

HPLC 波长切换联合梯度洗脱法同时测定消疲灵颗粒中的 7 种成分

王斌, 徐盈盈, 林誉(温州医科大学附属第一医院药学部, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 建立同时测定消疲灵颗粒中 7 种成分含量的 HPLC 波长切换联合梯度洗脱方法。方法 采用 Venusil MP-C₁₈ 色谱柱, 流动相为乙腈-1%冰醋酸溶液, 流速为 0.9 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素检测浓度分别在 2.56~51.20 μg·mL⁻¹, 14.87~297.40 μg·mL⁻¹, 2.14~42.80 μg·mL⁻¹, 3.16~63.20 μg·mL⁻¹, 3.80~76.00 μg·mL⁻¹, 2.14~42.80 μg·mL⁻¹, 4.81~96.20 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系($r \geq 0.999$), 平均回收率 97.0%~100.0%, RSD 0.55%~1.67%, 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, 可用于消疲灵颗粒中 7 种有效成分含量的同时测定。

关键词: 消疲灵颗粒; 牡荆素葡萄糖苷; 牡荆素鼠李糖苷; 牡荆素; 金丝桃苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 波长切换联合梯度洗脱法; 中成药多组分测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)04-0571-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.021

Simultaneous Determination of Seven Components in Xiaopiling Granule by HPLC Wavelength Switching Combined Gradient Elution Method

WANG Bin, XU Yingying, LIN Yu(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC wavelength switching combined gradient elution method for determination of seven components in Xiaopiling granule simultaneously. **METHODS** The determination was performed on Venusil MP-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile(A)-1% glacial acetic acid solution (B) at the flow rate of 0.9 mL·min⁻¹, gradient elution and the injection volume was 10 μL. The column temperature was 30 °C. **RESULTS** The linear ranges of vitexin-4"-O-glucoside, vitexin-2"-O-rhamnoside, vitexin, hyperoside, ononin, calycosin and formononetin were 2.56~51.20 μg·mL⁻¹, 14.87~297.40 μg·mL⁻¹, 2.14~42.80 μg·mL⁻¹, 3.16~63.20 μg·mL⁻¹, 3.80~76.00 μg·mL⁻¹, 2.14~42.80 μg·mL⁻¹, 4.81~96.20 μg·mL⁻¹, respectively($r \geq 0.999$); the average recoveries were 97.0%~100.0% and the corresponding RSD was 0.55%~1.67%, respectively. The precision and the repeatability were good. Test solution was stable at room temperature in 12 h. **CONCLUSION** The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and it can be used for the simultaneous determination of 7 components in Xiaopiling granule.

KEY WORDS: Xiaopiling granule; vitexin-4"-O-glucoside; vitexin-2"-O-rhamnoside; vitexin; hyperoside; ononin; calycosin; formononetin; wavelength switching combined gradient elution method; multicomponent determination of Chinese patent drug

消疲灵颗粒收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第十五册^[1], 由黄芪、山楂、鸡血藤等 14 味中药材加工而成, 其功效为益气活血、养血安神、消除疲劳、恢复体力, 临床上主要用于过度疲劳引起的心悸气短、四肢酸痛、全身无力、精神疲惫、烦躁失眠、食欲不振和病后体质虚弱等病症的治疗。该制剂标准仅对性状及颗粒剂通则项进行控制, HPLC 同时测定该制剂中多组分的含量未见文献报道。黄芪、山楂和鸡血藤为方的主要药物^[2], 芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素为黄芪和鸡血藤的主要黄酮类成分, 牡荆素葡萄

糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷为山楂的主要成分。为保证人体用药安全, 全面控制消疲灵颗粒质量, 根据本组方中的中药组成, 本实验首次建立了牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 7 种成分同时测定的 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AG-245 型十万分之一电子分

作者简介: 王斌, 男, 药师 Tel: 13362169971 E-mail: wangbinwenzhou9971@163.com

析天平(德国 Sartorius 公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器。

1.2 试药与试剂

消痰灵颗粒(浙江大德药业集团有限公司, 每袋 6 g, 批号: 151216, 16302, 160711); 阴性试验所用药材来源于温州大宇中药饮片有限公司, 按中国药典 2015 年版一部^[2]各药材项下检验均符合规定; 牡荆素葡萄糖苷对照品(批号: 111979-201501, 含量: 92.8%, 2~10 °C 保存)、牡荆素对照品(批号: 111687-200602, 含量: 100.0%, 干燥密闭保存)、金丝桃苷对照品(批号: 111521-201507, 含量: 94.3%, 冷冻保存)、芒柄花素对照品(批号: 111703-201504, 含量: 100.0%, 2~10 °C 冷处保存)均购自中国食品药品检定研究院; 牡荆素鼠李糖苷对照品(批号: 64820-99-1, 含量: 98.0%)、毛蕊异黄酮对照品(批号: 20575-57-9, 含量: 98.0%)和芒柄花苷对照品(批号: 486-62-4, 含量: 98.0%)均购自上海纯优生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil MP-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相: 乙腈-1%冰醋酸溶液, 梯度洗脱(0~12 min, 15.0%A; 12~31 min, 15.0%→38.0%A; 31~47 min, 38.0%→54.0%A; 47~55 min, 54.0%→15.0%A); 0~31 min 时在 340 nm^[3]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, 31~55 min 在 254 nm^[4-5]下检测芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素。流速: 0.9 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金

丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素适量, 用甲醇制成浓度分别为 0.512, 2.974, 0.428, 0.632, 0.760, 0.428, 0.962 mg·mL⁻¹ 的单一成分对照品储备溶液。再分别依次量取各对照品储备液 5.0, 5.0, 2.5, 5.0, 2.5, 2.5 和 5.0 mL, 用甲醇稀释至 100 mL, 制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取消痰灵颗粒适量, 研成细粉, 取约 5.0 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 45 mL, 超声提取 30 min, 放冷后, 用甲醇加至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得消痰灵颗粒供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第十五册中消痰灵颗粒的处方及工艺过程^[1], 分别制备不含山楂、不含黄芪和鸡血藤的阴性样品, 再按“2.2.2”项下的方法制成相应的阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验与专属性试验

精密吸取“2.2”项下制备的溶液各适量, 依法测定, 试验结果显示, 2 种阴性样品溶液的色谱图中, 在对照品混合液所显示的牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 7 个成分对应的位置无干扰, 各峰之间的分离度>1.5, 理论板数均>3 000。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下的对照品储备液各 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 将其置于 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得到一系列浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 采用浓度(X)作为横坐标, 测得的峰面积(Y)作为纵坐标, 绘制标准曲线, 线性方程、相关系数及线性范围见表 1。

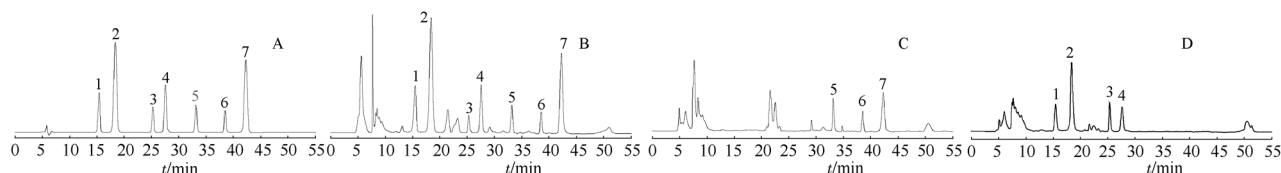


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-样品溶液; C-山楂阴性样品溶液; D-黄芪和鸡血藤阴性样品溶液; 1-牡荆素葡萄糖苷; 2-牡荆素鼠李糖苷; 3-牡荆素; 4-金丝桃苷; 5-芒柄花苷; 6-毛蕊异黄酮; 7-芒柄花素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance solution; B-sample solution; C-negative of *Crataegi Fructus* solution; D-negative of *Astragalus membranaceus* and *Spatholobus suberectus* Dunn solution; 1-vitexin-4"-O-glucoside; 2-vitexin-2"-O-rhamnoside; 3-vitexin; 4-hyperoside; 5-ononin; 6-calycosin; 7-formononetin.

表 1 线性关系试验结果

Tab. 1 The results of the linear relationship test

所测组份	回归方程	线性范围/ μg·mL ⁻¹	r
牡荆素葡萄糖苷	$y=1.208\ 7\times 10^6x-417.0$	2.56~51.20	0.999 9
牡荆素鼠李糖苷	$y=1.021\ 6\times 10^6x+385.4$	14.87~297.40	0.999 2
牡荆素	$y=7.985\ 2\times 10^5x+239.6$	2.14~42.80	0.999 7
金丝桃苷	$y=1.532\ 9\times 10^6x-201.8$	3.16~63.20	0.999 8
芒柄花苷	$y=9.864\ 1\times 10^5x+460.7$	3.80~76.00	0.999 4
毛蕊异黄酮	$y=1.001\ 9\times 10^6x+348.5$	2.14~42.80	0.999 1
芒柄花素	$y=1.837\ 1\times 10^6x+455.3$	4.81~96.20	0.999 6

2.5 加样回收率试验

取消疲灵颗粒(批号: 151216)6 份, 研细, 每份约 2.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 精密加入甲醇 20 mL、混合对照品溶液 25 mL, 超声提取 30 min, 放冷后, 用甲醇加至刻度, 摇匀, 过滤, 作为加样回收样品溶液, 依法测定, 计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 7 个组分的回收率及相应的 RSD, 结果见表 2。

2.6 重复性试验

取消疲灵颗粒样品(批号: 151216), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件及检测方法进行测定, 分别计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量及 RSD 值, 结果所测 7 个组分的 RSD 依次为 1.52%, 0.81%, 1.36%, 1.24%, 0.79%, 1.01%和 1.34%。

2.7 仪器精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.82%, 0.75%, 1.19%, 0.75%, 1.07%, 0.91%和 1.03%。

2.8 供试品溶液稳定性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液(批号: 151216), 在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12 h, 按“2.1”项下色谱条件及方法测定, 测定牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素的峰面积值, 并求得这 7 个组分峰面积的 RSD 分别为 0.78%, 1.04%, 0.69%, 1.06%, 1.04%, 0.57%和 1.17%。

表 2 加样回收率实验结果

Tab. 2 Results of recovery test

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/ %
牡荆素 葡萄糖 苷	2.500 9	0.592 7	0.640 0	1.231 9	99.88	99.7	1.67
	2.499 1	0.592 3	0.640 0	1.237 6	100.83		
	2.501 8	0.592 9	0.640 0	1.230 5	99.63		
	2.497 5	0.591 9	0.640 0	1.209 5	96.50		
	2.500 1	0.592 5	0.640 0	1.236 1	100.56		
牡荆素 鼠李糖 苷	2.503 6	0.593 4	0.640 0	1.239 4	100.94	97.1	1.12
	2.500 9	4.256 5	3.717 5	7.928 6	98.78		
	2.499 1	4.253 5	3.717 5	7.829 3	96.19		
	2.501 8	4.258 1	3.717 5	7.830 8	96.10		
	2.497 5	4.250 7	3.717 5	7.887 9	97.84		
牡荆素	2.500 1	4.255 2	3.717 5	7.866 2	97.14	97.9	0.97
	2.503 6	4.261 1	3.717 5	7.838 6	96.23		
	2.500 9	0.215 1	0.267 5	0.475 8	97.46		
	2.499 1	0.214 9	0.267 5	0.476 3	97.72		
	2.501 8	0.215 2	0.267 5	0.478 7	98.50		
金丝桃 苷	2.497 5	0.214 8	0.267 5	0.472 9	96.49	98.9	0.55
	2.500 1	0.215 0	0.267 5	0.480 6	99.29		
	2.503 6	0.215 3	0.267 5	0.477 2	97.91		
	2.500 9	0.660 2	0.790 0	1.445 2	99.37		
	2.499 1	0.659 8	0.790 0	1.439 5	98.70		
芒柄花 苷	2.501 8	0.660 5	0.790 0	1.441 9	98.91	98.6	1.41
	2.497 5	0.659 3	0.790 0	1.437 4	98.49		
	2.500 1	0.660 0	0.790 0	1.436 7	98.32		
	2.503 6	0.661 0	0.790 0	1.449 0	99.75		
	2.500 9	0.452 7	0.475 0	0.928 9	100.25		
毛蕊异 黄酮	2.499 1	0.452 3	0.475 0	0.915 2	97.45	100.0	0.98
	2.501 8	0.452 8	0.475 0	0.912 1	96.69		
	2.497 5	0.452 0	0.475 0	0.926 0	99.79		
	2.500 1	0.452 5	0.475 0	0.923 7	99.20		
	2.503 6	0.453 2	0.475 0	0.919 5	98.17		
芒柄花 素	2.500 9	0.322 6	0.267 5	0.589 9	99.93	97.0	1.03
	2.499 1	0.322 4	0.267 5	0.587 2	98.99		
	2.501 8	0.322 7	0.267 5	0.592 8	100.97		
	2.497 5	0.322 2	0.267 5	0.591 6	100.71		
	2.500 1	0.322 5	0.267 5	0.5867	98.77		
	2.503 6	0.323 0	0.267 5	0.593 0	100.93		
	2.500 9	1.408 0	1.202 5	2.593 5	98.59		
	2.499 1	1.407 0	1.202 5	2.583 2	97.81		
	2.501 8	1.408 5	1.202 5	2.564 6	96.14		
	2.497 5	1.406 1	1.202 5	2.566 0	96.46		
	2.500 1	1.407 6	1.202 5	2.570 7	96.72		
	2.503 6	1.409 5	1.202 5	2.565 5	96.13		

2.9 样品测定

取 3 批取消疲灵颗粒, 依法测定牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、金丝桃苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量, 测定结果见表 3。

表 3 含量测定结果($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Results of content determination($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

批号	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$						
	牡荆素葡萄糖苷	牡荆素鼠李糖苷	牡荆素	金丝桃苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素
151216	0.237 $\pm$ 0.004	1.702 $\pm$ 0.027	0.086 $\pm$ 0.001	0.264 $\pm$ 0.002	0.181 $\pm$ 0.001	0.129 $\pm$ 0.001	0.563 $\pm$ 0.007
160302	0.245 $\pm$ 0.001	1.786 $\pm$ 0.032	0.091 $\pm$ 0.002	0.280 $\pm$ 0.005	0.175 $\pm$ 0.003	0.136 $\pm$ 0.002	0.607 $\pm$ 0.011
160711	0.250 $\pm$ 0.002	1.737 $\pm$ 0.019	0.088 $\pm$ 0.001	0.269 $\pm$ 0.003	0.192 $\pm$ 0.002	0.125 $\pm$ 0.001	0.568 $\pm$ 0.005

3 讨论

提取方式的确定: 分别考察了不同提取方法(回流、超声、索氏)及提取溶剂(50%甲醇、75%甲醇、甲醇、乙醇)的提取效果, 结果显示, 以甲醇超声提取效果为佳。进而对提取时间(15, 30, 45 min)及溶剂量(30, 50, 70 mL)进行考察, 结果显示, 用 50 mL 甲醇超声提取 30 min 的效果最佳。

色谱条件的考察: 分别考察了乙腈-水体系^[6-7]、乙腈-磷酸溶液体系^[5]、乙腈-甲酸溶液体系^[8]和乙腈-冰醋酸溶液体系^[9]流动相, 结果发现, 采用乙腈-冰醋酸流动相系统时基线平稳, 拖尾因子符合中国药典规定, 各峰的分离度较好, 因此采用乙腈-冰醋酸水系统作为流动相系统。

本研究采用简单快速而又准确的 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法测定消疲灵颗粒中 7 个成分的含量, 该方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性好, 可用于消疲灵颗粒的质量控制, 填补了本品液相色谱分析方面的研究空白, 为消疲灵颗粒质量标准提高提供了数据支持。

REFERENCES

[1] 卫生部颁药品标准. 中药成方制剂第十五册[S]. 1998: 177.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 32, 194, 302.

[3] WANG X, DU Y L, ZHAO S N, et al. Dynamic analysis of total flavonoids and five flavonoid components in hawthorn leaves from chengde [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(17): 171-175.

[4] FU J, YANG S H, HUANG L F. Simultaneous determination of six flavonoid active components in Radix Astragali by UPLC [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2013, 48(11): 916-919.

[5] 梁永枢, 安冉, 刘军民, 等. 不同产地鸡血藤药材中染料木素及芒柄花素的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1655-1657.

[6] WANG X H, LIU T, LI Q, et al. Simultaneous determination of five isoflavonoids in commercial Radix Astragali by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2006, 24(5): 486-488.

[7] HUANG L, ZHANG H, LI H R. Determination of the content of ferulononetin in Spatholobi Caulis mixture by RP-HPLC [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2013, 19(9): 79-80.

[8] YANG M Y, GAO J, DU Y L, et al. Simultaneous determination of six effective components in Crataegus Pinnatifida by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. China Pharm(中国药房), 2016, 27(24): 3404-3407.

[9] LIANG S K, FU Q X, FENG S C. Simultaneous determination of seven major components in Hawthorn leaves extracts by HPLC [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2009, 28(1): 20-22.

收稿日期: 2016-11-06

(本文责编: 蔡珊珊)