

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.15.022

高效液相色谱法同时测定寒热痹颗粒中5种成分含量*

刘天竹¹, 李成森¹, 刘博琳², 李虹¹, 周春玲^{1△}

(1. 辽宁省检验检测认证中心·辽宁省药品检验检测院, 辽宁 沈阳 110000; 2. 中国医科大学药学院, 辽宁 沈阳 110000)

摘要:目的 建立同时测定芒果苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸和芍药苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent SB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。结果 芒果苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸和芍药苷的质量浓度分别在 5.10~101.90 μg/mL($r=0.999\ 9$), 9.66~193.20 μg/mL($r=0.999\ 9$), 9.56~191.20 μg/mL($r=0.999\ 8$), 9.88~197.60 μg/mL($r=0.999\ 9$), 98.85~1 977.00 μg/mL($r=0.999\ 9$) 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$);平均加样回收率分别为 95.26%, 96.88%, 98.97%, 94.86%, 95.55%, RSD 分别为 1.05%, 0.82%, 1.38%, 0.72%, 0.66% ($n=6$)。结论 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于寒热痹颗粒的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 寒热痹颗粒; 芒果苷; 升麻素苷; 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 肉桂酸; 芍药苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)15-0078-04

Simultaneous Determination of Five Components in Hanrebi Granules by HPLC

LIU Tianzhu¹, LI Chengsen¹, LIU Bolin², LI Hong¹, ZHOU Chunling¹

(1. Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre · Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang, Liaoning, China 110000; 2. College of Pharmacy, China Medical University, Shenyang, Liaoning, China 110000)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of mangiferin, cinnamic acid, 5-O-methylvisamminoside, cinnamic acid and paeoniflorin in Hanrebi Granules. **Methods** The chromatographic column was Agilent SB C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of mangiferin, cinnamic acid, 5-O-methylvisamminoside, cinnamic acid and paeoniflorin were 5.10-101.90 μg/mL($r=0.999\ 9$), 9.66-193.20 μg/mL($r=0.999\ 9$), 9.56-191.20 μg/mL($r=0.999\ 8$), 9.88-197.60 μg/mL($r=0.999\ 9$) and 98.85-1 977.00 μg/mL($r=0.999\ 9$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$). The average recoveries of mangiferin, cinnamic acid, 5-O-methylvisamminoside, cinnamic acid and paeoniflorin were 95.26%, 96.88%, 94.51%, 98.97%, 95.55% with RSDs of 1.05%, 0.82%, 1.38%, 0.72%, 0.66% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Hanrebi Granules.

Key words: HPLC; Hanrebi Granules; mangiferin; cinnamic acid; 5-O-methylvisamminoside; cinnamic acid; paeoniflorin; content determination

寒热痹颗粒由桂枝、防风、知母、白芍、麻黄、附子、白术、干姜、地龙、甘草组方,具有散寒清热、和营定痛功效,用于肌肉关节疼痛,局部触之发热,自觉怕冷畏寒,或虽触之不热但自觉发热,全身热象不显,以及风湿和类风湿关节炎见上述证候者。现行标准 WS_{3-B-3104-98} 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十六册)》,无含量测定项^[1]。方中,桂枝发汗解肌,温通经脉,助阳化气,平冲降气^{[2]288};防风祛风解表,胜湿止痛,止痉^{[2]156};知母清热泻火,滋阴润燥^{[2]222};白芍养血调经,敛阴止汗,柔肝止痛,平抑肝阳^{[2]108}。为更全面地控制寒热痹颗粒的质量,参考文

献[3-5],分别选取上述4味药材中相关活性成分进行含量测定,建立了可同时测定寒热痹颗粒中芒果苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸和芍药苷5种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),配有四元泵;Auto science 10200AD 型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率为 280 W,频率为 40 kHz);TU-1950 型分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);Sartorius BSA 224S-CW 型电子天平(精度

*基金项目:国家药典委员会药品标准修订研究课题[2019Z036]。

第一作者:刘天竹,女,蒙古族,硕士,副主任药师,研究方向为中药材及其成药的成分分析及质量控制,(电子信箱)liutianzhu123@hotmail.com。

△通信作者:周春玲,女,博士,主任药师,研究方向为中药药效物质基础及中药质量控制,(电子信箱)zhouchun-ling@163.com。

为万分之一), Sartorius CP225D 型电子天平(精度为十万分之一), 均购于德国赛多利斯公司。

1.2 试药

芒果苷对照品(批号为 111607-201503, 纯度为 98.4%), 升麻素苷对照品(批号为 111522-201511, 纯度为 94.8%), 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号为 111523-201610, 纯度为 96.1%), 肉桂酸对照品(批号为 110786-201604, 纯度为 98.8%), 芍药苷对照品(批号为 110736-201943, 纯度为 95.1%), 均购于中国食品药品检定研究院; 寒热痹颗粒(辽宁上药好护士药业<集团>有限公司, 规格为每袋 10 g, 批号分别为 20191101, 20190302, 20190903, 20190602, 20181005, 20180701, 201803030, 20171203, 20171202, 20171001); 乙腈(美国天地有限公司), 磷酸(国药集团化学试剂有限公司, 批号为 T20090710), 均为色谱纯; 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent SB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(程序见表 1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10.0 μL。

2.2 溶液制备

取芒果苷对照品、升麻素苷对照品、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品、肉桂酸对照品、芍药苷对照品各适量, 精密称定, 加入 70% 甲醇, 分别制成每 1 mL 含芒果苷 101.9 μg、升麻素苷 193.2 μg、5-O-甲基维斯阿米

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~5	8→10	92→90
5~30	10→15	90→85
30~35	15	85
35~70	15→30	85→70

醇苷 191.2 μg、肉桂酸 197.6 μg、芍药苷 1.977 mg 的混合对照品贮备液, 以及每 1 mL 含芒果苷 10.19 μg、升麻素苷 19.32 μg、5-O-甲基维斯阿米醇苷 19.12 μg、肉桂酸 19.76 μg、芍药苷 0.197 7 mg 的混合对照品溶液。取装量差异项下样品适量, 混匀, 研细, 取样品粉末 5.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率为 280 W, 频率为 45 kHz)30 min, 放冷, 称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜(0.22 μm)滤过, 即得供试品溶液。分别按处方比例和制备工艺制备不含知母、白芍、防风、桂枝的阴性样品, 按供试品溶液制备方法分别制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取上述混合对照品溶液、供试品溶液和 4 种阴性对照品溶液各 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。理论板数按肉桂酸峰计应不低于 5000。结果供试品溶液色谱图中, 在与混合对照品溶液色谱峰相应位置上有相同的色谱峰出现, 且各阴性对照均无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察: 分别精密吸取对照品贮备液 0.5,

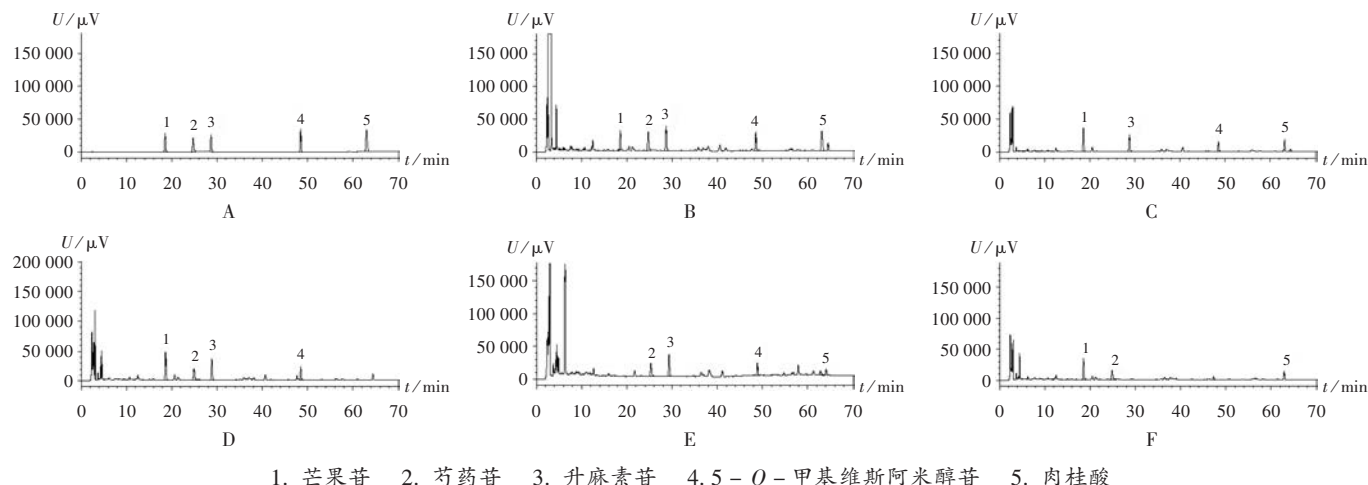


图 1 高效液相色谱图

1. mangiferin 2. paeoniflorin 3. cimicifugin 4. 5-O-methylvisamminoside 5. cinnamic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution lacking *Paeonia lactiflora* D. Negative reference solution lacking *Cinnamomum cassia* E. Negative reference solution lacking *Anemarrhena asphodeloides* F. Negative reference solution lacking *Saposhnikovia divaricate*

Fig. 1 HPLC chromatograms

1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 取 2.2 项下混合对照品溶液各 5 μ L, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。以进样质量浓度 (X , μ g/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程。详见表 2。

表 2 各成分线性关系考察及检测限与定量限测定结果 ($n=6$)
Tab. 2 Results of linear relation test, LOD and LOQ of each components ($n=6$)

成分	标准曲线	r	线性范围 (μ g/mL)	检测限 (ng, $n=3$)	定量限 (ng, $n=6$)
A	$Y=20\,453.71X-33\,657.58$	0.999 9	5.10~101.90	2.55	10.19
B	$Y=21\,923.67X-124\,938.67$	0.999 9	9.66~193.20	4.83	19.32
C	$Y=24\,692.40X-257\,630.79$	0.999 8	9.56~191.20	4.78	19.12
D	$Y=37\,862.64X-265\,146.68$	0.999 9	9.88~197.60	4.94	19.76
E	$Y=2\,278.94X-32\,350.29$	0.999 9	98.85~1\,977.00	49.42	197.70

注: A 为芒果苷, B 为升麻素, C 为 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, D 为肉桂酸, E 为芍药苷。表 3 至表 5 同。

Note: A is mangiferin, B is cimicifugin, C is 5-*O*-methylvisamminoside, D is cinnamic acid and F is paeoniflorin, as well as Tab. 3, Tab. 4 and Tab. 5.

检测限与定量限确定: 精密吸取混合对照品溶液 5.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 作为检测限测定所用对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 20.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇, 作为定量限测定所用对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件分别进样测定, 结果见表 2。

精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 10 μ L, 按 2.1 项下色谱条件重复进样测定 6 次, 记录色谱图。结果见表 3, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取样品 (批号为 20190602) 适量, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 分别于配制后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 3, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取样品 (批号为 20190602) 适量, 精密称定, 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 项下色谱条件下进样测定。结果见表 3, 表明方法重

表 3 精密度、稳定性及重复性试验结果 ($n=6$)

Tab. 3 Results of the precision, stability and repeatability tests ($n=6$)

成分	精密度的试验 RSD (%)	稳定性的试验 RSD (%)	重复性的试验	
			含量 (mg/g)	RSD (%)
A	0.19	0.37	0.102 5	1.10
B	1.33	1.28	0.261 4	0.56
C	0.95	0.89	0.182 6	0.22
D	0.35	0.36	0.224 0	1.20
E	0.30	0.28	2.668 0	1.28

复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品 (批号为 20190602) 2.5 g, 共 6 份, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 分别精密加入对照品溶液 (芒果苷 0.203 7 mg/mL、升麻素苷 0.772 8 mg/mL、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 0.478 0 mg/mL、肉桂酸 0.592 8 mg/mL、芍药苷 5.931 9 mg/mL) 各 1 mL, 蒸干, 依法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算回收率。结果见表 4。

2.4 样品含量测定

取 10 批样品, 按 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测定 3 次, 记录色谱图, 按外标法分别计算芒果苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸和芍药苷的含量。结果见表 5。

3 讨论

取芒果苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸和芍药苷对照品, 分别加甲醇溶解, 分别于 200~400 nm 波长范围内扫描, 5 种成分的最大吸收波长分别为 258, 254, 254, 285, 230 nm。升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的最大吸收波长均为 254 nm, 且其他成分在该波长处均有较好吸收, 故选择 254 nm 为测定波长。

按拟订色谱条件, 考察了不同品牌色谱柱 [Shiseido Capcell PAK C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Waters Sunfire C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 和 Aglient SB C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)] 对含量测定结果的影响。结果表明, 各种不同品牌色谱柱均可使样品有效分离,

表 4 各成分加样回收试验结果 ($n=6$)

Tab. 4 Results of the recovery test of each component ($n=6$)

取样量 (g)	样品含量(mg)					加入量(mg)					测得量(mg)					回收率(%)					$\bar{X}$ (%)					RSD(%)					
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	
2.512 2	0.257 5	0.656 7	0.458 7	0.562 7	6.702 3	0.203 7	0.772 8	0.458 0	0.592 8	5.931 9	0.449 1	1.404 4	0.921 4	1.124 2	12.399 1	94.06	96.75	101.03	94.72	96.04											
2.485 7	0.254 8	0.649 8	0.453 9	0.556 8	6.631 8	0.203 7	0.772 8	0.458 0	0.592 8	5.931 9	0.448 4	1.397 7	0.907 6	1.126 4	12.277 1	95.04	96.78	99.06	96.09	95.17											
2.513 4	0.257 6	0.657 0	0.458 9	0.563 0	6.705 8	0.203 7	0.772 8	0.458 0	0.592 8	5.931 9	0.452 1	1.403 9	0.917 3	1.121 2	12.401 8	95.48	96.65	100.09	94.16	96.02	95.26	96.88	98.97	94.86	95.55	1.05	0.82	1.38	0.72	0.66	
2.501 5	0.256 4	0.653 9	0.456 8	0.560 3	6.674 0	0.203 7	0.772 8	0.458 0	0.592 8	5.931 9	0.450 9	1.412 3	0.906 3	1.124 3	12.278 0	95.48	98.14	98.14	95.14	94.47											
2.514 6	0.257 7	0.657 3	0.459 2	0.563 3	6.709 0	0.203 7	0.772 8	0.458 0	0.592 8	5.931 9	0.450 4	1.397 0	0.907 9	1.124 2	12.379 3	94.60	95.72	97.97	94.62	95.59											
2.497 5	0.256 0	0.652 8	0.456 0	0.559 4	6.663 3	0.203 7	0.772 8	0.458 0	0.592 8	5.931 9	0.453 4	1.404 1	0.902 6	1.119 1	12.358 2	96.91	97.22	97.51	94.42	96.00											