中图分类号:R932;R284.1;R286.0　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2023)09－0066－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.09.015

高效液相色谱法同时测定坤泰胶囊中 7 种成分含量

巫　悦

(东南大学附属中大医院江北院区,江苏 南京　211500)

摘要:目的　建立同时测定坤泰胶囊中地黄苷 D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸及毛蕊花糖苷 7 种成分含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为 Waters C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇－0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 275 nm(地黄苷 D、黄芩苷、盐酸小檗碱、没食子酸、黄芩素)、230 nm(芍药苷)、338 nm(毛蕊花糖苷),柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。**结果**　地黄苷 D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷的质量浓度分别在 7.512～225.360 μg/mL、13.176～395.265 μg/mL、6.511～195.315 μg/mL、21.007～630.210 μg/mL、4.616～138.465 μg/mL、2.378～71.340 μg/mL、2.008～60.225 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geqslant 0.999\ 5$, $n=6$);平均加样回收率分别为 97.30%,97.97%,97.59%,98.22%,98.87%,101.74%,98.13%,*RSD* 分别为 0.98%,0.33%,1.09%,0.92%,1.02%,1.33%,1.22%($n=6$);精密度、重复性、稳定性试验结果的 *RSD* 均低于 2.0%($n=6$)。**结论**　该方法可用于坤泰胶囊中多组分含量的同时测定。

关键词:高效液相色谱法;坤泰胶囊;多组分;含量测定

Simultaneous Determination of Seven Components in Kuntai Capsules by HPLC

WU Yue

(Jiangbei District of Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing, Jiangsu, China　211500)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of seven components (rehmannioside D, berberine hydrochloride, paeoniflorin, baicalin, baicalein, gallic acid, and verbascoside) in Kuntai Capsules. **Methods**　The chromatographic column was Waters C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 275 nm (rehmannioside D, baicalin, berberine hydrochloride, gallic acid and baicalein), 230 nm (paeoniflorin), and 338 nm (verbascoside), the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The linear ranges of rehmannioside D, berberine hydrochloride, paeoniflorin, baicalin, baicalein, gallic acid and verbascoside were 7.512－225.360 μg/mL, 13.176－395.265 μg/mL, 6.511－195.315 μg/mL, 21.007－630.210 μg/mL, 4.616－138.465 μg/mL, 2.378－71.340 μg/mL, 2.008－60.225 μg/mL ($r \geqslant 0.999\ 5$, $n=6$), respectively. The average recoveries of seven components were 97.30%, 97.97%, 97.59%, 98.22%, 98.87%, 101.74% and 98.13% with *RSD*s of 0.98%, 0.33%, 1.09%, 0.92%, 1.02%, 1.33% and 1.22% ($n=6$), respectively. The *RSD*s of precision, repeatability, and stability tests were lower than 2.0% ($n=6$). **Conclusion**　The method can be used for the simultaneous determination of multi－components in Kuntai Capsules.

Key words: HPLC; Kuntai Capsules; multi－components; content determination

坤泰胶囊是由熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶和茯苓6味药材组方的中药复方制剂,具有滋阴清热、安神除烦功效。用于绝经期前后诸证阴虚火旺者,潮热面红、自汗盗汗、心烦不宁、失眠多梦、头晕耳鸣、腰膝酸软、手足心热、卵巢功能衰退更年期综合征见上述证候者,现收载于2020年版《中国药典(一部)》,以黄芩中的黄芩苷[1]314和黄连中的盐酸小檗碱[1]316为含量测定的指标成分。目前,关于坤泰胶囊的其他指标成分含量测定的研究较少,多为临床应用研究[2－4]。中药复方制剂成分复杂,药效的发挥往往是多种活性成分相互作用的结果,故多成分测定可更准确、全面地评价中药复方制剂的内在质量。2020年版《中国药典(一部)》中对熟地黄[1]130、白芍[1]108、黄连和黄芩分别以地黄苷D、芍药苷、盐酸小檗碱和黄芩苷作为指标成分进行质量控制。结合文献[5－9],本研究中建立了同时测定坤泰胶囊中地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷7种成分含量的高效液相色谱法,以为进一步完善该制剂的质量标准提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Waters 2695型高效液相色谱系统(美国Waters公司),配有2996型PDA检测器;AB－135S型电子分析天平(瑞士 Mettler－Toledo 公司,精度为 0.01 mg);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为50 kHz)。

1.2　试药

坤泰胶囊(贵阳新天药业股份有限公司,批号分别

第一作者:巫悦,女,大学本科,药师,研究方向为药学,(电子信箱)lw163fy@163.com。

为210415, 210622, 210617); 地黄苷D对照品(批号为112063－202103, 纯度为94.2%), 盐酸小檗碱对照品(批号为110713－202015, 纯度为85.9%), 芍药苷对照品(批号为110736/202145, 纯度为94.6%), 黄芩苷对照品(批号为110715－202122, 纯度为94.2%), 黄芩素对照品(批号为111595－201808, 纯度为97.9%), 没食子酸对照品(批号为110831－201906, 纯度为91.5%), 毛蕊花糖苷对照品(批号为111530－201914, 纯度为95.2%), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters C_{18}柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)－0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0～12 min时35%A～45%A, 12～35 min时45%A, 35～47 min时45%A～53%A, 47～60 min时53%A～35%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 275 nm(地黄苷D、黄芩苷、盐酸小檗碱、没食子酸、黄芩素), 230 nm(芍药苷), 338 nm(毛蕊花糖苷); 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液制备

取地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷对照品各适量, 精密称定, 置50 mL容量瓶中, 加80%甲醇溶液超声(功率为500 W, 频率为50 kHz)使溶解并定容, 配制成地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷质量浓度分别为0.300 5, 0.527 0, 0.260 4, 0.840 3, 0.184 6, 0.095 1, 0.080 3 mg/mL的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液4 mL, 置20 mL容量瓶中, 加80%甲醇溶液定容, 摇匀, 滤过, 即得混合对照品溶液。

取样品内容物适量, 研细, 取0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入80%甲醇溶液50 mL, 称定质量, 超声处理(功率为500 W, 频率为50 kHz)40 min, 放至室温, 再次称定质量, 用80%甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

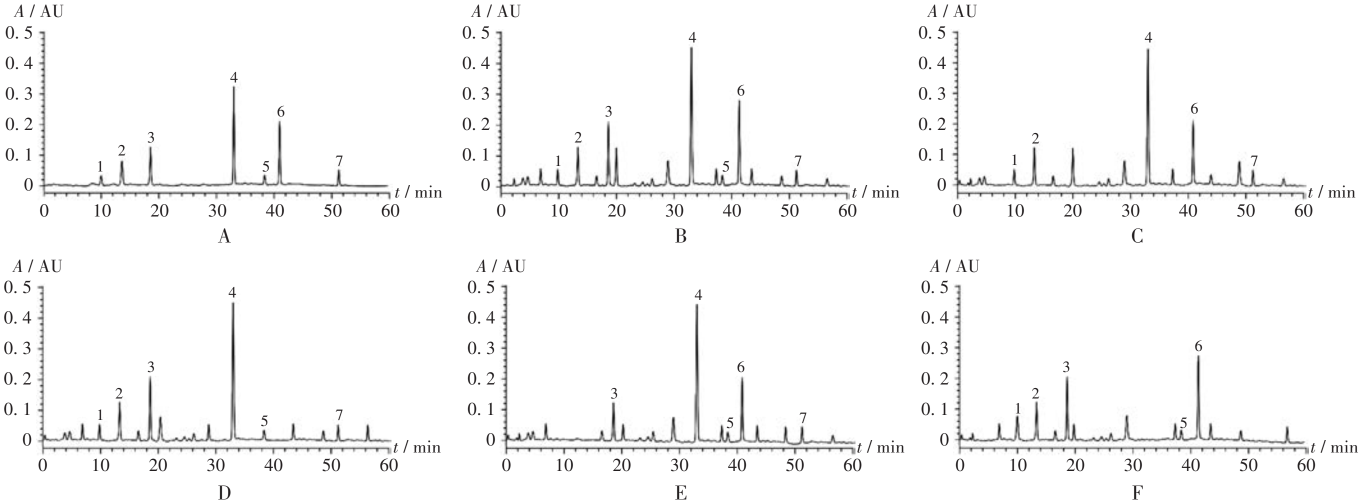
按样品处方工艺, 分别制备缺熟地黄、黄连、白芍、黄芩的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 精密吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量, 按2.1项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。结果显示, 该色谱条件下地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷色谱峰基线分离良好, 7种成分色谱峰的对称因子分别为0.93, 1.02, 0.98, 1.05, 1.04, 0.96, 1.06, 与相邻色谱峰的分离度均大于1.5, 且阴性对照无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察: 精密吸取2.2项下混合对照品贮备液0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 15.0 mL, 分别置20 mL容量瓶中, 加80%甲醇溶液定容, 按2.1项下色谱条件进样测定, 以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归。结果见表1。

精密度试验: 取同一批(批号为210415)样品适量, 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项下色谱条件连续进样测定6次, 记录色谱峰。



1. 没食子酸 2. 芍药苷 3. 地黄苷D 4. 黄芩苷 5. 毛蕊花糖苷 6. 盐酸小檗碱 7. 黄芩素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C－F. 阴性对照品溶液(分别缺熟地黄、黄连、白芍、黄芩)

图1 高效液相色谱图

1. Gallic acid 2. Paeoniflorin 3. Rehmannioside D 4. Baicalin 5. Verbascoside 6. Berberine hydrochloride 7. Baicalein
A. Mixed reference solution B. Test solution C－F. Negative reference solution (lack of Rehmanniae Radix Praeparate, Coptidis Rhizoma, Paeoniae Radix Alba, and Scutellariae Radix respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1　线性关系考察结果（$n=6$）

Tab. 1　Results of the linear relation test（$n=6$）

成分	回归方程	r	线性范围（μg/mL）
地黄苷D	$Y=5.2136\times10^{3}X+4.2354$	0.9997	7.512～225.360
盐酸小檗碱	$Y=3.1752\times10^{3}X+10.3415$	0.9995	13.176～395.265
芍药苷	$Y=4.0213\times10^{3}X-4.8457$	0.9999	6.511～195.315
黄芩苷	$Y=7.6248\times10^{3}X+1.5684$	0.9996	21.007～630.210
黄芩素	$Y=2.3657\times10^{3}X+3.6521$	0.9998	4.616～138.465
没食子酸	$Y=5.3216\times10^{3}X+4.1254$	0.9999	2.378～71.340
毛蕊花糖苷	$Y=2.0415\times10^{3}X+6.1423$	0.9996	2.008～60.225

结果地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷峰面积的*RSD*分别为1.32%，1.24%，0.85%，0.67%，0.94%，1.03%，0.77%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批（批号为210415）样品适量，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项下色谱条件进样测定，并计算各成分含量及*RSD*。结果地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷的平均含量分别为6.2354，11.3206，5.2368，17.4935，3.6529，1.9561，1.5637 mg/g，*RSD*分别1.43%，0.93%，1.12%，0.85%，1.32%，0.74%，0.69%（$n=6$），表明方法重复性良好。

稳定性试验：取同一批（批号为210415）样品，依法制备供试品溶液，分别于制备后0，2，4，8，16，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷峰面积的*RSD*分别为0.66%，0.79%，1.11%，1.07%，1.34%，0.68%，1.41%（$n=6$），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210415）0.25 g，精密称定，共6份，分别置锥形瓶中，精密加入含地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸、毛蕊花糖苷质量浓度分别为2.9052，5.2426，2.5128，8.4720，1.8148，0.9266，0.8024 mg/mL的混合对照品溶液0.5 mL，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，计算7种成分的加样回收率。结果见表2。

表2　加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 2　Results of the recovery test（$n=6$）

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*（%）
地黄苷D	0.2506	1.5626	1.4526	2.9745	97.20	97.30	0.98
	0.2511	1.5657	1.4526	2.9612	96.07		
	0.2496	1.5564	1.4526	2.9856	98.39		
	0.2528	1.5763	1.4526	2.9776	96.47		
	0.2504	1.5613	1.4526	2.9901	98.36		
	0.2523	1.5732	1.4526	2.9871	97.34		
盐酸小檗碱	0.2506	2.8369	2.6213	5.4123	98.25	97.97	0.33
	0.2511	2.8426	2.6213	5.4026	97.66		
	0.2496	2.8256	2.6213	5.4007	98.24		
	0.2528	2.8618	2.6213	5.4358	98.20		
	0.2504	2.8347	2.6213	5.4036	98.00		
	0.2523	2.8562	2.6213	5.4117	97.49		
芍药苷	0.2506	1.3123	1.2564	2.5614	99.42	97.59	1.09
	0.2511	1.3150	1.2564	2.5410	97.58		
	0.2496	1.3071	1.2564	2.5364	97.84		
	0.2528	1.3239	1.2564	2.5331	96.24		
	0.2504	1.3113	1.2564	2.5369	97.55		
	0.2523	1.3212	1.2564	2.5388	96.91		
黄芩苷	0.2506	4.3839	4.2360	8.6122	99.82	98.22	0.92
	0.2511	4.3926	4.2360	8.5468	98.07		
	0.2496	4.3664	4.2360	8.5331	98.36		
	0.2528	4.4224	4.2360	8.5506	97.46		
	0.2504	4.3804	4.2360	8.5468	98.36		
	0.2523	4.4136	4.2360	8.5346	97.29		
黄芩素	0.2506	0.9154	0.9074	1.8120	98.81	98.87	1.02
	0.2511	0.9172	0.9074	1.8066	98.02		
	0.2496	0.9118	0.9074	1.8207	100.17		
	0.2528	0.9235	0.9074	1.8212	98.93		
	0.2504	0.9147	0.9074	1.8201	99.78		
	0.2523	0.9216	0.9074	1.8065	97.52		
没食子酸	0.2506	0.4902	0.4633	0.9667	102.85	101.74	1.33
	0.2511	0.4912	0.4633	0.9714	103.65		
	0.2496	0.4882	0.4633	0.9552	100.80		
	0.2528	0.4945	0.4633	0.9586	100.17		
	0.2504	0.4898	0.4633	0.9631	102.16		
	0.2523	0.4935	0.4633	0.9607	100.84		
毛蕊花糖苷	0.2506	0.3919	0.4012	0.7863	98.31	98.13	1.22
	0.2511	0.3926	0.4012	0.7784	96.16		
	0.2496	0.3903	0.4012	0.7849	98.35		
	0.2528	0.3953	0.4012	0.7904	98.48		
	0.2504	0.3916	0.4012	0.7921	99.83		
	0.2523	0.3945	0.4012	0.7863	97.66		

2.4　样品含量测定

取3批（批号分别为210415，210622，210617）样品各适量，精密称定，按2.2项下方法制备供试品溶液，平行2份，按2.1项下色谱条件进样测定，按外标法计算样品中地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸及毛蕊花糖苷的含量。结果见表3。

3　讨论

3.1　指标成分选择

地黄是四大怀药之一。生地黄炮制而成的熟地黄，性由寒转温，味由苦转甘，功效由清转补，以滋阴补血、益精填髓为主，毛蕊花糖苷和地黄苷D是其特征性成分[10]。黄芩为常用大宗中药材，黄酮类化合物黄芩苷和

表3 样品中7种成分含量测定结果(mg/g,$n=2$)
Tab. 3 Results of the content determination of seven components in samples (mg/g, $n=2$)

批号	地黄苷D	盐酸小檗碱	芍药苷	黄芩苷	黄芩素	没食子酸	毛蕊花糖苷
210415	6.235 4	11.320 6	5.236 8	17.494	3.652 9	1.956 1	1.563 7
210622	6.045 7	12.364 5	4.253 1	16.055	3.041 2	2.324 1	1.352 6
210617	6.330 7	11.745 2	5.028 5	16.652	3.440 7	2.056 2	1.023 5

黄芩素为其特征成分,具有清热燥湿、泻火解毒、止血等功效[11]。芍药苷是白芍的药效物质,没食子酸等酚酸类成分具有显著的抗炎、抗肿瘤等药理作用,常作为白芍药材质量控制的指标成分[6]。黄连可泻肝火,去心窍恶血,止惊悸,其药用价值与其所含生物碱类成分密切相关,其中小檗碱是含量最丰富、最具代表性的化合物[12]。本研究中最终确定以地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸及毛蕊花糖苷作为含量测定的指标成分。

3.2 提取条件优化

预试验中考察了不同的提取方式、提取时间、提取溶剂和料液比对7种成分提取效果的影响。超声处理(功率为500 W,频率为50 kHz)[13]和加热回流[14]均能提取完全,考虑超声操作更简便,最终选择超声提取。以7种成分的色谱峰峰面积大小作为评价指标,考察不同超声时间(30,40,60 min)对提取效果的影响,发现超声40 min时各成分峰面积趋于稳定。考察不同体积分数(50%,80%,100%)乙醇,不同体积分数(50%,80%,100%)甲醇及水作为提取溶剂时对提取效果的影响[13-15],结果80%甲醇和甲醇提取效率较高,最终选择80%甲醇作为提取溶剂。考察了不同料液比(1∶50,1∶100,1∶200,m/V)对提取效果的影响[14-16],结果料液比为1∶50时提取不充分,料液比为1∶100和1∶200时可充分提取,从节约成本的角度考虑,最终选择料液比1∶100。故样品的处理最终以料液比1∶100的80%甲醇超声(功率为500 W,频率为50 kHz)40 min,操作简便,且提取充分。

3.3 色谱条件优化[17-20]

采用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内扫描混合对照品溶液,结果地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、没食子酸、毛蕊花糖苷分别在278,265,230,272,338 nm波长处有最大吸收,黄芩苷和黄芩素在280 nm波长处有最大吸收。但频繁的波长切换,会导致基线较大幅度漂移。最终采用在230 nm波长处检测芍药苷,在275 nm波长处检测地黄苷D、盐酸小檗碱、没食子酸、黄芩苷和黄芩素,在338 nm波长处检测毛蕊花糖苷,既避免了波长的频繁切换造成基线不平稳,又保证了7种成分均有适宜的灵敏度,分离度较好,且阴性对照无干扰。

7种成分极性差异较大,故采用梯度洗脱。分别考察甲醇-水溶液、乙腈-水溶液作为流动相时各成分的色谱峰,结果没食子酸存在拖尾现象,流动相为甲醇-水溶液时地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、毛蕊花糖苷的分离效果溶液优于乙腈-水溶液。预试验中通过加入不同浓度的磷酸改善没食子酸色谱峰的峰形,比较了甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-0.2%磷酸溶液、甲醇-0.4%磷酸溶液,结果无明显差异,最终流动相选择甲醇-0.1%磷酸溶液,7种指标成分在60 min内均可洗脱完全。曾考察25 ℃和30 ℃ 2个柱温对色谱峰的影响,结果柱温为30 ℃时毛蕊花糖苷与相邻杂质峰分离较佳,最终选择柱温为30 ℃。

3.4 方法评价

本研究中建立的高效液相色谱法操作简便、结果准确、重复性好,能同时测定坤泰胶囊中地黄苷D、盐酸小檗碱、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、没食子酸及毛蕊花糖苷7种指标成分的含量。

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,2020.
[2] 郑阿旭. HPLC同时测定坤泰胶囊中毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷含量[J]. 中国现代应用药学,2019,36(11):1367-1369.
[3] 柳肃芬. 坤泰胶囊对早期卵巢储备功能降低的育龄期患者临床疗效分析[J]. 中国现代药物应用,2021,15(12):165-168.
[4] 门晓亮,赵丽萍,杨 杰,等. 坤泰胶囊治疗围绝经期综合征的系统评价再评价[J]. 中国中药杂志,2021,46(19):5103-5109.
[5] 王 勃,吕辰子,何美菁,等. 熟地黄炮制的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2018,20(6):1010-1017.
[6] 徐佳新,许 浚,曹 勇,等. 中药白芍现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志,2021,46(21):5486-5495.
[7] 李 询,董诚明,齐大明,等. HPLC多成分测定及主成分分析法对不同产地鲜地黄质量评价[J]. 江苏农业科学,2020,48(19):225-229.
[8] 徐境荣,于钦川,赖 莉,等. 基于多指标成分含量测定探索黄芩药材质量综合评价模式[J]. 药学学报,2021,56(11):3141-3152.
[9] 张 凯,韦 杏. 复方金黄连颗粒中8种成分的含量测定及其主成分分析和聚类分析[J]. 中国药师,2021,24(3):472-476.
[10] 王義雯,杨 锦,梁馨月,等. 熟地黄标准汤质量标准及高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2021,30(12):39-43.
[11] 王文涛,曹晓燕,胡苏莹,等. 不同产地黄芩中5个黄酮类成分的比较分析[J]. 中药材,2021,44(7):1691-1696.
[12] 洪丽婷,刘秀棉,陈 丹,等. HPLC多波长切换法同时测定苁蓉舒痉颗粒6个主成分含量[J]. 药物分析杂志,2021,