

高效液相色谱波长切换法联合梯度洗脱法同时测定理气散结颗粒中 6 种成分的研究

王育¹,王毅²,严亨波¹,魏谭军²,李霞²

(1. 达州市食品药品检验所中药检测室,四川 达州 635000;

2. 达州市中西医结合医院制剂室,四川 达州 635000)

摘要:目的 探讨高效液相色谱(HPLC)波长切换联合梯度洗脱法同时测定理气散结颗粒中芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱 6 种成分的含量可行性。**方法** 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱;以乙腈(A)-0.1%冰醋酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱;检测波长分别为 230 nm(芍药苷)、210 nm(柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d)、280 nm(延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:35℃。**结果** 芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱分别在 14.39~359.75 mg·L⁻¹、1.96~49.00 mg·L⁻¹、1.44~36.00 mg·L⁻¹、1.36~34.00 mg·L⁻¹、1.58~39.50 mg·L⁻¹、2.12~53.00 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好,*r* 分别为 0.999 8、0.999 5、0.999 9、0.999 4、0.999 7、0.999 9(*n*=6),其平均回收率分别为 99.87%、97.75%、98.09%、97.46%、98.29% 和 96.97%,RSD 分别为 0.84%、1.74%、0.71%、1.39%、1.07% 和 1.11%。**结论** 该方法简便、准确、重复性好,可作为理气散结颗粒全面质量控制方法。

关键词: 色谱法,高压液相;理气散结颗粒;芍药苷;柴胡皂苷 a;柴胡皂苷 d;延胡索乙素;去氢紫堇碱;紫堇碱;波长切换法;梯度洗脱法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.06.006

Simultaneous determination of the six components in the gas dispersing granules by HPLC wavelength switching combined with gradient elution method

WANG Yu¹, WANG Yi², YAN Hengbo¹, WEI Tanjun², LI Xia²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine Analysis, Dazhou Institution of Food and Drug Control,

Dazhou, Sichuan 635000, China; 2. Department of Pharmaceutical Preparation,

Dazhou Hospital of Integrated TCM & WM, Dazhou, Sichuan 635000, China)

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin, saikosaponina, saikosaponind, tetrahydropalmatine, dehydrocorydaline and corydaline in Liqi Sanjie Granules by HPLC wavelength switching combined with gradient elution method. **Methods** The Agilent TC-C₁₈ column was used, the mobile phase was acetonitrile (A) -0.1% glacial acetic acid solution (B) with gradient elution, and the detection wavelengths were 230 nm for paeoniflorin, 210 nm for saikosaponina and saikosaponind, and 280 nm for tetrahydropalmatine, dehydrocorydaline and corydaline, respectively. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature was set at 35℃. **Results** The linear relationship of paeoniflorin, saikosaponina, saikosaponind, tetrahydropalmatine, dehydrocorydaline and corydaline was good in the ranges of 14.39 - 359.75 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 8), 1.96 - 49.00 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 5), 1.44 - 36.00 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 9), 1.36 - 34.00 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 4), 1.58 - 39.50 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 7), 2.12 - 53.00 mg·L⁻¹ (*r* = 0.999 9), respectively. The average recoveries were 99.87%, 97.75%, 98.09%, 97.46%, 98.29% and 96.97%, and RSDs were 0.84%, 1.74%, 0.71%, 1.39%, 1.07% and 1.11%. **Conclusions** The method is simple, accurate and well reproducible, which can be used as quality control method for Liqi Sanjie Granules.

Keywords: Chromatography, high pressure liquid; Liqi sanjie granules; Paeoniflorin; Saikosaponina; Saikosaponind; Tetrahydropalmatine; Dehydrocorydaline; Corydaline; Wavelength switching method; Gradient elution method

理气散结颗粒为达州市中西医结合医院的医院制剂,是经白芍、柴胡、延胡索等 10 味中药材提取浓缩成稠膏后加入适量辅料制成的颗粒剂。方中白芍柔肝平肝为君药,配以柴胡、延胡索疏肝解

郁,可恢复肝正常的顺达之性,治疗肝郁血瘀之证。为有效控制理气散结颗粒的产品质量和疗效一致性,本文作者采用高效液相色谱(HPLC)波长切换法联合梯度洗脱法同时测定理气散结颗粒中的芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱,对理气散结颗粒的全面质量控制具有重要意义和应用价值。

基金项目:四川省科技支撑计划项目(2014SZ0189)

通信作者:王毅,男,主任中药师,研究方向:医院药学及中药制剂,

E-mail:scdz87wyys@163.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);XS105DU 分析天平(精度:0.01 mg, METTLER TOLEDO 公司);KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试剂 对照品芍药苷(批号 110736-201640,含量 95.2%,2~10℃冷处保存)、柴胡皂苷 a(批号 110777-201510,含量 93.2%,冷冻保存)、柴胡皂苷 d(批号 110778-201510,含量 97.3%,冷冻保存)、延胡索乙素对照品(批号 110726-201617,含量 99.8%,2~10℃冷处保存)均来源于中国食品药品检定研究院;对照品去氢紫堇碱(批号 30045-16-0,含量 97.5%)来源于成都德思特生物技术有限公司;对照品紫堇碱(批号 518-69-4,含量 98.0%)来源于宝鸡市辰光生物科技有限公司;理气散结颗粒(每袋装 15 g)来源于达州市中西医结合医院制剂室;乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取本品内容物适量,混匀,研细,取约 5.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 50 mL,称定重量,超声处理 30 min,放冷至室温,用 70%乙醇补足减失重量,摇匀,过滤,即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱对照品各适量,用 70%乙醇制成单一成分对照品储备液(芍药苷 $2.878 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柴胡皂苷 a $0.392 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柴胡皂苷 d $0.288 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、延胡索乙素 $0.272 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、去氢紫堇碱 $0.316 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、紫堇碱 $0.424 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。依次精密量取各对照品储备液 5.0 mL、5.0 mL、5.0 mL、5.0 mL、5.0 mL 和 2.5 mL,定容至 100 mL,用 70%乙醇制成混合对照品溶液。

2.3 三种阴性样品溶液的制备 依据理气散结颗粒的处方和生产工艺,制备缺白芍阴性样品、缺柴胡阴性样品和缺延胡索阴性样品,依据供试品溶液制备方法制成白芍阴性样品溶液、柴胡阴性样品溶液和延胡索阴性样品溶液。

2.4 色谱条件 Agilent TC- C_{18} 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%冰醋酸溶液,梯度洗脱(0~11 min, 18.0% A; 11~17 min, 18.0% A → 32.0% A; 17~29 min, 32.0% A → 55.0% A; 29~44 min, 55.0% A → 80.0% A; 44~50 min, 80.0% A → 18.0% A); 0~17 min 在 230 nm^[14] 波长下检测芍药苷, 17~29 min 在 210 nm^[5,6] 波长下检测柴胡

皂苷 a 和柴胡皂苷 d, 29~50 min 在 280 nm^[7-11] 波长下检测延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱;流速: 1.0 mL · min⁻¹;柱温: 35℃。

2.5 系统适用性及专属性试验 取“2.1 供试品溶液”“2.2 对照品溶液”“2.3 三种阴性样品溶液”和空白溶剂,依法进样测定,记录色谱峰,各阴性样品溶液色谱图中,在所测芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱 6 种成分对应的位置处无干扰(图 1),理论塔板数按芍药苷计不低于 3 500,分离度符合药典要求。

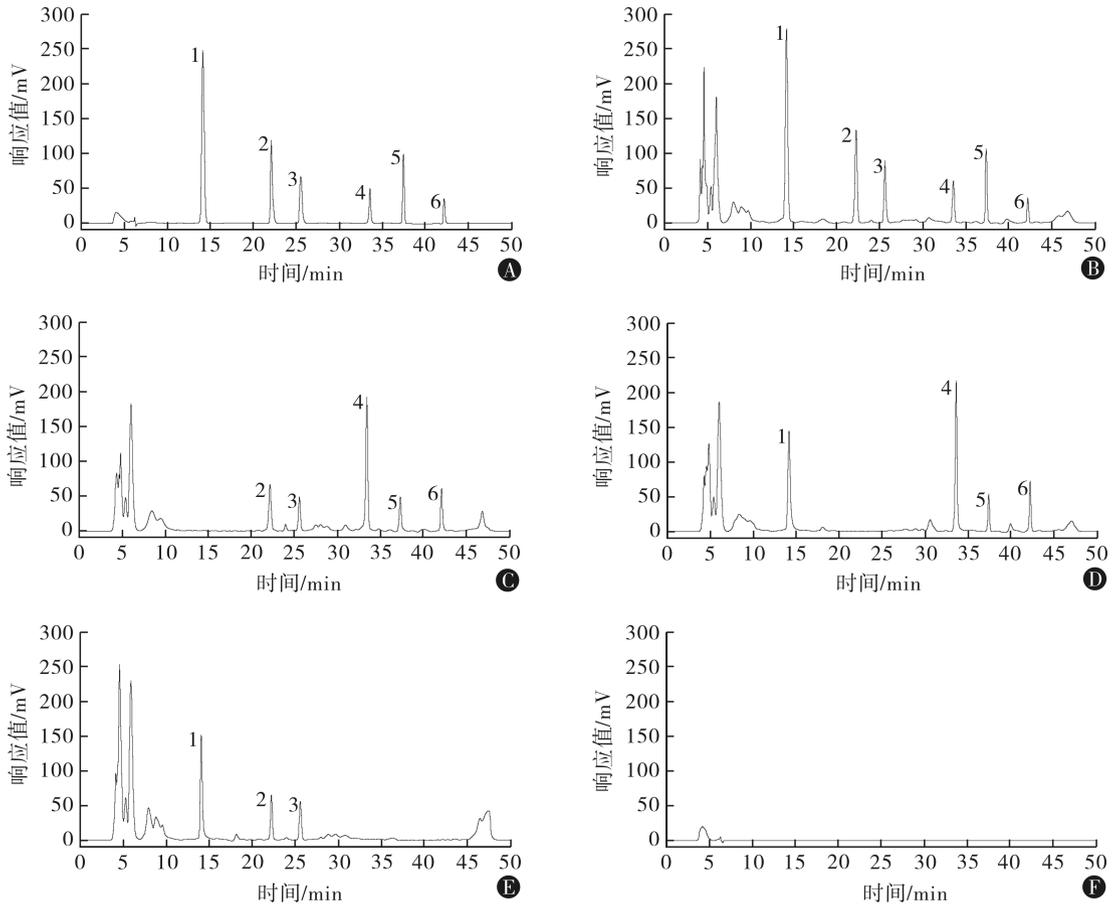
2.6 线性关系考察 精密量取芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱对照品储备液各 0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL,分别置 20 mL 量瓶中,用 70%乙醇定容,制成 25 倍浓度差的 6 种不同浓度混合对照品溶液,依法进样测定芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱的峰面积,以芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标(x),所测各成分的峰面积为纵坐标(y),进行线性回归(表 1)。

表 1 线性关系实验结果

成分	回归方程	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	r 值
芍药苷	$y = 1.2519 \times 10^6 x - 365.8$	14.39 ~ 359.75	0.999 8
柴胡皂苷 a	$y = 2.6451 \times 10^6 x + 282.7$	1.96 ~ 49.00	0.999 5
柴胡皂苷 d	$y = 1.8094 \times 10^6 x - 207.4$	1.44 ~ 36.00	0.999 9
延胡索乙素	$y = 1.6372 \times 10^6 x - 394.1$	1.36 ~ 34.00	0.999 4
去氢紫堇碱	$y = 2.1816 \times 10^6 x + 175.8$	1.58 ~ 39.50	0.999 7
紫堇碱	$y = 1.3837 \times 10^6 x + 463.5$	2.12 ~ 53.00	0.999 9

2.7 加样回收率试验 分别精密称取芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱对照品各适量,用 70%乙醇制成单一成分的加样对照品溶液(芍药苷 $0.761 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柴胡皂苷 a $0.539 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柴胡皂苷 d $0.409 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、延胡索乙素 $0.299 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、去氢紫堇碱 $0.431 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、紫堇碱 $0.247 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

称取已知含量批号为 20160909 的理气散结颗粒 6 份,每份约 2.5 g,精密称定,分别精密加入上述各成分对照品溶液 5.0 mL、1.0 mL、1.0 mL、1.0 mL、1.0 mL、1.0 mL、70%乙醇 40 mL,按供试品溶液制备方法制备加样回收样品溶液,依法进样测定,计算芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱平均加样回收率及 RSD 值(表 2)。



注:1 为芍药苷,2 为柴胡皂苷 a,3 为柴胡皂苷 d,4 为延胡索乙素,5 为去氢紫萁碱,6 为紫萁碱

图1 理气散结颗粒 HPLC 图:A 为对照品,B 为供试品,C 为阴性样品(缺白芍),D 为阴性样品(缺柴胡),E 为阴性样品(缺延胡索),F 为空白溶剂

2.8 精密度试验 取“2.2”项下混合对照品溶液,连续进样6次,记录峰面积,结果芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫萁碱和紫萁碱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.62%、1.15%、0.72%、0.94%、1.18% 和 0.55%。

2.9 重复性试验 称取批号为 20160909 的理气散结颗粒 6 份,按照供试品溶液制备方法制成供试品溶液,依法进样测定,分别计算芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫萁碱和紫萁碱的含量,结果 6 种组分含量的 RSD 分别为 1.22%、0.89%、1.39%、0.67%、0.43% 和 1.70%。

2.10 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于室温下 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、16 h 进样测定,结果供试品溶液室温下 16 h 内稳定,芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫萁碱和紫萁碱峰面积的 RSD 分别为 1.08%、0.65%、0.82%、0.96%、0.77% 和 1.31%。

2.11 样品含量测定 取 3 批次样品,依据供试品溶液制备方法制备供试品溶液,依法进样测定,结

果见表 3。

表 3 理气散结颗粒样品含量测定结果/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	芍药苷	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	延胡索乙素	去氢紫萁碱	紫萁碱
20160909	1.527	0.217	0.161	0.119	0.173	0.096
20160910	1.449	0.244	0.176	0.103	0.196	0.108
20160911	1.682	0.197	0.139	0.130	0.158	0.083

3 讨论

3.1 提取方法的选择 在供试品溶液提取方法上,作者分别尝试了回流提取和超声提取,结果回流提取和超声提取所测 6 种成分芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫萁碱和紫萁碱的测定结果差异无统计学意义,选取操作简便的超声提取作为供试品溶液的提取方式;在此实验基础上,作者又考察了不同的超声提取时间(15 min、30 min、60 min)和提取溶剂(50% 乙醇^[1]、70% 乙醇^[8]、95% 乙醇、甲醇^[9]),结果超声提取 15 min 所测成分含量测定结果偏低,超声提取 30 min 和超声

表2 理气散结颗粒回收率实验结果

成分	取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芍药苷	2.500 4	3.818 1	3.805 0	7.635 6	100.33	99.87	0.84
	2.503 6	3.823 0	3.805 0	7.598 3	99.22		
	2.497 3	3.813 4	3.805 0	7.585 1	99.12		
	2.499 6	3.816 9	3.805 0	7.648 0	100.69		
	2.498 0	3.814 4	3.805 0	7.650 7	100.82		
	2.501 1	3.819 2	3.805 0	7.586 9	99.02		
柴胡皂苷 a	2.500 4	0.542 6	0.539 0	1.079 3	99.57	97.75	1.74
	2.503 6	0.543 3	0.539 0	1.074 4	98.53		
	2.497 3	0.541 9	0.539 0	1.059 8	96.09		
	2.499 6	0.542 4	0.539 0	1.079 5	99.65		
	2.498 0	0.542 1	0.539 0	1.062 7	96.59		
	2.501 1	0.542 7	0.539 0	1.060 5	96.07		
柴胡皂苷 d	2.500 4	0.402 6	0.409 0	0.806 2	98.68	98.09	0.71
	2.503 6	0.403 1	0.409 0	0.800 7	97.21		
	2.497 3	0.402 1	0.409 0	0.802 3	97.85		
	2.499 6	0.402 4	0.409 0	0.803 4	98.04		
	2.498 0	0.402 2	0.409 0	0.801 6	97.65		
	2.501 1	0.402 7	0.409 0	0.808 1	99.12		
延胡索乙素	2.500 4	0.297 5	0.299 0	0.595 3	99.60	97.46	1.39
	2.503 6	0.297 9	0.299 0	0.590 9	97.99		
	2.497 3	0.297 2	0.299 0	0.584 5	96.09		
	2.499 6	0.297 5	0.299 0	0.590 7	98.06		
	2.498 0	0.297 3	0.299 0	0.586 9	96.86		
	2.501 1	0.297 6	0.299 0	0.585 1	96.15		
去氢紫堇碱	2.500 4	0.432 6	0.431 0	0.858 8	98.89	98.29	1.07
	2.503 6	0.433 1	0.431 0	0.852 1	97.22		
	2.497 3	0.432 0	0.431 0	0.856 4	98.47		
	2.499 6	0.432 4	0.431 0	0.849 8	96.84		
	2.498 0	0.432 2	0.431 0	0.861 5	99.61		
	2.501 1	0.432 7	0.431 0	0.858 2	98.72		
紫堇碱	2.500 4	0.240 0	0.247 0	0.483 7	98.66	96.97	1.11
	2.503 6	0.240 3	0.247 0	0.480 3	97.17		
	2.497 3	0.239 7	0.247 0	0.476 9	96.03		
	2.499 6	0.240 0	0.247 0	0.477 5	96.15		
	2.498 0	0.239 8	0.247 0	0.477 1	96.07		
	2.501 1	0.240 1	0.247 0	0.481 5	97.73		

提取 60 min, 所测成分含量较高。以 70% 乙醇为提取溶剂时, 所测各成分综合提取率最佳, 故最终选取 70% 乙醇超声提取 30 min 作为理气散结颗粒供试品溶液的制备方法。

3.2 流动相的选择 作者在本研究中分别对甲醇-水流动相体系^[12]、乙腈-水流动相体系^[13-14]、乙腈-0.1% 磷酸溶液流动相体系^[9, 15-16]、乙腈-0.1% 冰醋酸溶液流动相体系^[6]进行了对比考察, 以色谱峰基线平稳情况和所测成分芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱的峰形及分离度为指标, 优选最佳的流动相体系, 结果以乙腈-0.1% 冰醋酸溶液为流动相按照文中的梯度洗脱进

行洗脱时, 色谱峰基线平稳, 所测各成分峰形较好, 分离度符合中国药典规定。

3.3 测定方法的选择 理气散结颗粒为中药复方制剂, 所含成分复杂, 不同活性成分的最大吸收波长差异较大, 单一波长难以同时测定多种活性成分的含量。本研究采用波长切换技术, 提高了所测定成分的灵敏性和检测结果的准确性, 同时联合梯度洗脱技术, 提高了所测各成分的分离效果, 缩短了检测时间, 实现了对理气散结颗粒中芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、延胡索乙素、去氢紫堇碱和紫堇碱 6 种成分的同时测定。同时 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法对中药复方制剂多成分同时测定存在对照品使用量较大、检测成本高等不足之处, 采用一测多评法对理气散结颗粒中多成分同时测定还在进一步研究中。

参考文献

- [1] 陆小云, 楚楚, 颜继忠. 超高效液相色谱法同时测定白芍中芍药苷和芍药内酯苷的含量[J]. 中南药学, 2012, 10(2): 98-100.
- [2] 杜伟锋, 胡淑珍, 吴芳, 等. 不同等级杭白芍中 3 个有效成分的考察[J]. 中成药, 2014, 36(2): 358-362.
- [3] 吴飞, 洪燕龙, 张继全, 等. 高效液相色谱法同时测定止颤颗粒中芒果苷和芍药苷的含量[J]. 安徽医药, 2016, 20(12): 2266-2269.
- [4] 谢若男, 杨满琴, 王丽, 等. 痹痛丸的质量控制研究[J]. 安徽医药, 2017, 21(4): 643-645.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 280-281.
- [6] 姜正华, 李劲平, 石丽颖, 等. HPLC 同时测定参积护胃颗粒中积雪草苷、延胡索乙素、柴胡皂苷 d 含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(10): 64-67.
- [7] 周卿, 尚京川. HPLC-DAD 法同时测定延胡索中 4 种生物碱的含量[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(7): 1017-1019.
- [8] 徐皓. HPLC 法测定不同产地元胡药材中 5 种生物碱含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1403-1407.
- [9] 毕福钧, 林彤. RP-HPLC 法同时测定醋延胡索配方颗粒中 7 种生物碱[J]. 中草药, 2016, 47(4): 606-609.
- [10] 张静, 周浓, 祁俊生, 等. HPLC 同时测定不同产地延胡索中的 6 种生物碱[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(4): 415-419.
- [11] 陈东东, 毛坤军, 李祥, 等. HPLC 法比较延胡索炮制前后 7 个生物碱成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1591-1595.
- [12] 易为丹, 方应权. HPLC 测定三峡库区紫花大叶柴胡中柴胡皂苷 a 含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 71-73.
- [13] 何晓梅. HPLC-ELSD 法测定大柴胡颗粒中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量[J]. 健康必读杂志, 2012, 12: 433, 406.
- [14] 李媛媛, 秦雪梅, 王玉庆, 等. 柱前衍生化法评价不同品种和产地柴胡药材和饮片的质量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 237-240.
- [15] 李伟铭, 赵月然, 杨燕云, 等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2208-2212.
- [16] 史志辉, 肖会敏, 何悦, 等. 皮肤病血毒片制备中 7 种成分转移率研究[J]. 安徽医药, 2017, 21(7): 1204-1209.

(收稿日期: 2017-04-09, 修回日期: 2018-03-24)