

# HPLC-ELSD法同时测定复方小酸枣咀嚼片中4种指标性成分的含量<sup>Δ</sup>

张立峰\*,刘灿仿,张东平,陈亚,卫茹,褚燕(邢台医学高等专科学校药理学系,河北邢台 054000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4275-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.26

**摘要** 目的:建立同时测定复方小酸枣咀嚼片中4种指标性成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射法。色谱柱为Grace Brava C<sub>18</sub>-BDS,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,进样量为20 μL,漂移管温度为100℃,载气流速为2.9 L/min。结果:白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸、甘草酸检测质量浓度线性范围分别为44.50~890.0 μg/mL( $r=0.9993$ )、20.28~405.6 μg/mL( $r=0.9997$ )、20.50~656.0 μg/mL( $r=0.9997$ )、10.50~336.0 μg/mL( $r=0.9996$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为99.44%~101.12%(RSD=0.57%, $n=6$ )、99.41%~100.39%(RSD=0.34%, $n=6$ )、99.31%~100.46%(RSD=0.51%, $n=6$ )、98.96%~101.19%(RSD=0.84%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性较好,可用于复方小酸枣咀嚼片中4种指标性成分含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱-蒸发光散射法;复方小酸枣咀嚼片;白桦脂酸;白桦脂醇;茯苓酸;甘草酸

## Simultaneous Determination of 4 Active Components in Compound Xiaosuanzao Chewable Tablets by HPLC-ELSD

ZHANG Lifeng, LIU Canfang, ZHANG Dongping, CHEN Ya, WEI Ru, CHU Yan(College of Pharmacy, Xingtai Medical College, Hebei Xingtai 054000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 4 active components in Compound xiaosuanzao chewable tablets. METHODS: HPLC-ELSD method was adopted. The determination was performed on a Grace Brava C<sub>18</sub>-BDS column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 25℃, and sample size was 20 μL. The drift tube temperature is 100℃, and the carrier gas flow rate is 2.9 L/min. RESULTS: The linear ranges of betulinic acid, betulinol, pachymic acid and glycyrrhizic acid were 44.50-890.0 μg/mL( $r=0.9993$ ), 20.28-405.6 μg/mL( $r=0.9997$ ), 20.50-656.0 μg/mL( $r=0.9997$ ) and 10.50-336.0 μg/mL( $r=0.9996$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility were all lower than 3.0%. The recoveries were 99.44%-101.12%(RSD=0.57%, $n=6$ ), 99.41%-100.39%(RSD=0.34%, $n=6$ ), 99.31%-100.46%(RSD=0.51%, $n=6$ ), 98.96%-101.19%(RSD=0.84%, $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of 4 active components in Compound xiaosuanzao chewable tablets.

**KEYWORDS** HPLC-ELSD; Compound xiaosuanzao chewable tablets; Betulinic acid; Betulinol; Pachymic acid; Glycyrrhizic acid

复方小酸枣咀嚼片处方源于《深师方》,是由酸枣仁、川芎、茯苓、知母、桂心、生姜、炙甘草等7味药材经提取加工而成的中药复方制剂,具有养血安神、清热除烦的功效,用于治疗虚烦不眠之证<sup>[1]</sup>。方中酸枣仁养肝血、安心神,为君药;知母、茯苓宁心安神,为臣药;川芎调畅气机,疏达肝气,为佐药;甘草和中缓肝,为使药;生姜和桂心可补肝肾不足,用于治疗心血之虚<sup>[2-3]</sup>。目前,尚无文献报道该制剂的质量标准。为严格控制产品质量,笔者以该制剂中白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸和甘草酸作为指标性成分,进行含量测定研究,为其质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

<sup>Δ</sup> 基金项目:河北省高等学校科学研究项目(No.ZC2016121)

\* 副教授,硕士。研究方向:药物的研发及教学。E-mail: 1214467005@qq.com

1100型高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1322A排气阀、G1311A泵、G1316A柱温箱、35900E转换器(美国Agilent公司);Sedex 75型蒸发光散射检测器(ELSD,日本Shimadzu公司);XP205型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);BSA124S型万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);SKQ-2200型超声波清洗仪(上海生析超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

复方小酸枣咀嚼片(河北国金药业有限责任公司,批号:20161101、20161102、20161103,规格:0.25 g/片);白桦脂酸对照品(批号:140906,纯度:≥98%)、白桦脂醇对照品(批号:141017,纯度:≥98%)均购于上海顺勃生物工程有限公司;甘草酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110731-201317,纯度:92.6%);茯苓酸对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号:29070-92-6,纯度:98.0%);乙腈为色谱纯,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: Grace Brava C<sub>18</sub>-BDS (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~10 min, 15%→25% A; 10~20 min, 25% A; 20~25 min, 25%→40% A; 25~40 min, 40%→60% A);流速: 1.0 mL/min;柱温: 25 ℃;进样量: 20 μL;漂移管温度: 100 ℃;载气流速: 2.9 L/min<sup>[4-7]</sup>。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取待测成分对照品各适量,精密称定,加50%乙醇溶液制成白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸、甘草酸质量浓度分别为890.0、405.6、656.0、336.0 μg/mL的单一对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,研细,混匀,取约0.5 g,精确称定,置于25 mL具塞锥形瓶中,加50%乙醇溶液20 mL,超声(功率:100 W,频率:56 kHz)提取30 min,加50%乙醇溶液定容,摇匀,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 按复方小酸枣咀嚼片处方和工艺分别制备缺酸枣仁、茯苓、甘草的单一阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成单一阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下单一对照品溶液、供试品溶液、单一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。结果,理论板数以白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸、甘草酸峰计均≥10 000;保留时间分别为22.6、25.1、11.6、19.2 min;分离度>2.0,各成分基线分离良好。

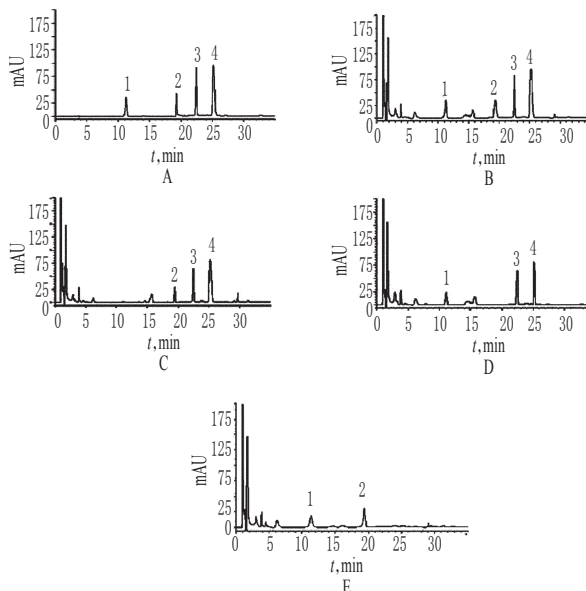
### 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下单一对照品溶液各适量,加50%乙醇溶液稀释,制成白桦脂酸质量浓度分别为44.50、89.00、267.0、356.0、445.0、890.0 μg/mL,白桦脂醇质量浓度分别为20.28、40.56、121.7、162.2、202.8、405.6 μg/mL,茯苓酸质量浓度分别为20.50、41.00、82.00、164.0、328.0、656.0 μg/mL,甘草酸质量浓度分别为10.50、21.00、42.00、84.00、168.0、336.0 μg/mL的系列单一对照品溶液。精密量取上述系列单一对照品溶液各20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度( $x$ , 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1。

### 2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下单一对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸、甘草酸峰面积的RSD分别为0.20%、0.18%、0.26%、0.16% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验



A.对照品;B.供试品;C.缺茯苓的阴性对照;D.缺甘草的阴性对照;E.缺酸枣仁的阴性对照;1.茯苓酸;2.甘草酸;3.白桦脂酸;4.白桦脂醇

A.substance control;B.test sample;C.negative control without *Poria cocos*;D.negative control without *Glycyrrhiza uralensis*;E.negative control without *Ziziphus jujuba*;1.pachymic acid;2.glycyrrhizic acid;3.betulinic acid;4.betulinol

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围( $n=6$ )

Tab 1 Regression equations and liner ranges( $n=6$ )

待测成分	回归方程	$r$	线性范围, μg/mL
白桦脂酸	$y=1.5712x+4.2345$	0.9993	44.50~890.0
白桦脂醇	$y=1.4230x+6.1067$	0.9997	20.28~405.6
茯苓酸	$y=1.4623x+5.1865$	0.9997	20.50~656.0
甘草酸	$y=1.4108x+5.1285$	0.9996	10.50~336.0

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20161101)适量,分别于室温下放置0、2、5、10、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸、甘草酸峰面积的RSD分别为2.31%、2.58%、1.37%、2.74% ( $n=5$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20161101)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,白桦脂酸、白桦脂醇、茯苓酸、甘草酸峰面积的RSD分别为2.23%、2.61%、2.42%、1.38% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20161101)适量,每份1 g,共6份,分别加入一定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。

### 2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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2 加样回收率试验结果( $n=6$ )  
Tab 2 Results of recovery tests( $n=6$ )

待测成分	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,%
白桦脂酸	0.840	0.890	1.736	100.67	100.30	0.57
	0.851	0.890	1.751	101.12		
	0.847	0.890	1.740	100.34		
	0.853	0.890	1.738	99.44		
	0.836	0.890	1.728	100.22		
	0.855	0.890	1.745	100.00		
白桦脂醇	0.437	1.014	1.455	100.39	99.93	0.34
	0.430	1.014	1.443	99.90		
	0.439	1.014	1.447	99.41		
	0.432	1.014	1.448	100.20		
	0.438	1.014	1.450	99.80		
	0.441	1.014	1.454	99.90		
茯苓酸	0.205	1.312	1.521	100.30	99.90	0.51
	0.206	1.312	1.510	99.39		
	0.212	1.312	1.530	100.46		
	0.201	1.312	1.517	100.30		
	0.237	1.312	1.540	99.31		
	0.219	1.312	1.526	99.62		
甘草酸	0.331	0.672	0.996	98.96	100.22	0.84
	0.328	0.672	1.001	100.15		
	0.342	0.672	1.022	101.19		
	0.329	0.672	1.007	100.89		
	0.332	0.672	1.001	99.55		
	0.347	0.672	1.023	100.60		

表3 样品含量测定结果( $n=3$ ,mg/g)

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

样品批号	白桦脂酸	白桦脂醇	茯苓酸	甘草酸
20161101	0.358 8	0.126 2	0.063 2	0.042 9
20161102	0.348 8	0.128 4	0.064 7	0.039 7
20161103	0.346 3	0.124 8	0.072 1	0.041 4

### 3 讨论

本试验比较了不同提取溶剂和不同超声时间的提取效率。结果显示,采用50%乙醇溶液进行超声提取效率优于其他溶剂;同时,超声提取30 min时待测成分峰面积最大。因此,本试验选择50%乙醇溶液作提取溶剂,超声提取30 min制备供试品溶液。

中药复方制剂所含有效成分较为复杂,在测定含量的情况下较易发生干扰。本课题组参考文献[8-14],经多次优化确定待测成分。白桦脂酸、白桦脂醇均属于皂苷类成分,茯苓酸、甘草酸均属于三萜类成分,上述4种成分由于结构特征在HPLC紫外检测器上响应值较低,并且相似成分较多,易引起基线漂移。而ELSD属于质量通用型检测器,只要有物质就有响应,特别适合于在

紫外无吸收或有末端吸收的化学成分的检测。因此,本试验选择HPLC-ELSD法测定该制剂中有效成分的含量。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性较好,可用于复方小酸枣咀嚼片中4种指标性成分含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 王焘.外台秘要[M].北京:人民卫生出版社,1955:92.
- [2] 丹波康赖(日).医心方[M].王大鹏,樊友平,校.上海:上海科学技术出版社,1998:546-547.
- [3] 吴巧敏,赵艺初,韩艺凡,等.基于古今医家论著对酸枣仁汤中“酸枣仁”实质的思考[J].辽宁中医杂志,2016,43(2):262-264.
- [4] 张留记,徐贞贞,屠万倩.HPLC-ELSD同时测定益心血脂康胶囊中4种皂苷类活性成分[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11):89-92.
- [5] 陈婷,刘群,莫灼康.HPLC同时测定冬虫夏草中腺苷、虫草素和麦角甾醇[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):161-163.
- [6] 李玉娟,毕开顺.RP-HPLC测定酸枣仁汤中芒果苷和甘草酸的含量[J].中成药,2010,26(10):801-804.
- [7] 李春英,张晓军.高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定四君子丸中的5种有效成分[J].光谱,2010,28(1):64-67.
- [8] 陈香玲,陈红军.高效液相色谱法同时测定八珍益母胶囊中10种活性成分含量[J].中南药学,2016,14(3):306-309.
- [9] 姜莹.白桦脂酸的研究进展及其应用前景[J].黑龙江生态工程职业学院学报,2010,23(4):32-33.
- [10] 涂艳艳.HPLC-DAD-ELSD测定酸枣仁分散片中4种成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):152-155.
- [11] 曹相兰,周雯,谢宪斌.HPLC-DAD法同时测定酸枣仁皂苷中酸枣仁皂苷A、B和白桦脂酸、白桦脂醇[J].中成药,2015,37(5):1013-1016.
- [12] 李莉,叶晓川,宋小英.UPLC-DAD-ELSD切换波长法同时测定复方酸枣仁颗粒中8种成分的含量[J].药物分析杂志,2016,36(10):1722-1728.
- [13] 张巧月,杨浩天,史贺.HPLC-MS法同时测定酸枣仁中9种成分[J].中草药,2015,46(1):123-127.
- [14] 李云静,何忠梅.HPLC法同时测定杜仲补天素片中6种成分的含量[J].中国药房,2017,28(3):401-404.

(收稿日期:2017-02-20 修回日期:2017-04-07)

(编辑:张静)