

高效液相色谱法同时测定小儿黄龙颗粒中芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量

杨 静^{1*}, 李艳艳², 单雪峰^{1#} (1. 重庆医科大学附属第一医院药理学部, 重庆 400016; 2. 重庆市中医院药剂科, 重庆 400021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)10-1219-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.10.017

摘要 目的:建立高效液相色谱法同时测定小儿黄龙颗粒中标志成分芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量。方法:采用高效液相色谱法切换波长同时测定小儿黄龙颗粒中芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量,色谱柱为 C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),以乙腈-0.1%磷酸溶液(含0.1%的十二烷基硫酸钠)-三乙胺($V:V:V=15:84:1$)为流动相,流速为1.0 ml/min,柱温为30 $^{\circ}$ C,采用二极管阵列检测器分别在230、334和397 nm波长处测定芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量。结果:该方法可同时测定小儿黄龙颗粒中芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量。芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元进样量分别在100~1 000、40~400和100~1 000 ng范围内与峰面积呈良好的线性关系,线性方程分别 $Y=3\,946\,X+540$ ($r=0.999\,7$)、 $Y=9\,463\,X+1\,064$ ($r=0.999\,8$)和 $Y=4\,246\,X+465$ ($r=0.999\,9$)。芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的加样回收率分别为97.4%~101.0%、95.4%~100.6%和98.3%~101.2%, RSD 分别为1.35%、1.87%和1.06%。结论:本研究建立的方法采用同一高效液相色谱条件切换波长,可同时检测3种标志成分含量,方法专属性强、准确度高且重复性好,节约检测时间,可作为小儿黄龙颗粒的质量控制方法。

关键词 小儿黄龙颗粒; 高效液相色谱法; 芍药苷; 毛蕊花糖苷; 鲁斯可皂苷元; 含量

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Mullein Glucoside and Ruscogenin in Xiao'er Huanglong Granules by HPLC

YANG Jing¹, LI Yanyan², SHAN Xuefeng¹ (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the simultaneous determination of paeoniflorin, mullein glucoside and ruscogenin in Xiao'er Huanglong granules by HPLC. **METHODS:** The contents of paeoniflorin, mullein glucoside and ruscogenin in Xiao'er Huanglong granules were determined simultaneously by using the method of HPLC. The chromatographic column was C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), with acetonitrile-0.1% phosphate solution (0.1% sodium dodecylsulphonate)-triethylamine ($V:V:V=15:84:1$) as mobile phase, the flow rate was 1.0 ml/min, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, the contents of paeoniflorin, mullein glucoside and ruscogenin at 230, 334 and 397 nm were determined by diode array detector. **RESULTS:** The content of paeoniflorin, mullein glucoside and ruscogenin in Xiao'er Huanglong granules could be determined simultaneously by HPLC. There was a good linear relationship between the peak area and the contents of paeoniflorin, mullein calycoside and ruscogenin in the range from 100 ng to 1 000 ng, from 40 ng to 400 ng, and from 100 ng to 1 000 ng. The linear equations were $Y=3\,946\,X+540$ ($r=0.999\,7$), $Y=9\,463\,X+1\,064$ ($r=0.999\,8$) and $Y=4\,246\,X+465$ ($r=0.999\,9$). The recoveries of paeoniflorin, marigold glucoside and ruscogenin were respectively from 97.4% to 101.0%, from 95.4% to 100.6%, and from 98.3% to 101.2%, with RSD of 1.35%, 1.87% and 1.06%. **CONCLUSIONS:** The method can be used to detect the contents of three kinds of marker components simultaneously by the method for switching wavelength of HPLC. The method has strong specificity, high accuracy, good repeatability and can save detection time, which can be used for the quality control of Xiao'er Huanglong granules.

KEYWORDS Xiao'er Huanglong granules; HPLC; Paeoniflorin; Marigold glucoside; Ruscogenin; Contents

* 药师。研究方向:中药药物分析。E-mail:14975181@qq.com

通信作者:主管药师,博士。研究方向:中药学、临床药理学和循证医学。E-mail:xfshan0325@163.com

小儿黄龙颗粒是重庆希尔安药业有限公司开发的用于治疗注意缺陷多动障碍的中药组合物颗粒(批准文号为国药准字 Z20143009),其成分包括熟地黄、白芍、麦冬、知母、五味子、煅龙骨、煅牡蛎、党参、石菖蒲、远志和桔梗等 11 味中药^[1-2]。其中,白芍、熟地黄和麦冬为君药,起着重要的滋阴补肾、平肝潜阳和安神定志的作用,临床研究表明,小儿黄龙颗粒治疗注意缺陷多动障碍,能有效提高治疗效率,减轻患儿临床症状,提高患儿认知功能^[3-7]。白芍、熟地黄和麦冬的有效成分分别为芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元,因此,控制上述 3 种成分的含量是保证小儿黄龙颗粒产品质量的关键。目前,小儿黄龙颗粒国家药品标准(YBZ00892011)中只控制了芍药苷的含量。若增加毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量检测,根据文献报道,只能采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分别检测,检测时间长,效率低^[8-9]。本研究探讨采用 HPLC 切换波长的方法同时测定小儿黄龙颗粒中芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量,为小儿黄龙颗粒质量标准的提升提供依据。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-2030C 型高效液相色谱仪,LabSolutions 色谱工作站(日本岛津公司);CP225D 型电子分析天平、BS124S 型电子分析天平(北京塞多利斯天平有限公司);UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);KQ5200B 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

芍药苷对照品(批号:110736-201943;含量:95.1%),毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201914;含量:95.2%),鲁斯可皂苷元对照品(批号:111909-201906;含量:98.5%),均购于中国食品药品检定研究院;小儿黄龙颗粒(规格:5 g/袋;批号:190801、190802 和 190803),由重庆希尔安药业有限公司提供;甲醇、乙腈、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)为色谱纯;水为纯化水;磷酸、三乙胺以及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

色谱柱为 Agela Venusil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(含 0.1%SDS)-三乙胺(V:V:V=15:84:1),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,采用二极管阵列紫外检测器分别在 230、334 和 397 nm 波长处测定芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的含量^[10-12]。在上述色谱条件下,芍药苷在 230 nm 波长下的色谱峰与其他色谱峰呈基线分离,分离度>2.0;毛蕊花糖苷在 334 nm 波长下的色谱峰与其他色谱峰呈基线分离,分离度>3.0;鲁斯可皂苷元在 397 nm 波长下的色谱峰与其他色谱峰呈基线分离,分离度>2.0。

2.2 溶液的配制

2.2.1 芍药苷对照品溶液的制备:精密称取芍药苷对照品适量,精密称定,加适量的 70%甲醇溶液,超声处理 10 min(功率

为 200 W,频率为 40 kHz),冷却后加甲醇定容稀释成质量浓度为 500 μg/ml 的储备液,再精密取储备液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容稀释成质量浓度为 50 μg/ml 的溶液,摇匀,作为对照品溶液^[13-14]。

2.2.2 毛蕊花糖苷对照品溶液的制备:精密称取毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加适量的 70%甲醇溶液,超声处理 10 min(功率为 200 W,频率为 40 kHz),冷却后加甲醇定容稀释成质量浓度为 200 μg/ml 的储备液,再精密取储备液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容稀释成质量浓度为 20 μg/ml 的溶液,摇匀,作为对照品溶液^[15-16]。

2.2.3 鲁斯可皂苷元对照品溶液的制备:精密称取鲁斯可皂苷元对照品适量,精密称定,加适量的 70%甲醇溶液,超声处理 10 min(功率为 200 W,频率为 40 kHz),冷却后加甲醇定容稀释成质量浓度为 500 μg/ml 的储备液,再精密取储备液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容稀释成质量浓度为 50 μg/ml 的溶液,摇匀,作为对照品溶液^[17]。

2.2.4 供试品溶液的制备:取样品内容物,研细,取约 1 g,精密称定,置于 50 ml 容量瓶中,加适量的 70%甲醇溶液,超声处理 10 min(功率为 200 W,频率为 40 kHz),冷却后加甲醇稀释定容至 50 ml,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试液。

2.2.5 阴性对照溶液的配制:按照“2.2.4”项下供试品溶液的制备方法,分别制备不含白芍药材或不含熟地黄药材或不含麦冬药材的阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液以及阴性供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果见图 1。在上述色谱条件下,在相应检测波长下,供试品色谱图中,毛蕊花糖苷或芍药苷与其他组分峰基线分离较好,供试品中毛蕊花糖苷或芍药苷与相应对照品在相同保留时间有相同色谱峰,且阴性对照均在主成分出峰处不出峰,表明本方法专属性好。

2.4 线性关系考察

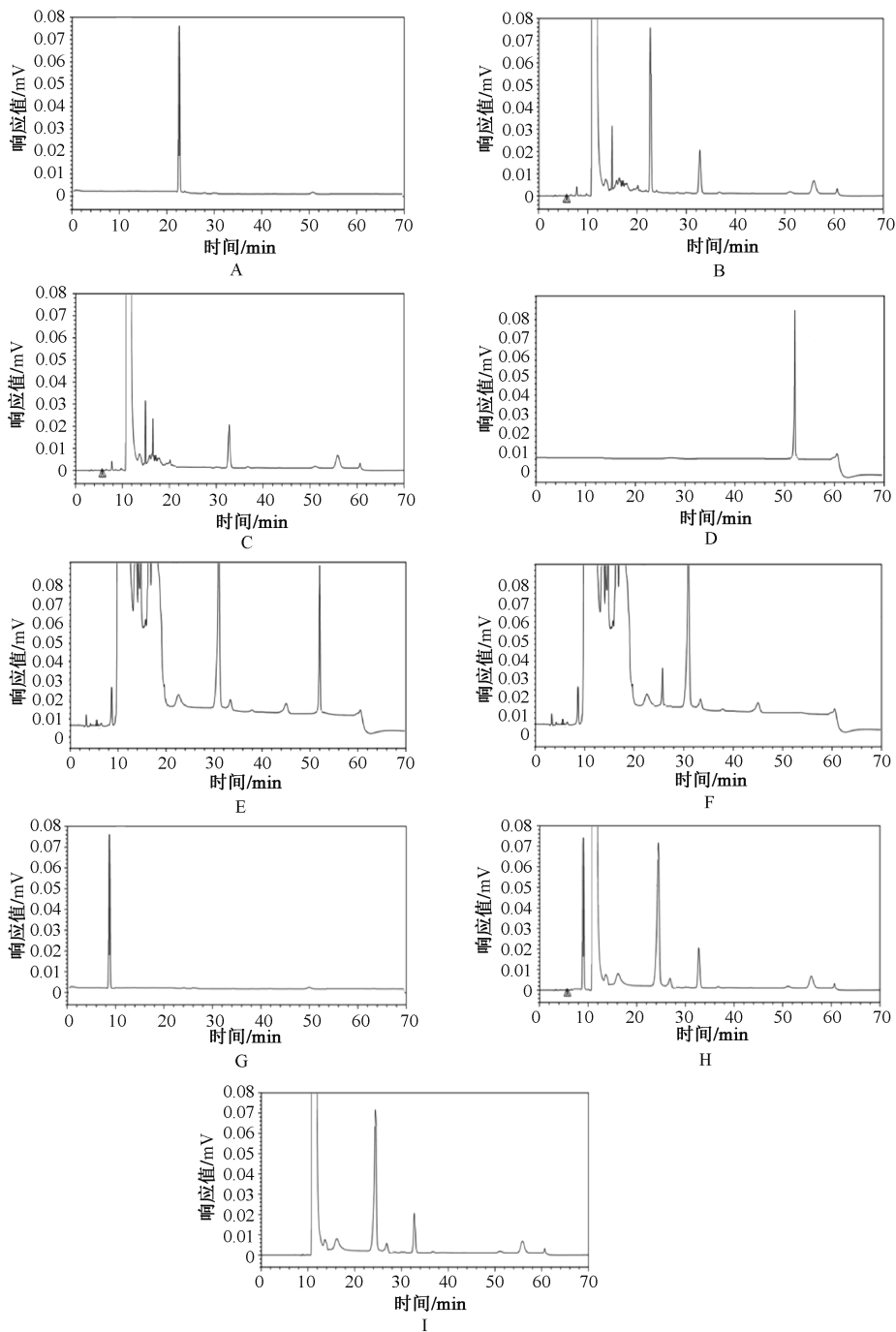
分别精密吸取“2.2”项下各对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 2.0 ml 置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,按照“2.1”项下色谱条件进样检测。以峰面积 Y 对进样量(ng)进行线性回归,分别在 230、334 和 397 nm 波长处,芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元进样量分别在 100~1 000、40~400 和 100~1 000 ng 范围内与峰面积呈良好的线性关系,线性方程分别为 $Y=3\,946\,X+540$ ($r=0.999\,7$)、 $Y=9\,463\,X+1\,064$ ($r=0.999\,8$) 和 $Y=4\,246\,X+465$ ($r=0.999\,9$)^[18-20]。

2.5 检测限和定量限

分别精密量取“2.2”项下单一对照品溶液适量,逐级稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,当信噪比为 10:1 时,得定量限;当信噪比为 3:1 时,得检测限。结果显示,芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元的定量限分别为 20、8 和 20 ng,检测限分别为 8、3 和 8 ng。

2.6 中间精密度试验

取样品内容物细粉(批号:190801)约 1.0 g,由 2 名不同



A. 334 nm 毛蕊花糖苷对照品溶液色谱峰; B. 334 nm 供试品溶液色谱峰; C. 334 nm 不含熟地黄药材的阴性对照溶液色谱峰; D. 230 nm 芍药苷对照品溶液色谱峰; E. 230 nm 供试品溶液色谱峰; F. 230 nm 不含白芍药材的阴性对照溶液色谱峰; G. 397 nm 鲁斯可皂苷元对照品溶液色谱峰; H. 397 nm 供试品溶液色谱峰; I. 397 nm 不含麦冬药材的阴性对照溶液色谱峰

A. chromatographic peak of 334 nm marigold glucoside control; B. chromatographic peak of 334 nm test sample; C. chromatographic peak of 334 nm negative control without *Rehmanniae Radix Praeparata*; D. chromatographic peak of 230 nm paeoniflorin control; E. chromatographic peak of 230 nm test sample; F. chromatographic peak of 230 nm negative control without *Paenoniae Radix Alba*; G. chromatographic peak of 397 nm paeoniflorin control; H. chromatographic peak of 397 nm test sample; I. chromatographic peak of 397 nm negative control without *Ophiopogonis Radix*

图 1 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram

分析人员于不同日期按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积并计算含量。结果显示,芍药苷、毛蕊花糖苷

和鲁斯可皂苷元峰面积的 *RSD* 分别为 1.2%、2.0% 和 1.0% ($n=6$),表明本方法中间精密度良好,见表 1。

表 1 中间精密密度试验结果 ($n=12$)Tab 1 Intermediate precision test results ($n=12$)

编号	芍药苷			毛蕊花糖苷			鲁斯可皂苷元		
	含量/(mg/5 g)	平均值/(mg/5 g)	RSD/%	含量/(mg/5 g)	平均值/(mg/5 g)	RSD/%	含量/(mg/5 g)	平均值/(mg/5 g)	RSD/%
1	12.46	12.47	1.2	3.91	4.01	2.0	1.24	1.24	1.0
2	12.31			4.02			1.22		
3	12.54			3.94			1.24		
4	12.31			3.95			1.23		
5	12.47			4.06			1.25		
6	12.65			4.12			1.24		
7	12.42			3.98			1.23		
8	12.55			3.94			1.22		
9	12.35			3.99			1.26		
10	12.25			4.12			1.24		
11	12.64			4.15			1.22		
12	12.66			3.96			1.24		

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:190801)7份,分别于室温(25℃)下放置0、2、4、6、8、12和24h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元峰面积的RSD分别为0.91%、0.81%和0.76% ($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置24h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取样品内容物细粉(批号:190801)适量,按“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,记录峰面积并计算含量。结果显示,芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元含量的平均值分别为12.49、4.05和1.24 mg/5 g, RSD分别为0.89%、0.93%和0.86% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品内容物细粉(批号:190801)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的单一对照品溶液适量,按“2.2.4”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 芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元加样回收试验结果 ($n=6$)Tab 2 Results of sample recovery of paeoniflorin, mullein glucoside and ruscogenin ($n=6$)

待测样品	样品含量/mg	加入量/mg	实测量/mg	回收率/%	回收率平均值/%	RSD/%
芍药苷	2.605 7	2.743 2	5.277 8	97.4	99.6	1.35
	2.588 4	2.743 2	5.301 6	98.9		
	2.580 7	2.743 2	5.309 7	99.5		
	2.660 9	2.743 2	5.432 1	101.0		
	2.653 1	2.743 2	5.421 3	100.9		
	2.557 5	2.743 2	5.294 2	99.8		
毛蕊花糖苷	0.844 9	0.859 6	1.664 6	95.4	98.1	1.87
	0.839 3	0.859 6	1.704 2	100.6		
	0.836 8	0.859 6	1.683 2	98.5		
	0.862 8	0.859 6	1.695 4	96.9		
	0.860 3	0.859 6	1.713 6	99.3		
	0.829 3	0.859 6	1.674 2	98.3		
鲁斯可皂苷元	0.256 1	0.224 2	0.476 6	98.3	99.7	1.06
	0.258 5	0.224 2	0.480 1	98.8		
	0.256 2	0.224 2	0.483 2	101.2		
	0.253 9	0.224 2	0.479 2	100.5		
	0.256 5	0.224 2	0.480 1	99.7		
	0.253 3	0.224 2	0.476 5	99.6		

2.10 耐用性试验

分别通过色谱柱条件改变、流动相比比例变化、流动相流速变化和色谱柱温度变化时,测定同一供试品的含量,计算RSD,考察方法的耐用性。结果显示,色谱柱、流动相、流速和柱温等改变时,RSD分别为0.81%、1.23%、0.81%和0.81%,说明色谱条件适宜,含量测定准确,重现性和可信性较好。

2.11 样品含量测定

取3批样品适量,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,平行测定3次,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/5 g)Tab 3 Determination of sample content ($n=3$, mg/5 g)

批号	毛蕊花糖苷含量	芍药苷含量	鲁斯可皂苷元
190801	12.36	4.03	1.24
190802	12.68	4.11	1.25
190803	12.54	4.03	1.24

3 讨论

白芍、熟地黄和麦冬的有效成分分别为芍药苷、毛蕊花糖苷和鲁斯可皂苷元,因此,在《中华人民共和国药典》中,要测定白芍、熟地黄和麦冬的含量,常通过测定其有效成分芍药苷、

(下转第1226页)