

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.020

高效液相色谱法同时测定沉香化滞丸中 10 种成分含量

安艳苏, 许庆, 毕秋左

(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 建立同时测定沉香化滞丸中 10 种成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃。结果 云香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、和厚朴酚、厚朴酚、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别在 20.63~206.30 μg/mL, 15.43~154.28 μg/mL, 20.06~200.58 μg/mL, 2.40~24.00 μg/mL, 1.60~16.00 μg/mL, 3.36~33.60 μg/mL, 6.94~69.44 μg/mL, 10.78~107.82 μg/mL, 9.86~98.64 μg/mL, 3.47~34.66 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好(r 均大于 0.999); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3.0% ($n=6$), 平均加样回收率分别为 100.49%, 98.83%, 99.77%, 99.46%, 98.06%, 98.28%, 101.28%, 99.36%, 98.61%, 100.08%, RSD 分别为 1.26%, 1.91%, 1.40%, 1.90%, 1.19%, 1.49%, 1.47%, 2.22%, 1.62%, 1.70% ($n=6$)。结论 该方法简便、快捷, 结果准确, 可用于同时测定沉香化滞丸中 10 种成分的含量。

关键词:沉香化滞丸; 高效液相色谱法; 含量测定; 大黄

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)18-0079-04

Simultaneous Determination of 10 Components in Chenxiang Huazhi Pills by HPLC

AN Yansu, XU Qing, BI Qiuzuo

(Qujing Food and Drug Inspection Test Center, Qujing, Yunnan, China 655000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of 10 components in Chenxiang Huazhi Pills. **Methods** The chromatographic column was Hypersil ODS2 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results** The linear ranges of narirutin, naringin, neohesperidin, aloe-emodin, rhein, emodin, honokiol, magnolol, chrysophanol and physcion were 20.63–206.30 μg/mL, 15.43–154.28 μg/mL, 20.06–200.58 μg/mL, 2.40–24.00 μg/mL, 1.60–16.00 μg/mL, 3.36–33.60 μg/mL, 6.94–69.44 μg/mL, 10.78–107.82 μg/mL, 9.86–98.64 μg/mL, 3.47–34.66 μg/mL ($r > 0.999$). The RSD s of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0% ($n=6$), and the average recoveries of narirutin, naringin, neohesperidin, aloe-emodin, rhein, emodin, honokiol, magnolol, chrysophanol and physcion were 100.49%, 98.83%, 99.77%, 99.46%, 98.06%, 98.28%, 101.28%, 99.36%, 98.61% and 100.08% with RSD s of 1.26%, 1.91%, 1.40%, 1.90%, 1.19%, 1.49%, 1.47%, 2.22%, 1.62% and 1.70% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which can be used for the simultaneous determination of 10 components in Chenxiang Huazhi Pills.

Key words: Chenxiang Huazhi Pills; HPLC; content determination; Rhei Radix et Rhizoma

沉香化滞丸是非处方药, 由沉香、牵牛子、枳实、五灵脂、山楂、枳壳、陈皮、香附、厚朴、莪术、砂仁、大黄等 15 味中药组方, 有理气化滞功效, 可用于治疗饮食停滞、胸腹胀满等证^[1]。其现行标准中仅有理化鉴别项, 在质量控制中稍显不足。陈皮、枳壳、厚朴、大黄为方中主药, 含有芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等 10 种成分^[1-5], 基于中药成方的复杂性, 中成药质量控制的特点, 要求采用综合量化的手段控制其质量的稳定性和有效性。本研究中采用高效液相色谱法同时测定沉香化滞丸中上述 10 种成分的含量^[3-8]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪, 包括 G7111A 型四元泵、

G7129A 型自动进样器及柱温箱、G7115A 型紫外检测器(美国 Agilent 公司); MS205DU 型电子分析天平(梅特勒托利多仪器(上海)有限公司); KQ-300UDB 型双频数控超声清洗器(昆明市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

沉香化滞丸(陕西汉王药业股份有限公司, 批号为 002805, 002802; 河南润红本草制药有限公司, 批号为 190904; 安阳路德药业有限公司, 批号为 180608); 芸香柚皮苷对照品(北京坛墨质检科技有限公司, 批号为 20170304, 含量为 99.2%); 柚皮苷对照品(批号为 110722-201613, 含量为 94.3%), 新橙皮苷对照品(批号为 111857-201703, 含量为 99.2%), 芦荟大黄素对照品(批号为 110795-201609, 含量为 98.1%), 大黄酸对照品(批号为 110757-201607, 含量为 99.3%), 大黄

素对照品(批号为110756-201512,含量为98.7%),和厚朴酚对照品(批号为110730-201614,含量为99.3%),厚朴酚对照品(批号为110729-201513,含量为98.8%),大黄酚对照品(批号为110796-201621,含量为99.2%),大黄素甲醚对照品(批号为110758-201415,含量为99.1%),均购于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min时80% A,10~25 min时80% A→60% A,25~40 min时60% A,40~55 min时60% A→35% A,55~70 min时35% A,70~70.5 min时35% A→80% A,70.5~75 min时80% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品贮备液I:分别取芦荟大黄素对照品15.30 mg,大黄酸对照品10.08 mg,精密称定,置同一10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容;精密量取5 mL,置已有大黄素对照品10.64 mg、大黄素甲醚对照品10.93 mg的25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得。

混合对照品贮备液II:取和厚朴酚对照品17.48 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容;精密量取5 mL,置已有厚朴酚对照品13.64 mg,大黄酚对照品12.43 mg的10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得。

混合对照品贮备液III:取柚皮苷16.36 mg,精密称定,

置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容;精密量取5 mL,置已有芸香柚皮苷对照品10.40 mg,新橙皮苷10.11 mg的10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得。

混合对照品溶液:取混合对照品贮备液I和II各0.2 mL,混合对照品贮备液3 0.5 mL,置同一5 mL容量瓶中,加甲醇定容,即得芸香柚皮苷(103.17 μg/mL)、柚皮苷(77.14 μg/mL)、新橙皮苷(100.29 μg/mL)、芦荟大黄素(12.01 μg/mL)、大黄酸(8.01 μg/mL)、大黄素(16.80 μg/mL)、和厚朴酚(34.72 μg/mL)、厚朴酚(53.91 μg/mL)、大黄酚(49.32 μg/mL)、大黄素甲醚(17.33 μg/mL)的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品适量,研细,精密称取1.25 g,置25 mL容量瓶中,加甲醇20 mL,超声(功率240 W,频率45 kHz,下同)处理40 min,放至室温,用甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按沉香化滞丸处方和工艺分别制备缺陈皮和枳壳、缺厚朴、缺大黄的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:取2.2项下溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。理论板数按芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、和厚朴酚、厚朴酚、大黄酚、大黄素甲醚峰计分别为11 573,12 426,51 684,96 019,73 385,392 110,628 638,755 833,308 090,203 228;10个成分均分离完全,基线分离良好;阴性对照品溶液色谱图中,在与混合对照品溶液色谱相应保留时间处无干扰峰,专属性良好。详见图1。

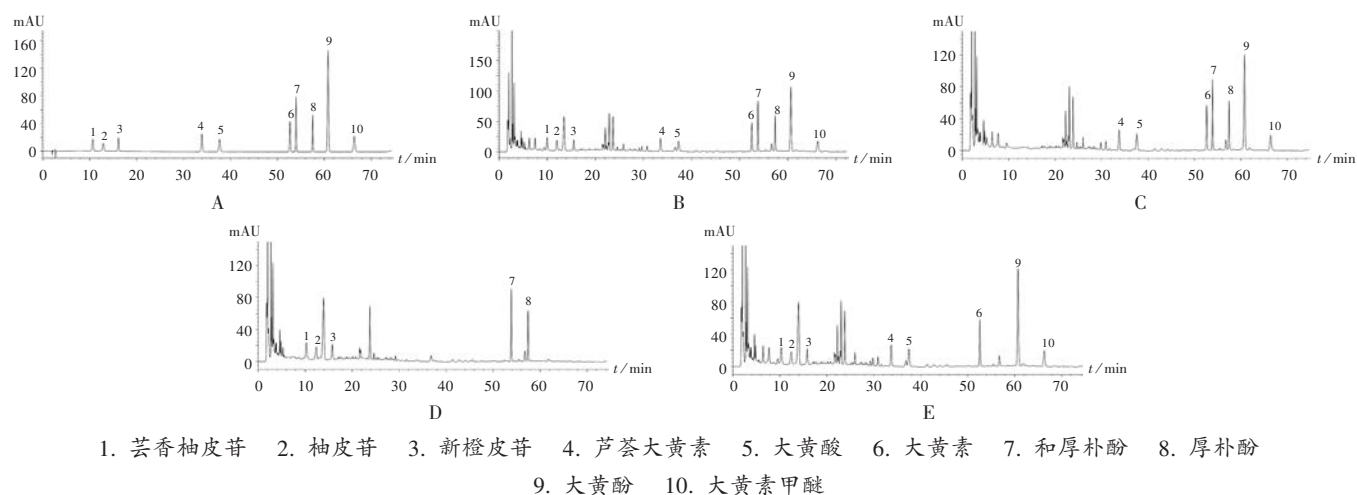


图1 高效液相色谱图

1. narinrutin 2. naringin 3. neohesperidin 4. aloe-emodin 5. rhein 6. emodin 7. honokiol 8. magnolol 9. chrysophanol 10. physcion
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution without Aurantii Fructus and Pericarpium Citri Reticulatae
D. Negative reference solution without Rhei Radix et Rhizoma E. Negative reference solution without Magnoliae Officinalis Cortex

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 方法学考察结果
Tab. 1 Results of the methodological investigations

成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	精密度的RSD(%)	稳定性的RSD(%)	重复性的RSD(%)	加样回收试验	
							回收率(%)	RSD(%)
芸香柚皮苷	$Y_1 = 2.9652X_1 + 25.6622$	0.9991	20.63 ~ 206.30	0.69	1.02	1.80	100.49	1.26
柚皮苷	$Y_2 = 3.2492X_2 + 15.4028$	0.9993	15.43 ~ 154.28	0.84	0.89	2.21	98.83	1.91
新橙皮苷	$Y_3 = 2.5518X_3 + 6.1434$	0.9994	20.06 ~ 200.58	0.77	1.12	1.67	99.77	1.40
芦荟大黄素	$Y_4 = 38.2206X_4 + 2.2355$	1.0000	2.40 ~ 24.00	0.83	1.05	1.82	99.46	1.90
大黄酸	$Y_5 = 50.3230X_5 + 1.8505$	1.0000	1.60 ~ 16.00	0.97	1.30	1.42	98.06	1.19
大黄素	$Y_6 = 35.5968X_6 + 3.9755$	0.9999	3.36 ~ 33.60	0.78	1.05	1.61	98.28	1.49
和厚朴酚	$Y_7 = 24.8756X_7 + 4.7580$	1.0000	6.94 ~ 69.44	0.79	0.99	1.77	101.28	1.47
厚朴酚	$Y_8 = 10.4455X_8 + 4.1320$	1.0000	10.78 ~ 107.82	0.68	1.31	1.95	99.36	2.22
大黄酚	$Y_9 = 51.1460X_9 + 12.4951$	1.0000	9.86 ~ 98.64	0.88	1.45	1.70	98.61	1.62
大黄素甲醚	$Y_{10} = 30.5842X_{10} - 7.1516$	0.9999	3.47 ~ 34.66	0.67	0.95	1.61	100.08	1.70

表2 样品含量测定结果(mg/g , $n=3$)
Tab. 2 Content determination of 10 components in the samples(mg/g , $n=3$)

批号	芸香柚皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	和厚朴酚	厚朴酚	大黄酚	大黄素甲醚
002805	2.17	1.52	1.98	0.20	0.16	0.38	0.72	1.14	0.72	0.28
002802	2.31	1.71	2.05	0.22	0.17	0.42	0.75	1.20	0.78	0.30
190904	2.55	1.89	2.30	0.38	0.29	0.51	0.89	1.35	0.86	0.37
180608	2.03	1.46	2.00	0.25	0.20	0.33	0.69	1.08	0.75	0.33

线性关系考察:分别精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,加流动相制成系列混合对照品溶液。取10 μL ,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,其回归方程及线性关系见表1。

精密度的试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果见表1,可见仪器精密性良好。

稳定性的试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0,4,8,12,16,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表1,可见供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性的试验:取样品(批号为002805)适量,精密称定,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表1,可见方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为002805)适量,共6份,分别加2.2项下混合对照品贮备液Ⅲ1.0 mL,混合对照品贮备液Ⅰ和Ⅱ各0.5 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取各批样品适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

样品提取条件优化^[5-6]:预试验中分别选择超声、回流、索氏提取3种方法进行考察^[8-9],结果表明,超声提取效率最高,且简便快捷,故试验选用超声提取法制备供试品溶液。并比较了超声提取20,30,40,60,90 min的效果,结果显示超声提取40,60,90 min时的结果一致,故以40 min为提取时间。对提取溶剂(甲醇、乙醇、稀乙醇)进行优化,发现甲醇提取后,各成分总含量优于乙醇和稀乙醇提取,且杂质明显少于乙醇提取,故以甲醇为提取溶剂。

检测波长选择^[5]:由于样品组方药物较多,化学成分复杂且多样,本研究中一次检测就可控制样品中陈皮、枳壳、厚朴、大黄4味药材的质量。以DAD扫描结果,结合色谱峰及峰强度,对200~400 nm波长范围内的色谱进行分析。结果,在254 nm波长处色谱峰个数和峰强度均较理想,故被选作检测波长。

流动相考察:预试验中对不同流动相的组成比例进行考察^[7-16],采用不同比例的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液作为流动相,发现在流动相中加入一定比例的酸有助于提高待测成分与杂质峰间的分离度,且峰形好,进一步考察,确定以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相梯度洗脱,可获得较理想的色谱图。

综上所述,本试验中建立了高效液相色谱法同时测定沉香化滞丸中芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、和厚朴酚、