

高效液相色谱梯度洗脱法同时测定调气丸中 6 个主要成分含量

张铭, 马丽颖

作者单位: 辽宁中医药大学附属医院药学部, 辽宁 沈阳 110032

通信作者: 马丽颖, 女, 主任中药师, 研究方向为质量标准等药学相关研究, E-mail: maliying110032@163.com

摘要:目的 建立调气丸中和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷含量的测定方法。方法 采用 Venusil MP C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈—1.0% 冰醋酸溶液, 梯度洗脱, 流速: 0.9 mL/min, 柱温 30 ℃。结果 和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷分别在 2.97~59.40、4.26~85.20、3.59~71.80、20.68~413.60、2.66~53.20、1.84~36.80 mg/L 范围内线性关系良好; 平均回收率分别为 97.95% (RSD = 0.98%)、98.27% (RSD = 1.26%)、98.19% (RSD = 1.15%)、99.96% (RSD = 0.68%)、97.88% (RSD = 1.68%)、96.93% (RSD = 1.24%); 精密度和重复性良好; 供试品溶液在室温条件下 12 h 内稳定。结论 该方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性好, 可同时用于调气丸中 6 种主要成分的含量测定。

关键词: 调气丸; 和厚朴酚; 厚朴酚; 牡荆素葡萄糖苷; 牡荆素鼠李糖苷; 牡荆素; 金丝桃苷; 梯度洗脱法

Simultaneous determination of six main components in Tiaoqi Wan by HPLC gradient elution method

ZHANG Ming, MA Liying

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of honokiol, magnolol, vitexin-4'-O-glucoside, vitexin-2'-O-rhamnoside, vitexin and hyperoside in Tiaoqi Wan. Methods The chromatographic column was Venusil MP C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm), using the gradient mobile phase composed of acetonitrile 1.0% glacial acetic acid solution. The flow rate was 0.9 mL/min, and the temperature of column was 30 ℃. Results The linear ranges of honokiol, magnolol, vitexin-4'-O-glucoside, vitexin-2'-O-rhamnoside, vitexin and hyperoside were within 2.97 to 59.40, 4.26 to 85.20, 3.59 to 71.80, 20.68 to 413.60, 2.66 to 53.20, and 1.84 to 36.80 mg/L with average recoveries of 97.95% (RSD = 0.98%), 98.27% (RSD = 1.26%), 98.19% (RSD = 1.15%), 99.96% (RSD = 0.68%), 97.88% (RSD = 1.68%), and 96.93% (RSD = 1.24%). The precision and repeatability were good. Test solution was stable at room temperature within 12 h. Conclusions The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and it can be used for the simultaneous determination of 6 components in Tiaoqi Wan.

Key words: Tiaoqi Wan; Honokiol; Magnolol; Vitexin-4-O-glucoside; Vitexin-2-O-rhamnoside; Vitexin; Hyperoside; Gradient elution method

调气丸处方源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第二册, 由厚朴(姜制)、山楂(炒制)、山楂(炭制)、苍术(米泔水炒)、木香、香附(醋炒)等 14 味中药材加工而成的褐色水丸, 具有调气止痛、健胃消食的功效, 临床上主要用于胃脘胀闷、胃口疼痛、呃逆、噎腐吞酸、腹满带下、便泻痢疾等病症的治疗。调气丸质量控制指标相对较少, 现行标准仅规定了性状及丸剂通则项下的检测项目^[1-2], 也未检索到对该制剂多组分含量测定的文献报道。为进一步提高现行标准, 有效控制调气丸产品质量, 本文对方中主要药味厚朴^[3]中的和厚朴酚、厚朴酚

以及山楂^[3](炒制)和山楂^[3](炭制)中的牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷采用高效液相梯度洗脱色谱法^[4]进行了同时测定, 为提高调气丸质量标准提供数据支持。

1 材料

1.1 实验仪器 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); AX205 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒—托利多公司); SB-5200DTD 型超声波发生器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药 调气丸(每 20 粒重 1.0 g)来源于山东宏济堂制药集团股份有限公司(批号 1602005、

1604009、1605013);和厚朴酚对照品(批号 110730-201614,含量 99.3%)、厚朴酚对照品(批号 110729-201513,含量 98.8%)、牡荆素葡萄糖苷对照品(批号 111979-201501,含量 92.8%)、牡荆素鼠李糖苷对照品(批号 111668-200602,含量 100.0%)、牡荆素对照品(批号 111687-201603,含量 95.7%)和金丝桃苷对照品(批号 111521-201507,含量 94.3%)均来源于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Venusil MP C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-1.0%冰醋酸溶液,梯度洗脱(0~11 min,16.0% A;11~20 min,16.0% A→28.0% A;20~39 min,28.0% A→45.0% A;39~45 min,45.0% A→16.0% A);0~20 min 在 294 nm^[5-8]波长下检测和厚朴酚及厚朴酚;20~45 min 在 340 nm^[9-11]波长下检测牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷;流速:0.9 mL/min;柱温:30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷各适量,分别用甲醇制成对照品储备液(和厚朴酚 0.594 g/L、厚朴酚 0.852 g/L、牡荆素葡萄糖苷 0.718 g/L、牡荆素鼠李糖苷 4.136 g/L、

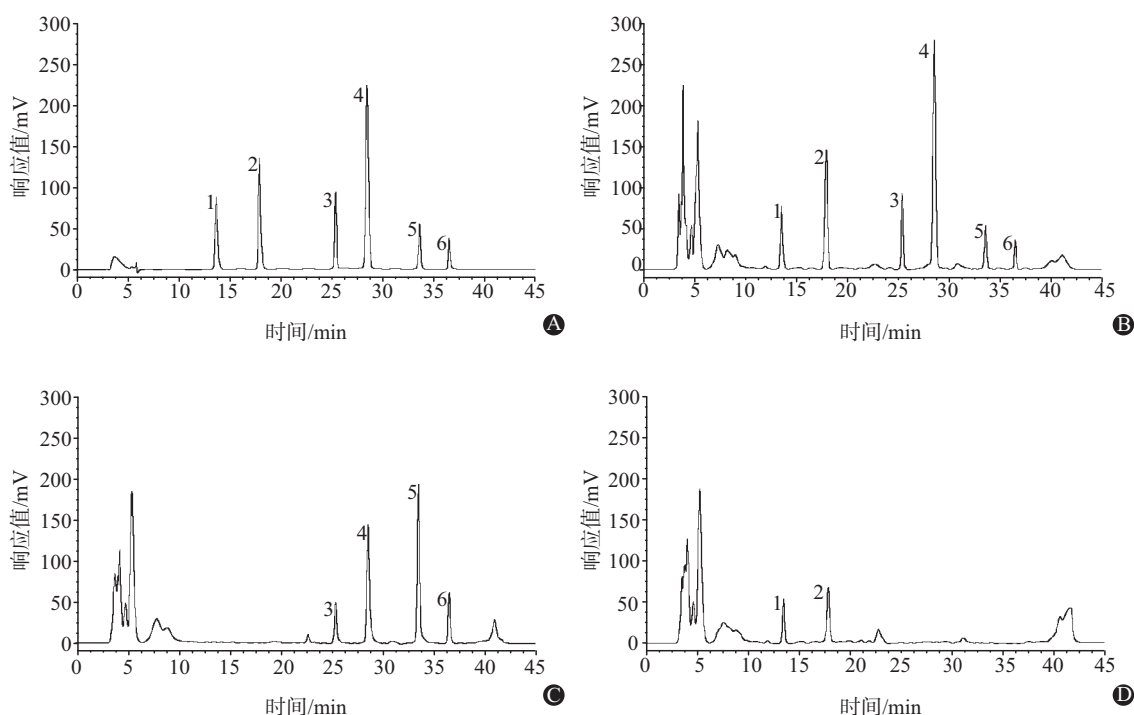
L、牡荆素 0.532 g/L、金丝桃苷 0.368 g/L)。再次吸取各对照品储备液:5.0、5.0、5.0、5.0、2.5、2.5 mL,用甲醇制成各成分浓度分别为 0.029 7、0.042 6、0.035 9、0.206 8、0.013 3、0.009 2 g/L 的混合对照品溶液。

2.2.2 样品溶液的制备 取研细后的调气丸约 2.0 g,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,称定重量,采用超声波(功率 200 W,频率 40 kHz)超声提取 30 min,放冷,用甲醇补足所减失的重量,摇匀,过滤,即得调气丸样品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按调气丸的制备工艺,分别制备不含厚朴(姜制)的阴性样品、不含山楂(炒制)和山楂(炭制)的阴性样品,再按“2.2.2”项下的方法制成对应的 2 个阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 精密吸取“2.2.1~2.2.3”项下的溶液各适量,依法进样测定,结果显示混合对照品溶液、样品溶液在相应的和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的保留时间处均有吸收峰,厚朴阴性样品溶液色谱图中无和厚朴酚、厚朴酚的吸收峰,山楂(炒制)和山楂(炭制)阴性样品溶液色谱图中无牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的吸收峰,说明各成分的检测不受干扰,色谱图见图 1。

2.4 标准曲线的制备 分别精密量取“2.2.1”项下对照品储备液各 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,



注:1 为和厚朴酚;2 为厚朴酚;3 为牡荆素葡萄糖苷;4 为牡荆素鼠李糖苷;5 为牡荆素;6 为金丝桃苷

图 1 高效液相色谱图:A 为混合对照品;B 为样品;C 为厚朴阴性供试品;D 为山楂(炒制)和山楂(炭制)阴性样品

置于6个20 mL量瓶中,用甲醇制成6个不同浓度的混合对照品溶液(样品1:和厚朴酚2.97 mg/L、厚朴酚4.26 mg/L、牡荆素葡萄糖苷3.59 mg/L、牡荆素鼠李糖苷20.68 mg/L、牡荆素2.66 mg/L、金丝桃苷1.84 mg/L;样品2:和厚朴酚5.94 mg/L、厚朴酚8.52 mg/L、牡荆素葡萄糖苷7.18 mg/L、牡荆素鼠李糖苷41.36 mg/L、牡荆素5.32 mg/L、金丝桃苷3.68 mg/L;样品3:和厚朴酚14.85 mg/L、厚朴酚21.30 mg/L、牡荆素葡萄糖苷17.95 mg/L、牡荆素鼠李糖苷103.40 mg/L、牡荆素13.30 mg/L、金丝桃苷9.20 mg/L;样品4:和厚朴酚29.70 mg/L、厚朴酚42.60 mg/L、牡荆素葡萄糖苷35.90 mg/L、牡荆素鼠李糖苷206.8 mg/L、牡荆素26.60 mg/L、金丝桃苷18.40 mg/L;样品5:和厚朴酚44.55 mg/L、厚朴酚63.90 mg/L、牡荆素葡萄糖苷53.85 mg/L、牡荆素鼠李糖苷310.20 mg/L、牡荆素39.90 mg/L、金丝桃苷27.60 mg/L;样品6:和厚朴酚59.40 mg/L、厚朴酚85.20 mg/L、牡荆素葡萄糖苷71.80 mg/L、牡荆素鼠李糖苷413.60 mg/L、牡荆素53.20 mg/L、金丝桃苷36.80 mg/L),依法进样测定和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的峰面积,以质量浓度(x , mg/L)作为横坐标,峰面积 y 为纵坐标,得和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的回归方程,结果见表1。

表1 线性关系试验结果

成分	回归方程	线性范围/ (mg/L)	r 值
和厚朴酚	$y = 4.9145 \times 10^5 x + 400.8$	2.97~59.40	0.999 9
厚朴酚	$y = 7.8957 \times 10^5 x - 291.5$	4.26~85.20	0.999 2
牡荆素葡萄糖苷	$y = 5.7983 \times 10^5 x + 339.1$	3.59~71.80	0.999 8
牡荆素鼠李糖苷	$y = 3.7349 \times 10^5 x + 194.4$	20.68~413.60	0.999 4
牡荆素	$y = 6.2487 \times 10^5 x + 327.8$	2.66~53.20	0.999 8
金丝桃苷	$y = 4.0611 \times 10^5 x - 457.0$	1.84~36.80	0.999 7

2.5 加样回收率试验 取批号为1602005的调气丸6份,研细,每份约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入精密称定的牡荆素鼠李糖苷对照品6.34 mg,精密加入和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素和金丝桃苷混合对照品溶液(和厚朴酚0.714 mg/L、厚朴酚1.302 mg/L、牡荆素葡萄糖苷0.859 mg/L、牡荆素0.313 mg/L、金丝桃苷0.199 mg/L)1.0 mL,再精密加入甲醇50 mL,按“2.2.2”的方法制备加样回收样品溶液,依法进样测定,计算和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的回收率及相应的RSD,结果见表2。

表2 加样回收率实验结果

成分	称取 量/g	样品中 含量/mg	加入 量/mg	测得 量/mg	回收 率/%	平均 值/%	RSD/%
和厚 朴酚	1.003 6	0.718 6	0.714 00	1.417 6	97.90	97.95	0.98
	0.998 7	0.715 1	0.714 00	1.419 1	98.60		
	0.991 9	0.710 2	0.714 00	1.408 3	97.77		
	1.013 5	0.725 7	0.714 00	1.435 7	99.44		
	0.998 4	0.714 9	0.714 00	1.405 9	96.78		
	1.007 5	0.721 4	0.714 00	1.415 6	97.23		
厚朴酚	1.003 6	1.323 7	1.302 0	2.627 6	100.15	98.27	1.26
	0.998 7	1.317 3	1.302 0	2.589 3	97.70		
	0.991 9	1.308 3	1.302 0	2.591 6	98.56		
	1.013 5	1.336 8	1.302 0	2.618 4	98.43		
	0.998 4	1.316 9	1.302 0	2.571 3	96.34		
	1.007 5	1.328 9	1.302 0	2.610 9	98.46		
牡荆素 葡萄 糖苷	1.003 6	0.857 1	0.859 0	1.708 2	99.08	98.19	1.15
	0.998 7	0.852 9	0.859 0	1.699 4	98.54		
	0.991 9	0.847 1	0.859 0	1.685 7	97.63		
	1.013 5	0.865 5	0.859 0	1.710 5	98.37		
	0.998 4	0.852 6	0.859 0	1.679 1	96.22		
	1.007 5	0.860 4	0.859 0	1.713 4	99.30		
牡荆素 鼠李 糖苷	1.003 6	6.349 8	6.340 0	12.679 5	99.84	99.96	0.68
	0.998 7	6.318 8	6.340 0	12.598 3	99.05		
	0.991 9	6.275 8	6.340 0	12.673 9	100.92		
	1.013 5	6.412 4	6.340 0	12.713 6	99.39		
	0.998 4	6.316 9	6.340 0	12.684 7	100.44		
	1.007 5	6.374 5	6.340 0	12.721 3	100.11		
牡荆素	1.003 6	0.313 1	0.313 0	0.621 8	98.63	97.88	1.68
	0.998 7	0.311 6	0.313 0	0.613 5	96.45		
	0.991 9	0.309 5	0.313 0	0.621 4	99.65		
	1.013 5	0.316 2	0.313 0	0.617 3	96.20		
	0.998 4	0.311 5	0.313 0	0.623 6	99.71		
	1.007 5	0.314 3	0.313 0	0.616 7	96.61		
金丝 桃苷	1.003 6	0.196 7	0.199 0	0.388 1	96.18	96.93	1.24
	0.998 7	0.195 7	0.199 0	0.389 4	97.34		
	0.991 9	0.194 4	0.199 0	0.385 6	96.08		
	1.013 5	0.198 6	0.199 0	0.390 7	96.53		
	0.998 4	0.195 7	0.199 0	0.387 2	96.23		
	1.007 5	0.197 5	0.199 0	0.394 9	99.20		

2.6 重复性试验 取同一批次调气丸样品(批号1602005),按“2.2.2”项下制备方法制备调气丸供试品溶液6份,依法进样测定,分别计算和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的含量,结果所测6个组分含量的RSD依次为1.22%、0.75%、1.06%、0.37%、1.21%和0.94%。

2.7 精密度试验 取“2.2.1”项下的混合对照品溶液,连续进样6次,依法测定和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的峰面积,结果所测各成分峰面积的RSD分别为1.06%、0.95%、1.27%、0.73%、1.41%和1.12%。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液,在室温下分别于0、2、4、6、8、10、12 h后,依法进样测定和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷的峰面积值,结果调气丸在室温下12 h内稳定,所测6个成分峰面积的RSD分别为1.05%、0.94%、1.01%、0.86%、1.19%和1.21%。

2.9 调气丸样品含量测定 取3个不同批号的调气丸,按“2.2.2”项下制备方法制备调气丸供试品溶液,依法进样测定和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷的峰面积,所测各成分含量结果见表3。

表3 调气丸样品含量测定结果/(mg/g)

批号	和厚朴酚	厚朴酚	牡荆素葡萄糖苷	牡荆素鼠李糖苷	牡荆素	金丝桃苷
1602005	0.716	1.319	0.854	6.327	0.312	0.196
1604009	0.785	1.360	0.791	6.022	0.285	0.177
1605013	0.677	1.223	0.935	6.638	0.356	0.220

3 讨论

3.1 色谱条件的考察 作者在实验中分别考察了甲醇—水^[12-13]、乙腈—水、乙腈—1.0%冰醋酸溶液^[14]和乙腈—0.5%磷酸溶液等流动相体系,以色谱峰基线平稳情况和所测各成分分离情况为指标,优选最佳的流动相体系,对比结果显示乙腈—1.0%冰醋酸溶液优于其他流动相体系,但所测成分和厚朴酚、牡荆素鼠李糖苷的分离效果不太理想。在此基础上对流动相的比例进行摸索,最终选优最佳的流动相体系为:乙腈—1.0%冰醋酸溶液梯度洗脱(0~11 min,16.0% A;11~20 min,16.0% A→28.0% A;20~39 min,28.0% A→45.0% A;39~45 min,45.0% A→16.0% A)。

3.2 供试品提取方法的确定 笔者在调气丸供试品溶液的制备实验中,分别考察不同的提取方式(回流、超声、索氏)对所测6个成分和厚朴酚、厚朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷提取效果的影响,结果三种提取方式提取效果差异不大,超声提取较为简便,故调气丸供试品溶液提取方式选为超声提取;在此基础上又对超声提取的功率和频率(150 W 28 kHz、200 W 40 kHz、300 W 40 kHz)、提取溶剂(70%甲醇、纯甲醇、纯乙醇)、提取时间(15、30、45 min)、溶剂量(25、50、100 mL)进行了考察,最终选优最佳的调气丸供试品溶液的制备方法为:加入50 mL甲醇超声(功率200 W,频率40 kHz)提取30 min。

3.3 检测波长的选择 取所测各成分和厚朴酚、厚

朴酚、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷对照品储备溶液适量,在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,结果和厚朴酚、厚朴酚在294 nm处有最大吸收,牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷在340 nm处有最大吸收。同时参考《中国药典》2015年版一部厚朴、山楂叶提取物项下各成分的检测波长,结合所测各成分的色谱图,最终确定采用波长切换法0~20 min时在294 nm波长下检测和厚朴酚及厚朴酚,20~45 min在340 nm波长下检测牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素和金丝桃苷。

综上所述,本研究采用高效液相波长切换联合梯度洗脱法测定调气丸中6个成分的含量,方法简单快速而且准确度高,填补了本品液相色谱分析方面的研究空白,可在一定程度上保证调气丸功效及质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第二册)[S]. 北京:人民卫生出版社,1990:224.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典(四部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:11-13,31,251-252,396-397.
- [3] 邓佳,陈华,金伟华. HPLC 梯度洗脱法同时测定党参养荣丸中的梓醇、毛蕊糖苷、白术内酯 I 和白术内酯 III[J]. 中国药物警戒,2015,12(1):26-29.
- [4] 郭伟魁,严倩茹. 一测多评法测定厚朴饮片片厚朴酚与和厚朴酚含量[J]. 中国执业药师,2016,13(1):23-25.
- [5] 郭建华,刘佳乐,黄亮,等. 高效液相色谱法同时测定厚朴提取物中厚朴酚与和厚朴酚[J]. 广东化工,2014,41(17):181-182.
- [6] 钱钧强,石芸,房志仲. HPLC-DAD 法同时测定参丹散结胶囊中10种成分[J]. 中草药,2017,48(10):2067-2071.
- [7] 谢淑桐,高晓霞,宋粉云,等. HPLC 法同时测定六合定中丸中6种成分[J]. 中成药,2017,39(5):960-964.
- [8] 王肖,杜义龙,赵胜男,等. 承德产山楂叶中总黄酮和5种黄酮类成分含量的动态分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):171-175.
- [9] 张立,刘金英,马灵珍. 楂曲平胃合剂中6个成分的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志,2016,47(7):915-918.
- [10] 杜义龙,李明臣,王领弟,等. HPLC 法测定不同采收期承德产山里红叶牡荆素-4'-O-葡萄糖苷的含量[J]. 承德医学院学报,2016,33(2):99-101.
- [11] 刘晓鹏,姜宁,向东山,等. 厚朴叶中厚朴酚及和厚朴酚的提取与测定[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(5):694-696.
- [12] 杨云芝,胡俊武. 厚朴有效成分厚朴酚及和厚朴酚最佳提取温度的研究[J]. 中国医药指南,2016,14(20):39.
- [13] 梁恕坤,付庆霞,冯尚彩. HPLC 法同时测定山楂叶提取物中的7种主要成分[J]. 齐鲁药事,2009,28(1):20-22.
- [14] 李晓亮,牛海军,葛德助,等. 山楂叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广州化工,2016,44(17):127-129.

(收稿日期:2017-08-09,修回日期:2017-10-16)