

RP-HPLC法同时测定痢必灵片中6种成分的含量^Δ

徐 阳^{1*},单柏宇²,鲍慧玮^{3#}(1.长春医学高等专科学校药品食品学院,长春 130031;2.白城市食品药品检验所,吉林白城 137000;3.长春中医药大学药学院,长春 130117)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0454-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.05

摘要 目的:建立同时测定痢必灵片中苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香炔内酯和去氢木香内酯含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm(苦参碱、氧化苦参碱)、225 nm(没食子酸、芍药苷、木香炔内酯、去氢木香内酯),柱温为30 ℃,进样量为5 μL。结果:苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香炔内酯和去氢木香内酯检测质量浓度线性范围分别为0.053~5.28 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.125~12.54 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.013~1.33 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.169~16.94 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.048~4.77 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.072~7.16 mg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为 4.08×10^{-4} 、 4.48×10^{-4} 、 3.12×10^{-4} 、 2.10×10^{-4} 、 1.36×10^{-4} 、 1.84×10^{-4} mg/mL,检测限分别为 1.24×10^{-4} 、 1.50×10^{-4} 、 1.02×10^{-4} 、 6.20×10^{-5} 、 4.20×10^{-5} 、 6.40×10^{-5} mg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%($n=6$);加样回收率分别为98.03%~101.43%(RSD=1.25%, $n=6$)、97.73%~102.26%(RSD=1.96%, $n=6$)、97.18%~101.41%(RSD=1.98%, $n=6$)、97.45%~102.11%(RSD=1.88%, $n=6$)、96.85%~101.07%(RSD=1.75%, $n=6$)、97.12%~102.64%(RSD=1.82%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,稳定、快速,可用于同时测定痢必灵片中6种成分的含量。

关键词 痢必灵片;反相高效液相色谱法;苦参碱;氧化苦参碱;没食子酸;芍药苷;木香炔内酯;去氢木香内酯;含量测定

Simultaneous Determination of 6 Components in Libiling Tablets by RP-HPLC

XU Yang¹, SHAN Baiyu², BAO Huiwei³(1.College of Drug and Food, Changchun Medical College, Changchun 130031, China; 2. Baicheng Institute for Food and Drug Control, Jilin Baicheng 137000, China; 3.College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of matrine, oxymatrine, gallic acid, peoniflorin, costunolide and dehydrocostus lactone in Libiling tablets. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 210 nm (matrine, oxymatrine) and 225 nm (gallic acid, peoniflorin, costunolide, dehydrocostus lactone). The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 5 μL. RESULTS: The linear ranges of matrine, oxymatrine, gallic acid, peoniflorin, costunolide, dehydrocostus lactone were 0.053-5.28 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.125-12.54 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.013-1.33 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.169-16.94 mg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.048-4.77 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 0.072-7.16 mg/mL ($r=0.999\ 9$). The limits of quantitation were 4.08×10^{-4} , 4.48×10^{-4} , 3.12×10^{-4} , 2.10×10^{-4} , 1.36×10^{-4} , 1.84×10^{-4} mg/mL, respectively. The limits of detection were 1.24×10^{-4} , 1.50×10^{-4} , 1.02×10^{-4} , 6.20×10^{-5} , 4.20×10^{-5} , 6.40×10^{-5} mg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2% ($n=6$). The recoveries were 98.03%-101.43% (RSD=1.25%, $n=6$), 97.73%-102.26% (RSD=1.96%, $n=6$), 97.18%-101.41% (RSD=1.98%, $n=6$), 97.45%-102.11% (RSD=1.88%, $n=6$), 96.85%-101.07% (RSD=1.75%, $n=6$), 97.12%-102.64% (RSD=1.82%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: Established method is simple, stable and rapid, and can be used for simultaneous determination of 6 components in Libiling tablets.

KEYWORDS Libiling tablets; RP-HPLC; Matrine; Oxymatrine; Gallic acid; Peoniflorin; Costunolide; Dehydrocostus lactone; Content determination

痢必灵片是由苦参、白芍、木香等3味中药提取制成的中药成方制剂,其处方收载于2015年版《中国药典》

^Δ基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81403138);吉林省卫生计生青年科技骨干培养计划项目(No. 2016Q052);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(No. JJKH20181392KJ)

*讲师,博士。研究方向:中药有效成分及药效学研究。电话:0431-84825155。E-mail:251748191@qq.com

#通信作者:实验师,硕士。研究方向:中药有效成分及药效学研究。电话:0431-86172690。E-mail:baohuiwei@163.com

(一部)^[1]。该药具有清热、去湿、止痢之功效,可用于治疗大肠湿热所致的痢疾、泄泻、症见发热腹痛、大便脓血、里急后重。方中苦参的主要药效成分为生物碱类化合物苦参碱和氧化苦参碱,其具有清热燥湿的功效^[2-3];芍药苷为白芍的指标性成分,具有缓急止痛、抗炎、抑菌等作用^[4];木香中的倍半萜内酯类化合物木香炔内酯和去氢木香内酯,是其发挥行气止痛、调中导滞功效的物质基础^[5];没食子酸是3味中药的共有成分,其在抗

菌、抗病毒、抗炎等方面作用显著^[6]。2015年版《中国药典》(一部)^[1]及相关文献^[7-9]中仅将苦参碱或芍药苷作为痢必灵含量测定的指标,但中药的有效成分多而复杂,单一成分的含量测定在一定程度上不能准确、全面地反映中药质量。为此,在本研究中笔者采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立了同时测定痢必灵片中苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香炔内酯和去氢木香内酯含量的方法,旨在为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260型 HPLC 仪,包括二极管全波长阵列检测器、自动进样器、四元梯度泵(美国 Agilent 公司);KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-2 型数显恒温水浴锅(宁波江南仪器厂);DHG-912A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密科学仪器有限公司);AB135-S 型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];R 系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);DP30A 型单冲压片机(北京国药龙立科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

痢必灵片(长春中医药大学自制,批号:20170801、20170802、20170803,规格:0.44 g/片);苦参碱对照品(批号:110805-200815,纯度:98%)、氧化苦参碱对照品(批号:110780-200317,纯度:98%)、木香炔内酯对照品(批号:111524-200514,纯度:92%)、去氢木香内酯对照品(批号:111525-200001,纯度:95%)均购于中国食品药品检定研究院;没食子酸对照品(批号:110831-201205,纯度:98%)、芍药苷对照品(批号:110736-200833,纯度:98%)均购于南京景竹生物科技有限公司;甲醇[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];磷酸(分析纯,北京化工厂);纯净水(杭州娃哈哈股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm(苦参碱、氧化苦参碱)、225 nm(没食子酸、芍药苷、木香炔内酯、去氢木香内酯);柱温:30 ℃;进样量:5 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

t, min	A, %	B, %
0~10	13	87
11~25	28	72
26~30	40	60
31~50	70	30

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取苦参碱对照品 5.28 mg、氧化苦参碱对照品 12.54 mg、没食子酸对照品 1.33 mg、芍药苷对照品 16.94 mg、木香炔内酯对照品 4.77 mg、去氢木香内酯对照品 7.16 mg,置于同一 10 mL

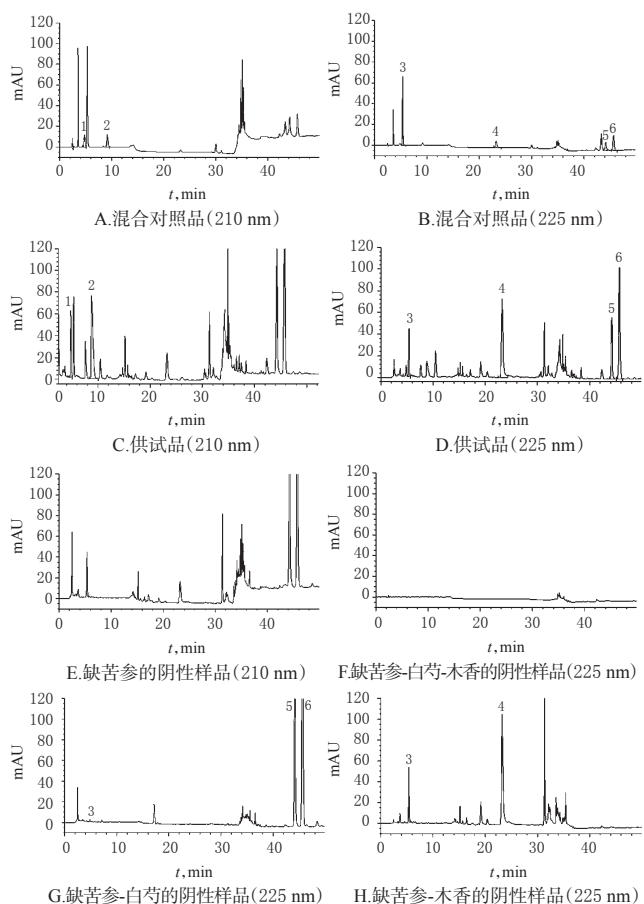
量瓶中,加甲醇,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)溶解并定容至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品粉末约 2 g,置于 25 mL 具塞锥形瓶中,加甲醇 15 mL,称定质量,超声处理 15 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按本品处方比例分别制备缺苦参、缺苦参-白芍-木香、缺苦参-白芍、缺苦参-木香的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各适量,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,各待测成分与其他色谱峰均能达到基线分离,分离度均大于 1.5,理论板数均不低于 2 000,且在相同位置上阴性样品对测定无干扰。



注:1.苦参碱;2.氧化苦参碱;3.没食子酸;4.芍药苷;5.木香炔内酯;6.去氢木香内酯

Note: 1.matrine; 2.oxymatrine; 3.gallic acid; 4.peoniflorin; 5.cos-tunolide; 6.dehydrocostus lactone

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.5、1、2、

5、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得系列线性关系工作溶液。精密量取上述系列线性关系工作溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度(x ,mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得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 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围,mg/mL
苦参碱	$y=2.811.5x+42.561$	0.999 8	0.053~5.28
氧化苦参碱	$y=3.673.9x-102.09$	0.999 9	0.125~12.54
没食子酸	$y=6.775.7x-7.309.8$	0.999 8	0.013~1.33
芍药苷	$y=2.336.3x+91.275$	0.999 9	0.169~16.94
木香烃内酯	$y=4.637.8x-26.779$	0.999 8	0.048~4.77
去氢木香内酯	$y=6.292.2x-154.33$	0.999 9	0.072~7.16

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香烃内酯、去氢木香内酯的定量限分别为 4.08×10^{-4} 、 4.48×10^{-4} 、 3.12×10^{-4} 、 2.10×10^{-4} 、 1.36×10^{-4} 、 1.84×10^{-4} mg/mL,检测限分别为 1.24×10^{-4} 、 1.50×10^{-4} 、 1.02×10^{-4} 、 6.20×10^{-5} 、 4.20×10^{-5} 、 6.40×10^{-5} mg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20170801)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,苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积的RSD分别为1.71%、1.52%、1.33%、1.25%、1.72%、1.67%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20170801)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积的RSD分别为0.38%、0.90%、0.74%、0.50%、0.15%、0.71%($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取样品(批号:20170801)粉末适量,共6份,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,记录峰面积并计算各待测成分含量。结果,苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香烃内酯、去氢木香内酯的平均含量分别为3.966、9.391、0.668、12.592、3.610、5.271 mg/g,RSD分别为0.80%、0.64%、0.82%、0.24%、0.50%、0.23%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:20170801)粉末约1 g,共

6份,分别加入混合对照品溶液(苦参碱、氧化苦参碱、没食子酸、芍药苷、木香烃内酯、去氢木香内酯的质量浓度分别为4.120、10.070、0.710、12.580、3.550、5.340 mg/mL)1 mL,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3。

表3 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 3 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,%
苦参碱	4.675	4.120	8.714	98.03	99.43	1.25
	5.021	4.120	9.082	98.57		
	4.998	4.120	9.177	101.43		
	4.975	4.120	9.105	100.24		
	4.628	4.120	8.699	98.81		
	4.752	4.120	8.852	99.51		
氧化苦参碱	10.252	10.070	20.437	101.14	100.21	1.96
	9.882	10.070	20.051	100.98		
	9.476	10.070	19.774	102.26		
	9.578	10.070	19.419	97.73		
	9.904	10.070	20.115	101.40		
	9.613	10.070	19.458	97.77		
没食子酸	0.692	0.710	1.391	98.45	98.87	1.98
	0.715	0.710	1.407	97.46		
	0.691	0.710	1.411	101.41		
	0.704	0.710	1.423	101.27		
	0.701	0.710	1.391	97.18		
	0.685	0.710	1.377	97.46		
芍药苷	12.679	12.580	25.386	101.01	100.50	1.88
	12.147	12.580	24.993	102.11		
	12.889	12.580	25.703	101.86		
	12.534	12.580	24.793	97.45		
	12.227	12.580	25.015	101.65		
	12.704	12.580	25.147	98.91		
木香烃内酯	3.691	3.550	7.170	98.00	99.40	1.75
	3.577	3.550	7.015	96.85		
	3.709	3.550	7.224	99.01		
	3.115	3.550	6.679	100.39		
	3.383	3.550	6.971	101.07		
	3.549	3.550	7.137	101.07		
去氢木香内酯	5.265	5.340	10.635	100.56	99.93	1.82
	5.533	5.340	10.719	97.12		
	5.738	5.340	11.036	99.21		
	5.561	5.340	10.883	99.66		
	5.289	5.340	10.651	100.41		
	5.424	5.340	10.905	102.64		

2.10 耐用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件[分别以不同色谱柱(美国Agilent公司ZORBAX SB-C₁₈、TC-C₁₈和美国Waters公司XBridge-C₁₈)、流动相(B)浓度比例(0.05%、0.10%、0.15%磷酸)、不同流速(0.95、1.00、1.05 mL/min)、不同柱温(25、30、35 ℃)]进样测定,记录峰面积并计算各待测成分含量,结果见表4。结果表明,该方法能够满足试验要求,耐用性良好。

2.11 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品

表4 耐用性试验结果(n=3)

Tab 4 Results of durability tests(n=3)

待测成分	项目	色谱柱			流动相(B)			流速			柱温		
		Agilent ZORBAX SB-C ₁₈	Agilent TC-C ₁₈	Waters XBridge-C ₁₈	0.05%磷酸溶液	0.10%磷酸溶液	0.15%磷酸溶液	0.95 mL/min	1.00 mL/min	1.05 mL/min	25 °C	30 °C	35 °C
苦参碱	含量,mg/g	3.874	3.766	3.901	3.914	3.815	3.815	3.907	3.842	3.832	3.825	3.891	3.773
	RSD,%	1.86			1.30			1.05			1.54		
氧化苦参碱	含量,mg/g	9.193	9.304	9.225	9.208	9.404	9.351	9.382	9.341	9.146	9.175	9.353	9.372
	RSD,%	0.62			1.09			1.36			1.17		
没食子酸	含量,mg/g	0.683	0.687	0.662	0.662	0.685	0.677	0.662	0.679	0.665	0.658	0.667	0.645
	RSD,%	1.98			1.73			1.36			1.68		
芍药苷	含量,mg/g	12.598	12.805	12.617	12.575	12.608	12.752	12.801	12.684	12.699	12.588	12.554	12.393
	RSD,%	0.90			0.74			0.50			0.83		
木香炔内酯	含量,mg/g	3.617	3.554	3.572	3.486	3.561	3.447	3.577	3.592	3.499	3.628	3.584	3.553
	RSD,%	0.91			1.66			1.40			1.05		
去氢木香内酯	含量,mg/g	5.228	5.171	5.193	5.265	5.248	5.337	5.196	5.203	5.285	5.290	5.244	5.181
	RSD,%	0.55			0.89			0.95			1.04		

溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各待测成分含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 5 Results of content determination of samples(n=3,mg/g)

批号	苦参碱	氧化苦参碱	没食子酸	芍药苷	木香炔内酯	去氢木香内酯
20170801	3.934	9.382	0.683	12.679	3.549	5.265
20170802	3.871	9.157	0.668	12.590	3.611	5.147
20170803	3.893	9.359	0.657	12.735	3.526	5.224
RSD,%	0.82	1.33	1.95	0.58	1.23	1.15

3 讨论

笔者参考相关文献^[10-13],分别考察了不同提取方法(超声提取法、回流提取法、温浸法、索氏提取法)、不同提取溶剂(乙醇、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯)和不同提取时间(10、15、20、25、30 min)对提取效率的影响,结果发现以甲醇为提取溶剂、超声提取 15 min 时的提取效率最好。

笔者参考 2015 年版《中国药典》(一部)^[1]和相关文献^[14-15]采用双波长检测各待成分。结果,检测波长为 210 nm(苦参碱、氧化苦参碱)、225 nm(没食子酸、芍药苷、木香炔内酯、去氢木香炔内酯)时的分离效果最好、检测信号最强。

笔者又对不同流动相组成(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液)和不同进样量(5、10、15 μL)进行了比较。结果,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱)、进样量为 5 μL 时,各待测成分色谱峰与邻近色谱峰分离度良好,出峰时间适宜。

综上所述,本研究所建方法操作简便、稳定、快速,可用于同时测定痢必灵片中 6 种成分的含量。

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,2015:1618.
- [2] 朱小庆,魏于杰,叶玲玉.RP-HPLC 法测定痢必灵片中芍

药苷的含量[J].临床合理用药杂志,2015,8(34):120-121.

- [3] 吴高芬,汤爱良.痢必灵片的质量标准[J].中国药师,2008,11(3):295-297.
- [4] 王思鸿,陈坚平.RP-HPLC 测定痢必灵片中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J].中国实用医药,2008,3(17):3-4.
- [5] 龙梅,徐玲,王欢.苦参的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(99):78-79.
- [6] 孙磊,郭江玉,闫彦,等.苦参化学成分及其生物碱抑菌活性研究[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(11):49-53.
- [7] 崔虹,朱佳茜,冯秋芳,等.中药白芍化学成分及生物活性研究进展[J].海峡药学,2017,29(9):1-5.
- [8] 毛景欣,王国伟,易漫,等.川木香化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(22):4797-4803.
- [9] 郑雪花,杨君,杨跃辉.没食子酸药理作用的研究进展[J].中国医院药学杂志,2017,37(1):94-98,102.
- [10] 李华丽,王小龙,叶晓娅.HPLC-DAD 法同时测定苦参配方颗粒中 6 种生物碱成分的含量[J].中南药学,2018,16(5):687-691.
- [11] 孔维姝,闫丹彤,王淼,等.HPLC 法测定苦参康肤搽剂中苦参碱、氧化苦参碱和苍术素的含量[J].沈阳药科大学学报,2018,35(1):43-46.
- [12] 白凤,董玉,李斌鑫,等.HPLC 法同时测定蒙药复方协日嘎-4 中 5 种有效成分的含量[J].中国药房,2018,29(14):1964-1967.
- [13] 程中琴,刘小妹,施崇精,等.HPLC 法同时测定平脏调神颗粒中 8 种成分的含量[J].中国药房,2018,29(1):33-37.
- [14] 崔佰吉,张宏梅,朱鹤云,等.HPLC 法同时测定桑菊感冒颗粒中 5 种有效成分的含量[J].中国药房,2018,29(12):1609-1612.
- [15] 孙迪迪,湛建峰,邱娟.HPLC 同时测定木香顺气丸中 5 种成分的含量[J].食品与药品,2017,19(4):264-268.

(收稿日期:2018-06-30 修回日期:2018-12-11)

(编辑:陈宏)