

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.014

高效液相色谱法同时测定肝达康颗粒中5种成分含量

毕秋左, 钱 洲

(云南省曲靖市食品药品检验检测中心, 云南 曲靖 655000)

摘要:目的 建立测定肝达康颗粒中芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 Hypersil ODS2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(线性梯度洗脱), 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 237 nm。结果 5 种成分均能达到基线分离, 且在相应范围内线性关系良好; 芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的平均加样回收率分别为 98.86%, 98.96%, 99.86%, 98.71%, 98.04%, RSD 分别为 0.45%, 0.32%, 0.40%, 0.70%, 0.40% (n=6)。结论 该方法简便易行, 结果稳定, 可用于肝达康颗粒的质量控制。

关键词:肝达康颗粒; 高效液相色谱法; 芍药苷; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 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(2020)19-0049-03

Simultaneous Determination of Five Components in Gandakang Granules by HPLC

BI Qiuzuo, QIAN Zhou

(Qujing City Food and Drug Testing Center, Qujing, Yunnan, China 655000)

Abstract: Objective A high performance liquid chromatography(HPLC) method was established for the determination of paeoniflori, narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in Gandakang Granules. **Methods** A Hypersil ODS2 chromatographic column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, with the mobile phase of acetonitrile-water for linear gradient elution at the flow rate was 1 mL/min; the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 237 nm. **Results** All five components were well separated, and the calibration curves were linear in their corresponding ranges. The average recoveries of paeoniflori, narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin were 98.86%, 98.96%, 99.86%, 98.71%, 98.04%, respectively; RSDs were 0.45%, 0.32%, 0.40%, 0.70%, 0.40%, respectively (n=6).

Conclusion This method is simple, convenient, and stable, which can be used for the quality control of Gandakang Granules.

Key words: Gandakang Granules; high performance liquid chromatography; paeoniflorin; narirutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; content determination

肝达康颗粒具有疏肝理脾、化瘀通络功效, 用于治疗肝郁脾虚兼血瘀所致的胁痛腹胀、肋下痞块、疲乏纳差、大便溏薄、慢性乙型肝炎见上述证候者^[1]。该制剂由柴胡(醋炙)、白芍(醋炙)、当归(酒炙)、枳实(麸炒)、青皮(麸炒)、茜草等组方。方中白芍养血调经, 敛阴止汗, 柔肝止痛, 平抑肝阳^[2], 芍药苷为主要有效成分之一; 枳实有行气宽中、消食、化痰功能^[3]; 青皮舒肝破气, 消积化滞作用。枳实和青皮均属芸香科柑橘属, 物质基础基本相同^[4], 均含有橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷。该制剂收载于国家食品药品监督管理局国家药品标

准, 但该标准仅对芍药苷进行了含量测定^[5]。为更全面地评价肝达康颗粒的质量, 本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时对其中芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 5 种主要成分的含量进行了测定。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

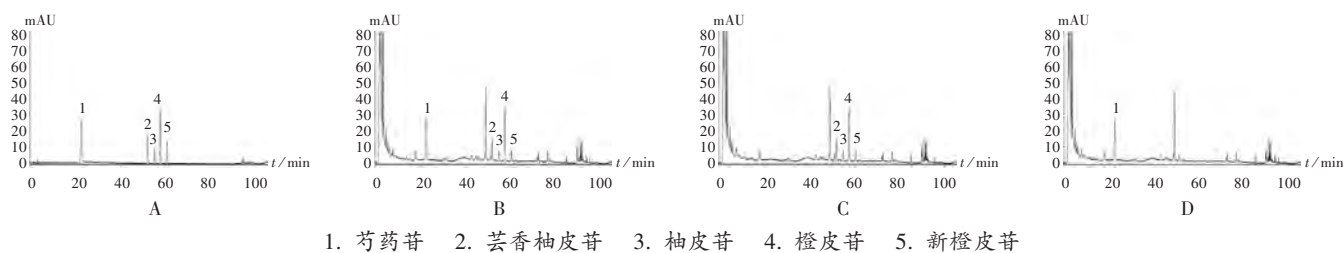
1200 型高效液相色谱仪, 包括 G1311A 型四元泵、G1329A ALS 型自动进样器、G1316A TCC 型柱温箱和 G1315D 型可变波长紫外吸收检测器(美国 Agilent 公

第一作者: 毕秋左, 女, 大学本科, 主管药师, 主要从事食品药品质量控制工作, (电子信箱)412812414@qq.com。

学的青叶胆及其近缘种亲缘关系研究[J]. 中草药, 2019, 50(12):2983-2989.
[9] 李颖娜, 吴楠, 王宇亮, 等. 近红外光谱-系统聚类法快速测定煤炭品质[J]. 兰州理工大学学报, 2012, 38(1):59-62.
[10] 李胜军, 李俏丽. 基于 ICP-MS 法测定土壤中金属元素分析[J]. 世界有色金属, 2019(21):151-152.
[11] ZHANG J, WEI XH, DAI WD, et al. Study of enrichment difference of 64 elements among white tea subtypes and tea leaves of different maturity using inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Food Research International, 2019(126):108655.

[12] 黄赛金, 欧苗, 龚灯, 等. 补阳中药矿物质元素主成分分析和聚类分析研究[J]. 广州化工, 2017, 45(8):110-112.
[13] 蔡晓洋, 张思荻, 曾俊, 等. 基于主成分分析和聚类分析的栀子种质资源评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14):30-37.
[14] 王领弟, 杜义龙, 杨明宇, 等. 聚类分析和主成分分析法研究刺玫果指纹图谱[J]. 中国现代中药, 2017, 19(4):514-517.
[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一增补本)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018:496-497.

(收稿日期: 2020-02-07; 修回日期: 2020-03-27)



1. 芍药苷 2. 芸香柚皮苷 3. 柚皮苷 4. 橙皮苷 5. 新橙皮苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白芍药阴性对照品溶液 D. 空白枳实、青皮阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

司);MS205DU型电子天平(梅特勒-托利多贸易<上海>有限公司,精度为十万分之一);WF-500EHT型超声波清洗机(宁波海曙五方超声波设备有限公司,功率为250 W,频率为45 kHz)。

1.2 试药

肝达康颗粒(国药集团德众<佛山>药业有限公司,国药准字Z10980159,批号分别为18010,18015,19001,规格为每袋4 g);乙腈(色谱纯,德国默克股份有限公司,批号为75-05-8);甲醇(分析纯,天津市风船化学试剂有限公司,批号为20181101);水为娃哈哈纯净水;芍药苷对照品(批号为110736-201741,含量为95.7%),橙皮苷对照品(批号为110721-201818,含量为96.2%),柚皮苷对照品(批号为110722-201714,含量为93.4%),新橙皮苷对照品(批号为111857-20103,含量为99.2%),均购自中国食品药品检定研究院;芸香柚皮苷对照品(批号为101880,含量大于98%,江苏永建医药科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:依利特Hypersil ODS2柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(B)-水(A),梯度洗脱(0~30 min时8% B,30~36 min时8% B~13% B,36~60 min时13% B~19% B,60~85 min时19% B~33% B,85~90 min时33% B~80% B,90~95 min时80% B,95~100 min时80% B~8% B,100~105 min时8% B);检测波长:237 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃。

2.2 溶液制备

供试品溶液:取样品适量,研细,取2.0 g,精密称定,置150 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定,超声提取30 min,取出,放冷,用70%甲醇补足损失的质量,过滤,取续滤液,即得。

对照品溶液:取芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品适量,精密称定,置25 mL容量瓶中,用甲醇溶解成每1 mL分别含0.388 2,0.234 8,0.115 6,0.359 0,0.137 3 mg的混合贮备溶液。再精密吸取上述贮备液2 mL,置10 mL容量瓶中,用70%甲醇

稀释成每1 mL分别含0.077 64,0.047 68,0.023 12,0.071 80,0.027 46 mg的混合对照品溶液。

阴性对照品溶液:按肝达康颗粒处方工艺,制备不含白芍(醋炙)、枳实(麸炒)和青皮(麸炒)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

专属性试验:取2.2项下3种溶液,按拟订色谱条件进样测定,色谱图见图1。可见,阴性对照无干扰,该方法专属性良好。

线性关系考察:精密吸取2.2项下对照品贮备溶液0.1,0.5,1.0,2.0,4.0 mL,置10 mL容量瓶中,用70%甲醇溶液定容,制成浓度梯度对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度(C)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 5种成分的线性关系考察结果

成分	线性回归方程	线性范围(μg/mL)	r
A	$A = 12.50962C - 14.18446$	3.88~155.28	0.9996
B	$A = 7.22417C + 7.16409$	2.35~93.92	0.9999
C	$A = 8.50104C + 3.89732$	1.16~46.24	0.9999
D	$A = 9.40665C + 11.68029$	3.59~143.60	0.9996
E	$A = 10.54712C + 4.03539$	1.37~54.92	0.9999

注:A为芍药苷,B为芸香柚皮苷,C为柚皮苷,D为橙皮苷,E为新橙皮苷。下表同。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液,按拟订色谱条件连续进样6次,测定。结果芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD分别为0.41%,0.59%,0.65%,0.38%,0.62%(n=6),表明仪器精密程度良好。

重复性试验:取同一批(批号为18010)样品,约2.0 g,精密称定,共6份,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。结果样品中芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD分别为0.20%,0.33%,0.48%,0.31%,0.56%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为18010)样品,依法制备供试品溶液,于配制后0,4,8,12,16,24 h时按拟

订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.49%, 0.56%, 0.70%, 0.44%, 0.65% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 18010)适量,研细,取 6 份,每份约 1 g,精密称定,置 150 mL 锥形瓶,精密加入 2.2 项下对照品贮备液 4 mL,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。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
A	1.003 1	1.694 0	1.552 8	3.220 0	98.27	98.86	0.45
	1.020 1	1.722 7	1.552 8	3.254 0	98.61		
	1.001 6	1.691 5	1.552 8	3.232 0	99.21		
	1.132 1	1.911 9	1.552 8	3.443 0	98.60		
	1.185 5	2.002 1	1.552 8	3.546 5	99.46		
	1.000 9	1.690 3	1.552 8	3.227 5	99.00		
B	1.003 1	0.882 1	0.939 2	1.811 0	98.90	98.96	0.32
	1.020 1	0.897 1	0.939 2	1.827 0	99.01		
	1.001 6	0.880 8	0.939 2	1.815 5	99.52		
	1.132 1	0.995 6	0.939 2	1.923 5	98.80		
	1.185 5	1.042 5	0.939 2	1.972 0	98.97		
	1.000 9	0.880 2	0.939 2	1.806 0	98.57		
C	1.003 1	0.429 7	0.462 4	0.890 0	99.55	99.86	0.40
	1.020 1	0.437 0	0.462 4	0.900 0	100.13		
	1.001 6	0.429 1	0.462 4	0.890 5	99.78		
	1.132 1	0.485 0	0.462 4	0.949 0	100.35		
	1.185 5	0.507 9	0.462 4	0.967 0	99.29		
	1.000 9	0.428 8	0.462 4	0.891 5	100.06		
D	1.003 1	1.895 7	1.436 0	3.317 5	99.01	98.71	0.70
	1.020 1	1.927 8	1.436 0	3.336 5	98.10		
	1.001 6	1.892 8	1.436 0	3.304 5	98.31		
	1.132 1	2.139 4	1.436 0	3.556 5	98.68		
	1.185 5	2.240 4	1.436 0	3.675 5	99.94		
	1.000 9	1.891 5	1.436 0	3.302 0	98.22		
E	1.003 1	0.503 1	0.549 2	1.044 7	98.62	98.04	0.40
	1.020 1	0.511 6	0.549 2	1.049 1	97.87		
	1.001 6	0.502 3	0.549 2	1.042 8	98.42		
	1.132 1	0.567 7	0.549 2	1.103 6	97.58		
	1.185 5	0.594 5	0.549 2	1.132 5	97.96		
	1.000 9	0.502 0	0.549 2	1.039 1	97.80		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算含量。结果样品中芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的平均含量分别为 1.6935, 0.883 7, 0.429 7, 1.886 9, 0.508 3 mg/g, 详见表 3。

表 3 样品含量测定结果(mg/g)

批号	A	B	C	D	E
18010	1.688 8	0.879 4	0.428 4	1.889 8	0.501 5
18015	1.679 3	0.881 6	0.429 9	1.891 1	0.512 4
19001	1.712 5	0.890 2	0.430 8	1.879 9	0.511 1

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

曾比较了甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇 3 种溶剂对样品提取效果的影响,结果显示,3 种溶剂对各目标物的提取效率无明显差异。对比色谱图发现,以 50% 甲醇作为提取溶剂时目标峰附近杂质较多,参考文献[6],故选择 70% 甲醇作为提取溶剂。

3.2 提取方法及时间选择

曾考察了超声提取和加热回流提取,加热回流提取所得样品溶液冷却后不易滤过,超声提取效果良好,且简便易行;再对提取时间 0.2, 0.5, 1.0 h 的提取效率进行考察,发现 0.5 h 和 1.0 h 提取效率无明显差异,参考文献[7],故选择超声提取 0.5 h。

3.3 流动相选择

预试验中,比较了乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.4% 磷酸及乙腈-水,发现以乙腈-水系统作为流动相时,各成分峰型良好,基线平稳,分离效果符合要求,且配制简单方便,故流动相选择乙腈-水。

3.4 检测波长选择

采用二极管阵列检测器对样品进行全波长扫描,发现各待测组分于 237 nm 波长处响应均良好,故选择检测波长为 237 nm。

参考文献:

- [1] 王云翠,李圣洁,熊振芳,等. 肝郁脾虚型慢性乙型肝炎患者中医辨证施护的理论研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(5): 1164-1166.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:105.
- [3] 中国医学科学院药物研究所. 中药志(第三册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:42-43.
- [4] 吕青林,冯 锋. 枳实与青皮主要化学成分对比研究[J]. 北方药学,2013,10(5):8-9.
- [5] WS₃-131(Z-131)-2003(Z),国家食品药品监督管理局国家药品标准[S].
- [6] 马福家,仓 婕,孔 铭,等. 不同生长年限白芍中主要成分含量的比较研究[J]. 上海医药,2016,37(15):75-79.
- [7] 刘晶晶,胡晓茹,何 轶,等. HPLC 测定牛黄清胃丸中枳实所含 4 种黄酮类成分及其药材基原分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(18):155-159.

(收稿日期:2020-01-15;二次修回日期:2020-04-05)