

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)15-0066-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.15.016



超高效液相色谱法同时测定安宫降压丸中9种成分含量

邵晓玮^{1,2}, 王洪明^{1△}, 曹洪杰^{1,2}, 安静³, 李玉平^{1,2}

(1. 山东省滨州市检验检测中心, 山东 滨州 256600; 2. 山东省滨州市化学药物研发与质量控制重点实验室 <筹>, 山东 滨州 256600; 3. 山东省滨州市医学院附属医院, 山东 滨州 256600)

摘要:目的 建立同时测定安宫降压丸中栀子苷、盐酸黄连碱、表小檗碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素9种指标性成分含量的超高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters Acquity UPLC C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为0.5 mL/min, 检测波长为254 nm, 柱温为35 °C, 进样量为1 μL。结果 9种成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9995$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%; 平均加样回收率分别为99.82%, 98.91%, 99.09%, 99.09%, 98.77%, 99.25%, 99.16%, 98.17%, 99.40%, RSD分别为0.56%, 0.56%, 0.81%, 0.97%, 0.79%, 0.81%, 0.84%, 1.19%, 0.83% ($n=6$)。样品中9种成分的含量分别为1.82, 0.56, 0.68, 4.52, 2.36, 0.54, 0.85, 0.37, 0.32 mg/g ($n=9$)。结论 该方法快速高效、准确度高、专属性强, 可用于安宫降压丸中9种指标性成分的含量测定。

关键词: 安宫降压丸; 超高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Nine Components in Angong Jiangya Pills by UPLC

SHAO Xiaowei^{1,2}, WANG Hongming¹, CAO Hongjie^{1,2}, AN Jing³, LI Yuping^{1,2}

(1. Binzhou Municipal Testing Center, Binzhou, Shandong, China 256600; 2. Binzhou Municipal Key Laboratory for Chemical Drug Research and Development and Quality Control <Preparation>, Binzhou, Shandong, China 256600; 3. Binzhou Medical University Hospital, Binzhou, Shandong, China 256600)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method for simultaneous determination of nine index components (geniposide, coptisine hydrochloride, epiberberine, baicalin, berberine chloride, berberine chloride, wogonoside, and baicalein) in Angong Jiangya Pills. **Methods** The chromatography column was Waters Equity UPLC C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 1 μL. **Results** The nine components showed good linear relationships with peak area within their respective mass concentration ranges ($r \geq 0.9995$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recoveries of nine components were 99.82%, 98.91%, 99.09%, 99.09%, 98.77%, 99.25%, 99.16%, 98.17%, and 99.40%, with RSDs of 0.56%, 0.56%, 0.81%, 0.97%, 0.79%, 0.81%, 0.84%, 1.19%, and 0.83% ($n=6$), respectively. The contents of nine components in the sample were 1.82, 0.56, 0.68, 4.52, 2.36, 0.54, 0.85, 0.37, and 0.32 mg/g ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is quick, sensitive, and accurate, and it has strong specificity, which can be used for the content determination of nine components in Angong Jiangya Pills.

Key words: Angong Jiangya Pills; UPLC; content determination

安宫降压丸由郁金、黄连、栀子、黄芩、天麻、白芍等15味中药材经粉碎、配研、过筛、混匀等工艺制成, 用于治疗肝阳上亢、肝火上炎、高血压所致头晕、目眩、心烦、目赤等^[1-4]。质量标准收载于2020年版《中国药典(一部)》, 采用超高效液相色谱(UPLC)法测定指标性成分栀子苷的含量。相关研究仅测定了安宫降压丸中芍药苷的含量^[5], 未涉及其他成分, 评价方法缺乏完整性和有效性, 难以全面反映制剂的质量。中药成方制剂组分复杂, 单一成分检测难以控制制剂的质量, 多指标成分测定已成为质量评价的趋势^[6-7]。故本研究中采用UPLC法同时测定安宫降压丸中栀子苷、盐酸黄连碱、表小檗碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、汉黄芩

苷、黄芩素、汉黄芩素9种指标性成分的含量, 为其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity型UPLC仪(美国Waters公司), 配有二极管阵列检测器(PDA); Mettler XSE205Du型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司, 精度为0.01 mg); KQ-700 DV型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为250 W, 频率为50 kHz)。

1.2 试剂

栀子苷对照品(批号为110749-201617, 含量为98.4%), 盐酸黄连碱对照品(批号为112026-201601,

第一作者: 邵晓玮, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品检验与质量评价, (电子信箱)1207066479@qq.com。

△通信作者: 王洪明, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品检验与质量评价, (电子信箱)525508788@qq.com。

含量为95.1%),黄芩苷对照品(批号为110715-201821,含量为95.4%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201212,含量为86.7%),盐酸巴马汀对照品(批号为110732-201611,含量为86.8%),汉黄芩苷对照品(批号为112002-201702,含量为98.5%),黄芩素对照品(批号为111595-201808,含量为97.9%),汉黄芩素对照品(批号为111514-201706,含量为100.0%),均购于中国食品药品检定研究院;表小檗碱对照品(成都瑞芬思科技有限公司,批号为B-064-180818,含量为98.59%);安宫降压丸(大蜜丸,北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,批号分别为19010459,19013059,19013060,规格为每丸3g);乙腈、磷酸均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters Acquity UPLC C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8.0 min时5.0%A~18.0%A,8.0~13.0 min时18.0%A,13.0~23.0 min时18.0%A~40.0%A,23.0~26.0 min时40.0%A~60.0%A);流速:0.5 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35℃;进样量:1 μL。在此色谱条件下,对照品溶液中各成分色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于2.0,理论板数均大于5 000。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取栀子苷、盐酸黄连碱、表小檗碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解,制成质量浓度分别为0.950 54,0.072 28,0.974 07,1.075 20,0.998 80,0.251 96,0.284 17,1.018 16,0.150 00 mg/mL的对照品贮备液,分别精密吸取0.77,3.25,0.28,1.70,0.96,0.82,1.21,0.14,0.87 mL,置同一20 mL容量瓶中,混匀,即得。

供试品溶液:将样品剪碎,取1 g,精密称定,置具塞锥

形瓶中,精密加入25 mL 75%甲醇溶液,密塞瓶口,称定样品与锥形瓶的质量,超声处理(功率为250 W,频率为50 kHz)30 min,放冷,用75%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

阴性对照品溶液:按处方及制剂工艺分别制备缺黄连和黄芩、缺栀子的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备溶液,即得。

2.3 方法学考察

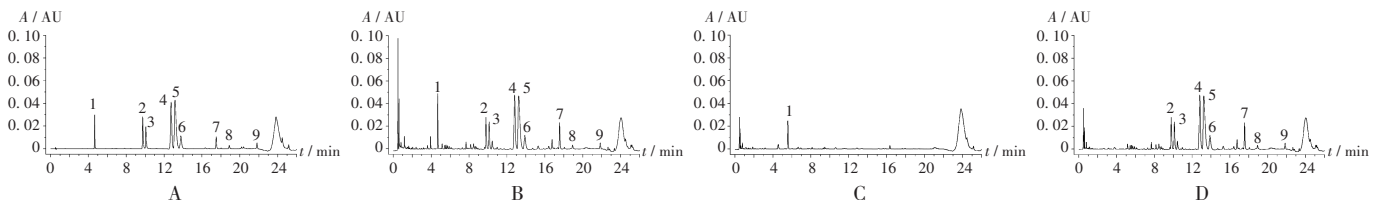
专属性试验:分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置均有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:取2.2项下混合对照品溶液适量,加甲醇定量稀释为系列质量浓度的溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以各成分的质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1,表明各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表1 方法学考察结果

Tab. 1 Results of the methodological examination

成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)	峰面积的RSD(%)		
				精密度试验(n=6)	稳定性试验(n=5)	重复性试验(n=6)
栀子苷	$Y=1781.7X-3763.8$	0.9999	7.3192~73.192	0.04	0.88	0.59
盐酸黄连碱	$Y=8524.4X-7945.7$	0.9997	2.3491~23.491	0.32	0.54	0.42
表小檗碱	$Y=6749.3X-5501.6$	0.9998	2.7274~27.274	0.19	0.72	0.38
黄芩苷	$Y=2817.3X-16496$	0.9998	18.278~182.78	0.18	0.32	1.01
盐酸小檗碱	$Y=7353.8X-23065$	0.9995	9.5885~95.885	0.14	0.24	0.67
盐酸巴马汀	$Y=5013.2X-6074.8$	0.9998	2.0661~20.661	0.25	0.55	1.07
汉黄芩苷	$Y=3775.8X-2282.9$	0.9998	3.4385~34.385	0.37	0.90	1.08
黄芩素	$Y=6248.6X-1851.4$	0.9999	1.4254~14.254	0.27	1.32	0.49
汉黄芩素	$Y=2572.3X-1516.9$	0.9998	1.3050~13.050	0.23	0.41	0.51



A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - D. 阴性对照品溶液(分别缺黄连和黄芩、缺栀子)

1. 栀子苷 2. 盐酸黄连碱 3. 表小檗碱 4. 黄芩苷 5. 盐酸小檗碱 6. 盐酸巴马汀 7. 汉黄芩苷 8. 黄芩素 9. 汉黄芩素

图1 超高效液相色谱图

A. Mixed reference solution B. Test solution C - D. Negative reference solution (C lacked Coptidis Rhizoma and Scutellariae Radix; D lacked Gardeniae Fructus)

1. Geniposide 2. Coptisine hydrochloride 3. Epiberberine 4. Baicalin 5. Berberine chloride 6. Palmatine chloride 7. Wogonoside 8. Baicalein 9. Wogonin

Fig. 1 UPLC chromatograms

精密度试验: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,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为19010459)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0,8,16,48,72 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,表明供试品溶液放置72 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为190104549)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为19010459)6份,每份0.5 g,精密称定,分别精密加入2.2项下对照品贮备液1.00,4.00,0.35,2.00,1.20,1.00,1.50,0.20,1.00 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,并计算回收率。结

果见表2。

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为19010459,19013059,19013060)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,按外标法计算含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of the content determination of nine components in samples (mg / g, n = 3)

批号	栀子苷	盐酸黄连碱	表小檗碱	黄芩苷	盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	汉黄芩素	黄芩素	汉黄芩素
19010459	1.84	0.59	0.68	4.57	2.39	0.52	0.86	0.35	0.33
19013059	1.80	0.56	0.69	4.44	2.30	0.56	0.88	0.37	0.30
19013060	1.82	0.52	0.68	4.54	2.40	0.53	0.82	0.38	0.32
\bar{X}	1.82	0.56	0.68	4.52	2.36	0.54	0.85	0.37	0.32

3 讨论

3.1 指标性成分选择

黄连具有清热燥湿、泻火解毒功效,其中表小檗

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(%)	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(%)	
栀子苷	0.503 2	0.925 9	0.950 5	1.875 0	99.85	99.82	0.56	栀子苷	0.507 2	1.212 2	1.198 6	2.388 6	98.15	99.25	0.81	
	0.510 7	0.939 7	0.950 5	1.892 4	100.23				0.504 6	1.206 0	1.198 6	2.383 7	98.26			
	0.498 3	0.916 9	0.950 5	1.860 0	99.22				0.514 3	1.229 2	1.198 6	2.412 8	98.75			
	0.507 2	0.933 2	0.950 5	1.877 8	99.38				盐酸巴马汀	0.503 2	0.261 7	0.252 0	0.509 4			98.29
	0.504 6	0.928 5	0.950 5	1.885 5	100.68				0.510 7	0.265 6	0.252 0	0.515 8	99.29			
	0.514 3	0.946 3	0.950 5	1.892 6	99.56				0.498 3	0.259 1	0.252 0	0.508 5	98.97			
盐酸黄连碱	0.503 2	0.296 9	0.289 1	0.581 3	98.37	98.91	0.56	盐酸巴马汀	0.507 2	0.263 7	0.252 0	0.517 4	100.67	99.16	0.84	
	0.510 7	0.301 3	0.289 1	0.587 5	99.00				0.504 6	0.262 4	0.252 0	0.511 5	98.85			
	0.498 3	0.294 0	0.289 1	0.579 4	98.72				0.514 3	0.267 4	0.252 0	0.518 0	99.44			
	0.507 2	0.299 2	0.289 1	0.587 4	99.69				黄芩苷	0.503 2	0.432 8	0.426 3	0.851 7			98.26
	0.504 6	0.297 7	0.289 1	0.585 0	99.38				0.510 7	0.439 2	0.426 3	0.866 7	100.28			
	0.514 3	0.303 4	0.289 1	0.587 6	98.31				0.498 3	0.428 5	0.426 3	0.854 3	99.88			
表小檗碱	0.503 2	0.342 2	0.340 9	0.683 2	100.03	99.09	0.81	黄芩苷	0.507 2	0.436 2	0.426 3	0.858 9	99.16	98.17	1.19	
	0.510 7	0.347 3	0.340 9	0.682 9	98.45				0.504 6	0.434 0	0.426 3	0.852 8	98.24			
	0.498 3	0.338 8	0.340 9	0.679 4	99.91				0.514 3	0.442 3	0.426 3	0.864 8	99.11			
	0.507 2	0.344 9	0.340 9	0.678 9	97.98				黄芩素	0.503 2	0.176 1	0.203 6	0.373 8			97.10
	0.504 6	0.343 1	0.340 9	0.680 8	99.06				0.510 7	0.178 7	0.203 6	0.376 7	97.25			
	0.514 3	0.349 7	0.340 9	0.687 6	99.12				0.498 3	0.174 4	0.203 6	0.376 1	99.07			
黄芩苷	0.503 2	2.299 6	2.150 4	4.420 9	98.65	99.09	0.97	黄芩素	0.507 2	0.177 5	0.203 6	0.376 0	97.50	99.40	0.83	
	0.510 7	2.333 9	2.150 4	4.479 1	99.76				0.504 6	0.176 6	0.203 6	0.380 3	100.05			
	0.498 3	2.277 2	2.150 4	4.434 9	100.34				0.514 3	0.180 0	0.203 6	0.379 7	98.08			
	0.507 2	2.317 9	2.150 4	4.415 3	97.54				汉黄芩素	0.503 2	0.166 1	0.150 0	0.315 8			99.80
	0.504 6	2.306 0	2.150 4	4.439 4	99.21				0.510 7	0.168 5	0.150 0	0.317 3	99.20			
	0.514 3	2.350 4	2.150 4	4.480 9	99.07				0.498 3	0.164 4	0.150 0	0.311 5	98.07			
盐酸小檗碱	0.503 2	1.202 6	1.198 6	2.379 9	98.22	98.77	0.79	汉黄芩素	0.507 2	0.167 4	0.150 0	0.318 3	100.60	99.40	0.83	
	0.510 7	1.220 6	1.198 6	2.408 1	99.07				0.504 6	0.166 5	0.150 0	0.315 6	99.40			
	0.498 3	1.190 9	1.198 6	2.391 8	100.19				0.514 3	0.169 7	0.150 0	0.318 7	99.33			

碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱4种成分与其药用价值密切相关,可作为质量评价的指标性成分。黄芩中的黄酮类化合物黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素为指标性成分,具有清热燥湿、泻火解毒、止血等功效。栀子苷是栀子的药效物质,具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒、消肿止痛等功效。郁金以尿苷、腺苷为指标性成分,具有活血止痛、行气解郁、清心凉血等功效。天麻以天麻素为指标性成分,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络等功效。白芍以芍药苷为指标性成分,具有平抑肝养、养血调经功效。川芎以阿魏酸为指标性成分,具有活血行气、祛风止痛功效。预试验中发现,样品中尿苷、腺苷、天麻素、芍药苷、阿魏酸5种成分的含量较少,未达到检测限,无法进行定量分析,故不纳入含量测定。最终选择栀子苷、盐酸黄连碱、表小檗碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素9种成分作为含量测定的指标性成分。

3.2 色谱条件选择

参考文献[8-12],采用PDA于190~400 nm波长范围内对9种指标性成分进行扫描,发现9种指标性成分于254 nm波长处均有较好吸收,且峰形良好,分离度、峰纯度符合测定要求,阴性样品的测定结果不存在干扰。考虑操作和适用性等因素,最终选择254 nm作为检测波长。考察了不同流动相系统(甲醇-0.1%甲酸溶液^[13-14]、乙腈-0.1%磷酸溶液^[15-16]、乙腈-0.3%磷酸溶液^[17]、乙腈-0.2%磷酸溶液等)对含量测定结果的影响,发现以乙腈-0.2%磷酸溶液进行梯度洗脱时各成分均能较好地分离,分离度均符合要求,基线平稳,各成分色谱峰的峰形、理论板数均良好,且阴性对照无干扰。故最终选择乙腈-0.2%磷酸溶液作为流动相。

3.3 供试品溶液制备方法选择

前期试验中,以9种指标性成分的色谱峰峰面积为评价指标,考察不同提取溶剂[甲醇、75%甲醇溶液、甲醇-0.2%磷酸溶液(25:75, V/V)、50%甲醇溶液^[18]],提取时间(15, 30, 45 min),料液比(1:10、1:25、1:50, m/V)对提取效果的影响,发现提取溶剂为75%甲醇溶液时各指标性成分的提取率最佳,提取30 min时各指标性成分的提取率与提取45 min时相当,料液比为1:25(m/V)和1:50(m/V)时均可充分提取。故最终选择供试品溶液制备方法为1 g样品用25 mL 75%甲醇溶液超声提取30 min。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法快速高效、准确度高、专属性强,可用于安宫降压丸中9种指标性成分的含量测定。

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, 2020:932-933.
- [2] 樊茂霞,郭 栋,罗文君. 基于Meta分析探讨安宫降压丸治疗初发难治性高血压病的有效性和安全性评价[J]. 中医临床研究, 2022, 14(7):126-130.
- [3] 刘子豪,刘红旭,尚莉莉,等. 中成药治疗原发性高血压随机对照临床试验综述[J]. 世界中医药, 2020, 15(22): 3518-3522.
- [4] 李 颖,王德超. 高血压病患者血压波动时期服用安宫降压丸对改善头晕、头胀等症状的临床观察[J]. 中医临床研究, 2019, 11(7):71-73.
- [5] 方加林,李文隆,廖树清,等. HPLC法测定安宫降压丸中芍药苷的含量[J]. 今日药学, 2014, 24(7):505-507.
- [6] 刘 茜,付 娟,胡军华,等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS技术哮喘宁颗粒化学成分分析及多指标定量测定[J]. 药物评价研究, 2023, 46(5):1012-1023.
- [7] 何 艳,胡小祥,王 庆. HPLC法同时测定感冒止咳颗粒中10种成分[J]. 中成药, 2020, 42(4):849-852.
- [8] 李 菲. 基于高效液相色谱指纹图谱及多指标成分分析的化学计量学评价活血消痛酊质量[J]. 中国药业, 2023, 32(15):79-84.
- [9] 高 岩. 基于RP-HPLC双波长法的蓝芩口服液中主要成分的检测分析[J]. 中国处方药, 2023, 21(3):42-45.
- [10] 许学丽,宋 迪,王洪明,等. HPLC同时测定炎可宁片中9种成分的含量[J]. 食品与药品, 2020, 22(6):490-494.
- [11] 巫 悦. 高效液相色谱法同时测定坤泰胶囊中7种成分含量[J]. 中国药业, 2023, 32(9):66-70.
- [12] 方慧祥,樊海宾,吕 晋,等. HPLC法同时测定导赤丸(水蜜丸)中10种成分[J]. 中成药, 2023, 45(5):1429-1433.
- [13] 郑如文,刘港辉,江志强,等. 黄芩UPLC-DAD指纹图谱的建立及其黄芩苷和汉黄芩苷的含量研究[J]. 中南药学, 2021, 19(9):1898-1903.
- [14] 王晓丽,彭梅梅,陈 琪,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的经典名方黄连汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5):1249-1263.
- [15] 薛 冬,蒋永海,汤加兵,等. UPLC法测定脏连丸中6个生物碱和4个黄酮成分的含量[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1651-1655.
- [16] 鄢长余,姜范成,周 凌,等. UPLC法同时测定清肺抑火片中11种成分[J]. 中成药, 2023, 45(3):720-723.
- [17] 彭 平,杜 菁,王志斌,等. 基于UPLC-PDA色谱法的同仁大活络丸质量控制方法研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(4):590-597.
- [18] 吴 安,张誉晴,赵志峰,等. 经典名方枇杷清肺饮的UPLC指纹图谱及多指标成分含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14):12-20.

(收稿日期:2023-08-07;修回日期:2024-02-13)