

UPLC法同时测定夏荔芪胶囊中5种活性成分的含量^Δ

高雪峰^{1*}, 欧阳玥², 王玉峰², 李松², 王岳², 刘敏彦^{2#} (1.河北省正定县人民医院, 河北正定 050800; 2.石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2543-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.32

摘要 目的:建立同时测定夏荔芪胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、迷迭香酸含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为Shield RP18,流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.2 ml/min,柱温为35 ℃,检测波长为240 nm,进样量为1 μl。结果:毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、迷迭香酸检测质量浓度线性范围分别为0.619~39.6、1.181~115.6、0.89~57.2、1.16~74、2.47~157.8 μg/ml(*r*均0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为97.98%~102.44%、97.37%~100.96%、98.53%~102.30%、97.06%~102.21%、100.10%~102.25%,RSD分别为1.49%、1.13%、1.40%、1.46%、0.68%(*n*=9)。结论:该方法简单快速、准确性好,可用于控制夏荔芪胶囊的质量。
关键词 夏荔芪胶囊;超高效液相色谱法;活性成分;含量测定

Simultaneous Determination of Five Active Ingredients in Xialiqi Capsule by UPLC

GAO Xuefeng¹, OUYANG Yue², WANG Yufeng², LI Song², WANG Yue², LIU Minyan² (1. People's Hospital of Zhengding County, Hebei Zhengding 050800, China; 2. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of calycosin-7-glucoside, specnuezhenide, berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and rosmarinic acid in Xialiqi capsule. METHODS: UPLC was performed on the column of Shield RP18 with mobile phase of nitrile -0.2% formic acid (gradient elution) at a flow rate of 0.2 ml/min, the column temperature was 35 ℃, the detection wavelength was 240 nm, and the injection volume was 1 μl. RESULTS: The linear range was 0.619-39.6 μg/ml for calycosin-7-glucoside (*r*=0.999 9), 1.181-115.6 μg/ml for specnuezhenide (*r*=0.999 9), 0.89-57.2 μg/ml for berberine hydrochloride (*r*=0.999 9), 1.16-74 μg/ml for palmatine hydrochloride (*r*=0.999 9) and 2.47-157.8 μg/ml for rosmarinic acid (*r*=0.999 9); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%, recoveries were 97.98%-102.44% (RSD=1.49%, *n*=9), 97.37%-100.96% (RSD=1.13%, *n*=9), 98.53%-102.30% (RSD=1.40%, *n*=9), 97.06%-102.21% (RSD=1.46%, *n*=9) and 100.10%-102.25% (RSD=0.68%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and reproducible, and can be used for the quality control of Xialiqi capsule.

KEYWORDS Xialiqi capsule; UPLC; Active ingredients; Content determination

夏荔芪胶囊为石家庄以岭药业股份有限公司自主研发的国家中药6类新药,主要由黄芪、黄柏、肉桂、夏枯草、女贞子等中药组成,具有健脾益肾、利水散结的功效,可用于治疗良性前列腺增生的主要病症,疗效确切,服用安全^[1-2]。目前,夏荔芪胶囊中测定主要成分含量的方法有薄层色谱法^[3-4],高效液相色谱法^[5-6]、气相色谱法^[7]等。传统的高效液相色谱法,分析速度慢、时间长,同时由于流速较大,在分析过程中会消耗大量的有机试剂,从而造成检测成本增高、环境污染大。而超高效液相色谱(UPLC)法具有分析速度快、流速低、分离度好、灵敏度高优点,已广泛应用于中药天然药物化学分析领域^[8-12]。因此,笔者尝试采用UPLC法对夏荔芪胶囊中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和迷迭香酸的含量进行测定,以为夏荔芪胶囊的质量提供保证。

Δ 基金项目:河北省重大科技成果转化专项项目(No.15042504Z);石家庄市科学研究与发展计划项目(No.161200097A)

* 副主任医师,硕士。研究方向:药物质量。电话:0311-66703011。E-mail: 479699662@qq.com

通信作者:副主任中药师,博士。研究方向:药物质量控制与药动学。电话:0311-66703011。E-mail: liuminyan75@163.com

1 材料

1.1 仪器

UPLC仪,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司);KQ-250B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);AT201分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Milli-Q Advantage A10超纯水系统(美国密理博公司)。

1.2 药品与试剂

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201102,纯度98.3%)、特女贞苷对照品(批号:111926-201102,纯度96.4%)、盐酸巴马汀对照品(批号:110732-200506,纯度:87.2%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度86.7%)、迷迭香酸对照品(批号:111871-201001,纯度98.6%)均购于中国食品药品检定研究院;夏荔芪胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:110301、110601、111001、130501、131001,规格:0.45 g/粒);乙腈、甲醇为色谱纯(德国Merk公司);甲酸为色谱纯(美国Fisher scientific公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shield RP18(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.2 ml/min;检测波长:240 nm;柱温:35 ℃;进样量:1 μl。按上述色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和迷迭香酸的分离度>1.5,理论板数>6 000。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	15	85
2	20	80
7	30	70
10	32	68
12	35	65

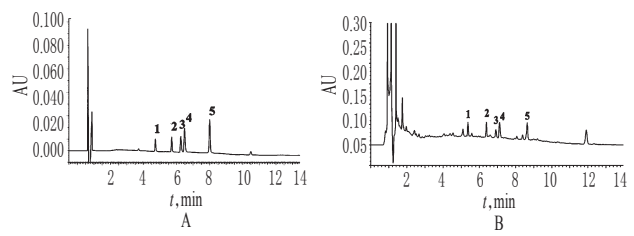


图1 超高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1.毛蕊异黄酮葡萄糖苷;2.特女贞苷;3.盐酸巴马汀;4.盐酸小檗碱;5.迷迭香酸

Fig 1 UPLC chromatograms

A.mixed reference substance;B.test samples;1.Calycosin-7-glucoside;2.Specnuezhenide;3.Berberine hydrochloride;4.Palmatine hydrochloride;5.Rosmarinic acid

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取夏荔芪胶囊内容物适量,研细,称取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密吸取80%甲醇25 ml,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和迷迭香酸对照品适量,置于同一10 ml量瓶中,用甲醇溶解至刻度,摇匀,制得含毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和迷迭香酸质量浓度分别为0.396、1.156、0.572、0.740、1.578 mg/ml的混合对照品溶液。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,置于10 ml量瓶中,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Results of regression equation and linear range

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	y=14 523.11x+1 665.22	0.619~39.6	0.999 9
特女贞苷	y=5 583.78x+2 899.9	1.181~115.6	0.999 9
盐酸巴马汀	y=16 243.52x+3 160.51	0.89~57.2	0.999 9
盐酸小檗碱	y=21 245.09x+120.13	1.16~74	0.999 9
迷迭香酸	y=11 861.45x+6 131.68	2.47~157.8	0.999 9

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液1 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、迷迭香酸峰面积的RSD分别为1.60%、1.42%、1.30%、1.59%、1.55%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取夏荔芪胶囊(批号:110601)内容物适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、迷迭香酸峰面积的RSD分别为0.97%、1.50%、1.30%、1.03%、1.32%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取夏荔芪胶囊(批号110601)内容物适量,按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液9份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、迷迭香酸含量的RSD分别为2.36%、1.71%、2.33%、2.33%、2.19%(n=9),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的夏荔芪胶囊(批号110601)内容物9份,精密称定0.5 g,平行分组,每组3份,分别按相当于样品中各组份含量的50%、100%、150%加入“2.2.2”项下混合对照品溶液,按“2.2.1”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,计算样品含量并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	110.34	54.00	164.85	100.94	100.2	1.49
	109.11	54.00	162.03	97.98		
	110.18	54.00	165.50	102.44		
	106.80	108.00	215.88	101.00		
	106.30	108.00	212.93	98.72		
	106.57	108.00	216.53	101.81		
	103.10	170.00	271.95	99.32		
	102.78	170.00	271.23	99.09		
	103.23	170.00	273.83	100.35		
	260.94	130.00	389.08	98.57		
特女贞苷	258.03	130.00	386.30	98.67	99.3	1.13
	260.55	130.00	390.18	99.71		
	252.55	260.00	513.88	100.51		
	251.38	260.00	508.80	99.01		
	252.02	260.00	505.18	97.37		
	243.82	440.00	679.73	99.07		
	243.04	440.00	684.05	100.23		
	244.11	440.00	688.33	100.96		
	81.87	38.00	120.03	100.40		
	80.96	38.00	118.40	98.53		
盐酸巴马汀	81.75	38.00	120.63	102.30	100.8	1.40
	79.24	75.00	155.93	102.25		
	78.87	75.00	153.18	99.07		
	79.07	75.00	155.08	101.34		
	76.50	105.00	181.30	99.81		
	76.26	105.00	182.45	101.14		
	76.59	105.00	183.88	102.17		
	134.54	65.00	200.98	102.21		
	133.03	65.00	198.65	100.95		
	133.03	65.00	198.65	100.95		
盐酸小檗碱	134.54	65.00	200.98	102.21	100.4	1.46
	133.03	65.00	198.65	100.95		

续表3
Cotinued tab 3

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
迷迭香酸	134.34	65.00	197.43	97.06	101.1	0.68
	130.21	130.00	259.53	99.47		
	129.61	130.00	260.93	101.01		
	129.93	130.00	260.30	100.28		
	125.71	164.00	290.83	100.68		
	125.31	164.00	291.55	101.37		
	125.86	164.00	291.18	100.80		
	364.36	240.00	606.98	101.09		
	366.52	240.00	606.75	100.10		
	365.89	240.00	608.18	100.95		
	350.88	410.00	768.70	101.91		
	349.77	410.00	762.48	100.66		
	351.30	410.00	766.43	101.25		
	355.35	645.00	1002.48	100.33		
	343.14	645.00	1002.68	102.25		
	348.72	645.00	1001.13	101.15		

2.8 样品含量测定

取5批夏荔芪胶囊样品,按“2.2.1”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,计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=2$,mg/g)

Tab 4 Results of contents determination of samples ($n=2$,mg/g)

批号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	特女贞苷	盐酸巴马汀	盐酸小檗碱	迷迭香酸
111001	0.351	0.216	0.162	0.237	0.853
110301	0.290	0.144	0.231	0.401	0.475
110601	0.209	0.482	0.151	0.253	0.685
130501	0.207	0.139	0.087	0.190	0.335
131001	0.194	0.170	0.133	0.254	0.138

3 讨论

3.1 提取溶剂和提取时间的选择

试验过程中,笔者比较了不同浓度的甲醇(50%、70%、80%、100%)和不同超声提取时间(20、30、40 min)对5种活性成分提取率的影响。结果显示,采用80%甲醇为提取溶剂,5种活性成分提取率高且杂质干扰小,超声提取30 min即可保证5种活性成分提取完全。因此,选择80%甲醇为提取溶剂,超声提取30 min。

3.2 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对5种活性成分进行紫外全波长扫描,分别提取220、240、280、329、347 nm波长处的色谱图。结果,5种活性成分均在220 nm波长处有最大吸收,但由于此波长靠近紫外末端,色谱图中杂质峰较多,干扰各成分的准确定量,综合考虑5种活性成分的光谱特点,5种活性成分在240 nm波长处的响应相对较高且杂质峰干扰较少,各组分分离度较好,故选择240 nm为本试验的检测波长。

3.3 流动相的选择

通常在分离盐酸小檗碱和盐酸巴马汀时,为达到较好的分离效果,会在流动相中添加少量的十二烷基硫酸钠和缓冲盐。在UPLC系统中,由于流动相管路极细,流速较慢,在流动相中添加上述介质进行梯度洗脱时,稍不注意就极易造成管路的阻塞,因此在本研究中,笔者考虑添加适量磷酸或甲酸以达到改善峰形和分离度的目的。结果,以乙腈-0.2%甲酸水溶液为流动相(梯度洗脱)时,样品中的5种活性成分分离度良好,且分析时间短。

综上所述,本方法简单快速、准确性好,可用于控制复荔芪胶囊的质量。

参考文献

- [1] 苏平菊,刘颖,李松,等.夏荔芪胶囊中3种活性成分的超高效液相色谱测定[C]//络病学基础与临床研究:10.北京:中华中医药学会,2014:432-434.
- [2] 何丽娟,马桂云,郭金芝,等.夏荔芪胶囊微生物限度检查方法研究[J].中国中医药现代远程教育,2014,12(1):154.
- [3] 林朝展,祝晨藺,黄琳,等.薄层扫描法测定广州黄芪商品药材中黄芪甲苷的含量[J].广东药学,2002,12(5):26.
- [4] 张倩,蔡丽芬,钟国跃,等.RP-HPLC法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2 061.
- [5] 方罗,林能明,吴永江.高效液相色谱同时测定夏枯草药材中4种活性成分的含量[J].中国中药杂志,2010,35(5):616.
- [6] 黄雯,苏子仁,毕文川,等.HPLC法测定女贞子药材中女贞苷的含量[J].药物分析杂志,2009,29(5):824.
- [7] 杜庆鹏,田金改,石上梅.GC法测定进口肉桂中桂皮醛的含量[J].中国药事,2002,16(1):37.
- [8] 刘敏彦,赵韶华,王玉峰,等.超高效液相色谱法同时测定参松养心胶囊中8种活性成分的含量[J].中国医院药学杂志,2014,34(6):435.
- [9] 任伟光,王冬梅,黄林芳.UPLC法同时测定大黄中8个成分的含量[J].药物分析杂志,2014,34(9):1 565.
- [10] 覃红萍,鲁静,林瑞超,等.黄芪中异黄酮类成分的研究[J].药物分析杂志,2009,29(5):746.
- [11] 钟祥,李应东.小檗碱药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2012,8(3):185.
- [12] 黄幼霞,黄荣桂,郑兴中.迷迭香酸药理作用的研究进展[J].海峡药学,2010,22(5):17.

(收稿日期:2015-09-01 修回日期:2015-11-04)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅