

HPLC法同时测定妇乐颗粒中4种成分的含量

罗晓霞^{1*}, 曾偲偲¹, 祁龙凯²(1.广东省中医院药学部, 广州 510120; 2.广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4732-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.34

摘要 目的:建立同时测定妇乐颗粒中没食子酸、绿原酸、芍药苷、丹皮酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为月旭XB-C₁₈,流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为270 nm(没食子酸、丹皮酚)、325 nm(绿原酸)、230 nm(芍药苷),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:没食子酸、绿原酸、芍药苷和丹皮酚检测进样量线性范围分别为0.076 2~1.524 μg($r=0.999\ 7$)、0.037 6~0.751 μg($r=0.999\ 9$)、0.030 3~0.606 μg($r=0.999\ 7$)、0.020 6~0.412 μg($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.353、0.276、0.421、0.540 μg/mL,检测限分别为0.121、0.104、0.148、0.186 μg/mL;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤2.04%;加样回收率分别为95.24%~100.47%(RSD=1.59%, $n=9$)、99.49%~103.70%(RSD=2.27%, $n=9$)、96.27%~101.09%(RSD=1.94%, $n=9$)、95.05%~98.90%(RSD=1.22%, $n=9$)。结论:该方法操作简单、结果准确、重复性良好,可用于妇乐颗粒中没食子酸、绿原酸、芍药苷、丹皮酚含量的同时测定。

关键词 妇乐颗粒;高效液相色谱法;没食子酸;绿原酸;芍药苷;丹皮酚;含量

Simultaneous Determination of 4 Components in Fule Granules by HPLC

LUO Xiaoxia¹, ZENG Caicai¹, QI Longkai²(1.Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510120, China; 2.College of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of gallic acid, chlorogenic acid, paeoniflorin and paeonol in Fule granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Ultimate XB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 270 nm (gallic acid, paeonol), 325 nm (chlorogenic acid) and 230 nm (paeoniflorin). The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of gallic acid, chlorogenic acid, paeoniflorin and paeonol were 0.076 2-1.524 μg ($r=0.999\ 7$), 0.037 6-0.751 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 3-0.606 μg ($r=0.999\ 7$), 0.020 6-0.412 μg ($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantification were 0.353, 0.276, 0.421, 0.540 μg/mL, and the limits of detection were 0.121, 0.104, 0.148, 0.186 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all no more than 2.04%. The recoveries were 95.24%-100.47% (RSD=1.59%, $n=9$), 99.49%-103.70% (RSD=2.27%, $n=9$), 96.27%-101.09% (RSD=1.94%, $n=9$), 95.05%-98.89% (RSD=1.22%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of gallic acid, chlorogenic acid, paeoniflorin and paeonol in Fule granules.

KEYWORDS Fule granules; HPLC; Gallic acid; Chlorogenic acid; Paeoniflorin; Paeonol; Content

妇乐颗粒是由忍冬藤、大血藤、牡丹皮、赤芍、川楝子、熟大黄等中药制成的复方制剂,具有清热凉血、化瘀止痛的功效;常用于瘀热蕴结所致的带下病,症见带下量多、色黄,小腹疼痛,慢性盆腔炎见上述证候者,为妇科常用药^[1]。目前妇乐颗粒收载于2015年版《中国药典》(一部)^[1]及部颁标准《卫生部药品标准·中药成方制剂》(第18册)^[2];前者仅要求测定大黄中大黄素和大黄酚的含量,后者也只要求测定牡丹皮中丹皮酚的含量,两者均缺乏对忍冬藤主要活性成分绿原酸^[3],大血藤主要活性成分没食子酸、绿原酸等^[4-5],赤芍、牡丹皮主要活性成分没食子酸、芍药苷、丹皮酚等的测定^[6-9]。因此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定妇乐颗粒中没食子酸、绿原酸、芍药苷、丹皮酚含量的方法,以期完善该制剂的质量控制提供参考。

*主管药师。研究方向:医院药学。E-mail: Yuerluo@qq.com

1 材料

1.1 仪器

E2695型HPLC仪,包括2998二级管阵列检测器(美国Waters公司);BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司);KQ-200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q型超纯水机(德国Merck公司)。

1.2 药品与试剂

妇乐颗粒(湖北襄阳隆中药业集团有限公司,批号:151018、160404、160820、160918,规格:6 g/袋);没食子酸对照品(批号:110831-201630)、绿原酸对照品(批号:110753-201716)、芍药苷对照品(批号:110736-201640)、丹皮酚对照品(批号:110708-201407)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均≥98.0%;甲醇和磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:月旭XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 5%→11% A; 8~18 min, 11%→13% A; 18~19 min, 13%→15% A; 19~27 min, 15%→18% A; 27~28 min, 18%→53% A; 28~38 min, 53%→60% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:270 nm(没食子酸、丹皮酚)、325 nm(绿原酸)、230 nm(芍药苷);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取没食子酸、绿原酸、芍药苷和丹皮酚对照品各适量,精密称定,置于同一100 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每1 mL含没食子酸152.4 μg、绿原酸75.1 μg、芍药苷60.6 μg、丹皮酚41.2 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品1袋,置于研钵中,研成细粉,真空干燥过夜后,精密称取样品粉末1.0 g,至于50 mL具塞锥形瓶中,加入甲醇25 mL,超声(功率:150 W,频率:40 kHz,下同)处理20 min,放冷后用甲醇补足缺失的质量,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例,制备分别缺大血藤、赤芍、牡丹皮,缺忍冬藤、大血藤,缺赤芍、牡丹皮的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以没食子酸峰计为5 500,保留时间为6.948 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1.0、2.5、5.0、10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性范围见表1。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,没食子酸、绿原酸、芍药苷和丹皮酚的LOQ分别为0.353、0.276、0.421、0.540 μg/mL, LOD分别为0.121、0.104、0.148、0.186 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、绿原酸、芍药苷和丹皮酚峰面积的RSD分别为1.27%、0.85%、1.04%、0.98%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

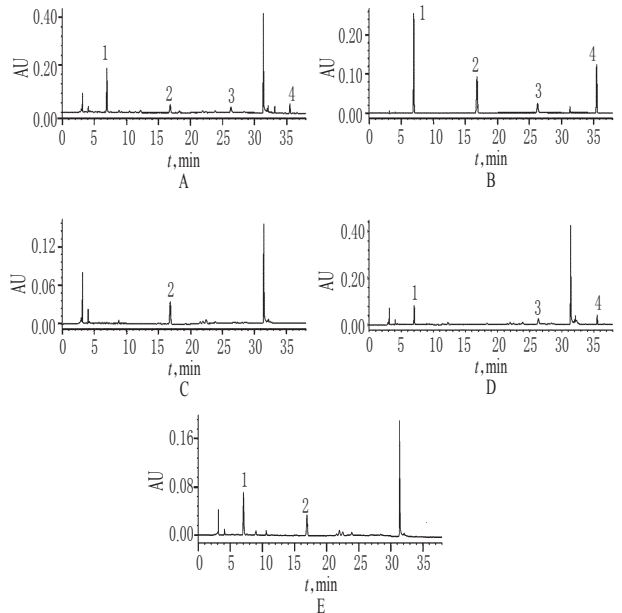


图1 高效液相色谱图
A.供试品;B.混合对照品;C.缺大血藤、赤芍和牡丹皮的阴性对照;D.缺忍冬藤、大血藤的阴性对照;E.缺赤芍、牡丹皮的阴性对照;1.没食子酸;2.绿原酸;3.芍药苷;4.丹皮酚
A.test sample; B.mixed control; C.negative control without *Sargentodoxa cuneata*, *Radix Paeoniae Rubra* and *Paeonia suffruticosa*; D.negative control without *Lonicera japonica* and *S. cuneata*; E. negative control without *Radix Paeoniae Rubra* and *P. suffruticosa*; 1. gallic acid; 2. chlorogenic acid; 3. paeoniflorin; 4. paeonol

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
没食子酸	$y=3\ 190\ 284x+121\ 521$	0.999 7	0.076 2~1.524
绿原酸	$y=28\ 668\ 195x+62\ 939$	0.999 9	0.037 6~0.751
芍药苷	$y=1\ 010\ 264x+17\ 386$	0.999 7	0.030 3~0.606
丹皮酚	$y=4\ 683\ 813x+275\ 832$	0.999 8	0.020 6~0.412

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:151018)适量,分别于室温下放置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,没食子酸、绿原酸、芍药苷和丹皮酚峰面积的RSD分别为1.39%、1.02%、1.50%、1.85%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:151018)适量,共6份,每份约1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,没食子酸、绿原酸、芍药苷和丹皮酚的含量平均值分别为3.41、1.03、0.64、0.36 mg/g, RSD分别为1.68%、2.04%、1.81%、1.70%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:151018)适量,共9份,每份约0.5 g,精密称定,分别置于50 mL具塞锥形瓶中,各加入低、中、高质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备

供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 2 Result of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%			
没食子酸	0.499 8	1.704 3	1.364 0	3.049 3	98.61	98.50	1.59			
	0.499 0	1.701 6	1.364 0	3.059 5	99.55					
	0.501 2	1.709 1	1.364 0	3.047 3	98.11					
	0.499 5	1.703 3	1.705 0	3.404 7	99.79					
	0.499 0	1.701 6	1.705 0	3.381 4	98.52					
	0.499 7	1.704 0	1.705 0	3.360 6	97.16					
	0.500 7	1.707 4	2.046 0	3.656 0	95.24					
	0.499 5	1.703 3	2.046 0	3.730 5	99.08					
	0.500 8	1.707 7	2.046 0	3.763 3	100.47					
	绿原酸	0.499 8	0.514 8	0.406 4	0.907 4			96.60	100.79	2.27
		0.499 0	0.514 0	0.406 4	0.928 9			102.08		
		0.501 2	0.516 2	0.406 4	0.932 2			102.36		
0.499 5		0.514 5	0.508 0	1.019 9	99.49					
0.499 0		0.514 0	0.508 0	1.033 9	102.35					
0.499 7		0.514 7	0.508 0	1.029 7	101.38					
0.500 7		0.515 7	0.609 6	1.113 5	98.06					
0.499 5		0.514 5	0.609 6	1.146 7	103.70					
0.500 8		0.515 8	0.609 6	1.132 2	101.11					
芍药苷		0.499 8	0.319 9	0.259 2	0.570 5	96.70	97.98	1.94		
		0.499 0	0.319 4	0.259 2	0.571 1	97.12				
		0.501 2	0.320 8	0.259 2	0.573 7	97.56				
	0.499 5	0.319 7	0.324 0	0.647 2	101.09					
	0.499 0	0.319 4	0.324 0	0.642 1	99.60					
	0.499 7	0.319 8	0.324 0	0.631 7	96.27					
	0.500 7	0.320 4	0.388 8	0.696 1	96.62					
	0.499 5	0.319 7	0.388 8	0.710 7	100.57					
	0.500 8	0.320 5	0.388 8	0.695 1	96.36					
	丹皮酚	0.499 8	0.179 9	0.145 6	0.319 2	95.70			96.63	1.22
		0.499 0	0.179 6	0.145 6	0.323 6	98.90				
		0.501 2	0.180 4	0.145 6	0.318 8	95.05				
0.499 5		0.179 8	0.182 0	0.353 6	95.49					
0.499 0		0.179 6	0.182 0	0.354 5	96.10					
0.499 7		0.179 9	0.182 0	0.357 2	97.41					
0.500 7		0.180 3	0.218 4	0.392 2	97.03					
0.499 5		0.179 8	0.218 4	0.391 4	96.90					
0.500 8		0.180 3	0.218 4	0.392 4	97.11					

2.10 样品含量测定

取4批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 3 Result of contents determination of samples(n=3,mg/g)

样品批号	没食子酸	绿原酸	芍药苷	丹皮酚
151018	2.84	0.98	0.78	0.22
160404	3.41	1.03	0.64	0.36
160820	3.50	1.12	0.85	0.45
160918	3.27	1.09	0.70	0.48

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者曾考察了甲醇-水、甲醇-0.4%磷酸溶液和甲醇-0.05%磷酸溶液为本试验的流动相体系对色谱分离的影响。结果,当采用甲醇-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,待测成分达到基线分离,峰形良好,且分析时间短,故选择上述溶液为流动相。

3.2 检测波长的选择

通过二极管阵列检测器在210~400 nm波长范围内进行扫描发现,没食子酸丹皮酚在270 nm波长处、绿原酸在325 nm波长处、芍药苷在230 nm波长处分别具有最大吸收峰,故采用波长切换技术最终确定本试验的检测波长为270 nm(0~10 min,没食子酸)、325 nm(10~20 min,绿原酸)、230 nm(20~30 min,芍药苷)、270 nm(30~43 min,丹皮酚)。

3.3 提取溶剂的选择

笔者曾考察了水、50%甲醇溶液、75%甲醇溶液、甲醇作为提取溶剂进行超声提取时待测成分的提取效果。结果发现,50%甲醇溶液、75%甲醇溶液、甲醇溶液3种提取溶剂的提取效果无明显差异,但50%甲醇和75%甲醇溶液较难过滤,故采用甲醇作为提取溶剂。

综上所述,本方法操作简单、结果准确、重复性良好,可用于妇乐颗粒中没食子酸、绿原酸、芍药苷、丹皮酚含量的同时测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:896-897.
- [2] 卫生部.卫生部颁药品标准:中药成方制剂:第18册[S].WS3-B-3403-98.
- [3] 于晓,李松涛,刘建升,等.RP-HPLC法同时测定忍冬藤中绿原酸、马钱苷、芍药苷含量的研究[J].山东农业科学,2015,47(9):124-126,145.
- [4] 刘晓涵,祁龙凯.UPLC法同时测定大血藤中4种成分的含量[J].中药新药与临床药理,2016,27(5):689-692.
- [5] 马瑞丽,于小凤,徐秀泉,等.大血藤的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2012,31(6):1-5.
- [6] 陆小华,马晓,王建,等.赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(4):595-602.
- [7] 邓开英,朱必越,朱照静.改良RP-HPLC法同时测定牡丹皮药材中芍药苷和丹皮酚的含量[J].中国药房,2013,24(15):1406-1408.
- [8] 范旭航,马天成,沈旭,等.UPLC法测定不同产地不同部位牡丹皮中6种活性成分[J].中成药,2012,34(2):317-320.
- [9] 刘杰,陈琳,范彩荣,等.基于HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS的白芍和赤芍主要成分定性定量研究[J].中国中药杂志,2015,40(9):1762-1770.

(收稿日期:2017-06-07 修回日期:2017-08-12)

(编辑:刘柳)