6 g/mL、绿原酸为 0.135 7 g/L)。精密吸取中风合剂样品 5 mL,置 25 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶

液。按处方比例制备不含玄参、忍冬藤、生地和白芍的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验:分别取 2.2 项下 3 种溶液各适量,在拟订色谱条件下,依法进样。阴性对照品溶液的色谱图中,在梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷色谱峰保留时间的相应位置上无干扰峰出现。色谱图见图 1。

线性关系考察:分别精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mL,置 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,即得系列对照品溶液。再分别精密吸取系列对照品溶液各 10 μL,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、对照品进样量(X)为横坐标进行线性回归。结果见表 1。

表1 各成分回归方程、相关系数及线性范围(n=8)

成分	回归方程	相关系数(r)	线性范围(μg)
梓醇	$Y = 2.1534X + 0.1443$	0.9999	0.156~1.248
哈巴苷	$Y = 2.992X + 0.0098$	0.9999	0.154~1.232
绿原酸	$Y = 33.541X - 0.0205$	1.0000	0.136~1.086
芍药苷	$Y = 14.555X - 0.077$	0.9999	0.231~1.845

精密度试验:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 10 μL,按拟订色谱条件连续进样 6 次,测定。结果梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.82%, 0.34%, 0.15%, 1.56% (n=6),表明仪器精密程度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为 20161215),室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定。结果梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.62%, 0.71%, 0.13%, 0.24% (n=8),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:精密量取同一批(批号为 20161215)样品 6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.25%, 1.62%, 1.21%, 1.34% (n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取同一批(批号为 20161215)

样品 2.5 mL,共 6 份。每份样品分别精密加入梓醇对照品贮备液(Ⅰ)0.97 mL、哈巴昔对照品贮备液(Ⅱ)0.84 mL、绿原酸对照品贮备液(Ⅲ)0.45 mL 和芍药苷对照品贮备液(Ⅳ)1.71 mL,依法制备供试品溶液,依法进样测定并计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量 (mL)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
梓醇	2.5	0.753 5	0.756 7	1.510 0	99.97	99.47	0.54
	2.5	0.753 5	0.756 7	1.503 4	99.10		
	2.5	0.753 5	0.756 7	1.506 2	99.47		
	2.5	0.753 5	0.756 7	1.508 3	99.75		
	2.5	0.753 5	0.756 7	1.499 7	98.61		
	2.5	0.753 5	0.756 7	1.510 0	99.97		
哈巴昔	2.5	0.644 8	0.646 8	1.279 0	98.05	99.54	0.91
	2.5	0.644 8	0.646 8	1.295 0	100.53		
	2.5	0.644 8	0.646 8	1.291 0	99.91		
	2.5	0.644 8	0.646 8	1.285 0	98.98		
	2.5	0.644 8	0.646 8	1.289 0	99.60		
	2.5	0.644 8	0.646 8	1.293 0	100.22		
绿原酸	2.5	0.294 2	0.305 3	0.599 1	99.87	99.89	0.23
	2.5	0.294 2	0.305 3	0.598 6	99.71		
	2.5	0.294 2	0.305 3	0.599 6	100.03		
	2.5	0.294 2	0.305 3	0.598 9	99.80		
	2.5	0.294 2	0.305 3	0.600 3	100.26		
	2.5	0.294 2	0.305 3	0.598 4	99.64		
芍药苷	2.5	1.970 0	1.971 6	3.950 0	100.43	99.94	0.35
	2.5	1.970 0	1.971 6	3.932 0	99.51		
	2.5	1.970 0	1.971 6	3.941 0	99.97		
	2.5	1.970 0	1.971 6	3.947 0	100.27		
	2.5	1.970 0	1.971 6	3.938 0	99.82		
	2.5	1.970 0	1.971 6	3.935 0	99.67		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定并计算含量。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(g/L)

批号	梓醇	哈巴昔	绿原酸	芍药苷
20161215	0.301 4	0.257 9	0.117 7	0.788 0
20170114	0.296 0	0.241 0	0.114 8	0.775 0
20170209	0.291 6	0.248 3	0.115 1	0.794 8
$\bar{X}$	0.296 0	0.249 0	0.116 0	0.786 0
RSD(%)	1.69	3.21	1.72	1.27

3 讨论

2015 年版《中国药典(一部)》收载有梓醇、哈巴昔、绿原酸及芍药苷的高效液相色谱法,但未收载同时测定这 4 种组分的试验^[1]。试验前,本研究中也考虑过使用紫外检测器来同时检测这 4 个成分,但因操作

较烦琐,而使用二极管阵列检测器(DAD)检测更加高效和节省时间。

曾取混合对照品溶液(V),通过 U3000 型液相色谱仪(配有 DAD 检测器),在 190~500 nm 波长范围内扫描。结果发现,梓醇和哈巴昔于 200 nm 波长处吸收值最大,绿原酸于 327 nm 波长处吸收值最强,芍药苷于 231 nm 波长处吸收值最大,并在此波长处无干扰。200 nm 波长处虽 4 个特征峰形能分离,但芍药苷与绿原酸的响应值相对较低。因此,参照以上色谱条件,设置 DAD 检测器为 3 个不同紫外波长同时测定 4 种待测成分,即于 200 nm 波长处测定梓醇、哈巴昔含量,于 327 nm 波长处测定绿原酸含量,于 231 nm 波长处测定芍药苷含量,各峰形基本上都能达到较理想的分离效果。此外,也尝试对木瓜的有效成分齐墩果酸和熊果酸进行考察,因这两者是同分异构体,液相色谱法的分离效果不佳,故未对制剂中木瓜的含量进行测定,这是本试验的不完善之处。以后可考虑通过液相色谱-质谱联法区分。

分别考察了 10%、30%、50%、70%、90% 甲醇和甲醇 6 种稀释溶剂对提取结果的影响^[4]。结果发现,不同体积分数的甲醇对哈巴昔、绿原酸、芍药苷的含量提取基本一致,而梓醇采用 50% 甲醇为溶剂,含量提取更高。因此,选择 50% 甲醇作为稀释溶剂。

综上所述,采用高效液相色谱多波长法同时测定制剂中多个组分,较单通道检测方法操作简单,减少了操作步骤,节省了时间,可用作中风合剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 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,2015:105,117,124,193.
- [2] 杨 辉. 双波长 UPLC 法同时测定艾滋病口腔含漱液中梓醇、哈巴昔和哈巴俄昔的含量[J]. 中国药房,2015,26(24): 3414-3416.
- [3] 龚友兰,向大雄,邓长风,等. HPLC-UV 双波长法同时测定玄参中 5 种主要成分的含量[J]. 中南药学,2008,6(6):660-663.
- [4] 季宁平,徐晓秋,傅超美,等. HPLC 法同时测定艾附暖宫丸中芍药苷、阿魏酸和川断续皂苷 VI[J]. 中成药,2015,37(3):534-537.
- [5] 周 佳,齐红艺. HPLC-MS/MS 法同时测定玄参中 8 个成分的含量[J]. 中国现代中药,2017,19(5):670-674.
- [6] 印 酬,向红霞,王洪凤,等. 贵州不同地区山银花中 4 种异绿原酸含量测定方法的建立[J]. 贵州医科大学学报,2016, 41(10):1176-1180.
- [7] 张中亮,聂黎行. HPLC 法同时测定小儿清咽颗粒中 5 种成分的含量[J]. 中国药房,2017,28(21):3004-3007.
- [8] 何建雄,赖小平,魏 刚,等. HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):48-50.
- [9] 梁化菊. 桃红四物汤水提液中芍药苷及梓醇含量检测分析[J]. 中国处方药,2015,13(10):23-24.

(收稿日期:2018-12-06)