

HPLC 法测定参芪消渴颗粒中尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷

郭海霞, 杨丽霞

秦皇岛市第一医院, 河北 秦皇岛 066000

摘要: 目的 建立参芪消渴颗粒中尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷同时测定的方法。方法 采用高效液相色谱法, 使用依利特 Hypersil ODS 2 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 测定波长: 0~14 min 在 224 nm 波长下尿囊, 14~20 min 在 208 nm 波长下检测 24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B, 20~26 min 在 210 nm 波长下检测茯苓酸, 26~36 min 在 260 nm 波长下检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 体积流量: 0.9 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。结果 5 个成分的线性范围分别为 9.43~188.60 μg/mL ($r=0.999\ 4$), 3.75~75.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 4.06~81.20 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 4.82~96.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 3.79~75.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$)。平均回收率分别为 97.99%、99.34%、98.20%、96.57%、98.98%, RSD 值分别为 0.62%、1.14%、1.28%、0.79%、0.93%。结论 所建方法简便、可靠、准确度高, 可有效地控制参芪消渴颗粒的质量。

关键词: 参芪消渴颗粒; 尿囊素; 24-乙酰泽泻醇 A; 23-乙酰泽泻醇 B; 茯苓酸; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)06-0993-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.06.007

Determination of allantoin, 24-acetate alisol A, 23-acetate alisol B, pachymic acid, and calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside in Shenqi Xiaoke Granules by HPLC

GUO Hai-xia, YANG Li-xia

The First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China

Abstract: **Objective** To develop a method for simultaneous determination of allantoin, 24-acetate alisol A, 23-acetate alisol B, pachymic acid, and calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside in Shenqi Xiaoke Granules. **Method** An HPLC method was adopted for the analysis on Hypersil ODS 2 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitril - 0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 224 nm in 0 — 14 min (determination of allantoin), 208 nm in 14 — 20 min (determination of 24-acetate alisol A and 23-acetate alisol B), 210 nm in 20 — 26 min (determination of pachymic acid), and 260 nm in 26 — 36 min (determination of calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside). The flow rate was 0.9 mL/min, temperature of column was set at 30 ℃, and volume of injection was 10 μL. **Results** The linear range of allantoin, 24-acetate alisol A, 23-acetate alisol B, pachymic acid, and calycosin 7-*O*-β-*D*-glucopyranoside were 9.43 — 188.60 μg/mL ($r=0.999\ 4$), 3.75 — 75.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 4.06 — 81.20 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 4.82 — 96.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$), and 3.79 — 75.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$), respectively. The average recoveries were 97.99%, 99.34%, 98.20%, 96.57%, and 98.98% with RSD 0.62%, 1.14%, 1.28%, 0.79%, and 0.93%, respectively. **Conclusion** The method is simple, reliable, and accurate, and can effectively control the quality of Shenqi Xiaoke Granules.

Key words: Shenqi Xiaoke Granules; allantoin; 24-acetate alisol A; 23-acetate alisol B; pachymic acid; calycosin 7-*O*-β-*D*-lucopyranoside; HPLC

参芪消渴颗粒具有益气养阴的功效, 用于消渴症的口渴、多饮、多尿, 精神不振, 头昏等病症的治疗, 是由山药、泽泻、茯苓、黄芪等 13 味中药加

工而成的复方制剂, 收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第 17 册。参芪消渴颗粒标准仅规定了制法、性状、个别药味的薄层色谱鉴别和浸出物测

收稿日期: 2017-02-07

作者简介: 郭海霞 (1977—), 女, 满族, 河北邢台人, 本科, 从事医院药学相关研究工作。Tel: 18630309853 E-mail: 12084207@qq.com

定,未对任何成分进行定量测定^[1]。黄芪、山药、泽泻和茯苓为方中的主要药物,毛蕊异黄酮葡萄糖苷为黄芪的主要成分,尿囊素为山药的主要成分,24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 B 为泽泻的特征成分,茯苓酸为茯苓的主要成分^[2]。为确保临床用药的安全和该制剂的质量,本实验建立了一种较为简便、可靠、准确度高的 HPLC 法,对参芪消渴颗粒中 5 种成分尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行了同时测定,为提高该制剂的质量标准提供数据支持。

1 仪器与试药

Agilent 1290 液相色谱仪、Chem Station 色谱数据工作站(美国 Agilent 公司);岛津 AUD 220D 电子天平(精度 0.01 mg,日本岛津公司);CG-300 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

参芪消渴颗粒购自石家庄东方药业股份有限公司,规格 12 g/袋,批号分别为 20151106、20151202、20160316;尿囊素(批号 111501-200202,质量分数 100.0%)、23-乙酰泽泻醇 B(批号 111846-201504,质量分数 99.0%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201505,质量分数 97.1%)对照品购自中国食品药品检定研究院;24-乙酰泽泻醇 A(批号 18674-16-3,质量分数 98.0%)对照品购自宝鸡市辰光生物科技有限公司,茯苓酸(批号 29070-92-6,质量分数 98.0%)对照品购自上海纯优生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,磷酸、甲醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 取对照品尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品各适量,精密称定,加甲醇分别制成尿囊素 0.943 mg/mL、24-乙酰泽泻醇 A 0.375 mg/mL、23-乙酰泽泻醇 B 0.406 mg/mL、茯苓酸 0.482 mg/mL 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.379

mg/mL 单一成分的对照品储备液。分别取各对照品储备液适量,加甲醇制成含尿囊素 94.3 μg/mL、24-乙酰泽泻醇 A 7.5 μg/mL、23-乙酰泽泻醇 B 20.3 μg/mL、茯苓酸 24.1 μg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 37.9 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取参芪消渴颗粒适量,研成细粉,取约 3.0 g,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,采用 CG-300 型超声波清洗仪超声提取 30 min,放冷,加甲醇溶液补足减失的质量,振摇均匀,滤过,即得。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 依据《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第 17 册参芪消渴颗粒质量标准项下规定的处方工艺,制备缺山药、泽泻、茯苓和黄芪的参芪消渴颗粒阴性样品,再按照上述方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

依利特 Hypersil ODS 2 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱^[3-6](0~14 min, 52.0% A; 14~20 min, 52.0% A→70.0% A; 20~26 min, 70.0% A; 26~31 min, 70.0% A→76.0% A; 31~36 min, 76.0% A→52.0% A);测定波长:0~14 min 在 224 nm 波长下尿囊^[7], 14~20 min 在 208 nm 波长下检测 24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B^[8-9], 20~26 min 在 210 nm 波长下检测茯苓酸^[10], 26~36 min 在 260 nm 波长下检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷^[11];体积流量:0.9 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.3 线性关系考察

取尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷各对照品储备液,分别精密吸取 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,置于 6 个 10 mL 量瓶中,使用甲醇稀释制成 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液,依法进样测定,记录峰面积,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 线性方程、相关系数及线性范围

Table 1 Linear relationship, correlation coefficient and linearity

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
尿囊素	$Y=1.6852 \times 10^6 X+237.4$	0.999 4	9.43~188.60
24-乙酰泽泻醇 A	$Y=7.5433 \times 10^5 X+182.2$	0.999 7	3.75~75.00
23-乙酰泽泻醇 B	$Y=9.8716 \times 10^5 X-380.6$	0.999 9	4.06~81.20
茯苓酸	$Y=1.3019 \times 10^6 X-317.7$	0.999 5	4.82~96.40
毛蕊异黄酮葡萄糖	$Y=1.2593 \times 10^6 X+299.4$	0.999 8	3.79~75.80

2.4 系统适用性试验

取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,按上述色谱条件进样检测,结果表明阴性样品无干扰,色谱图见图 1。

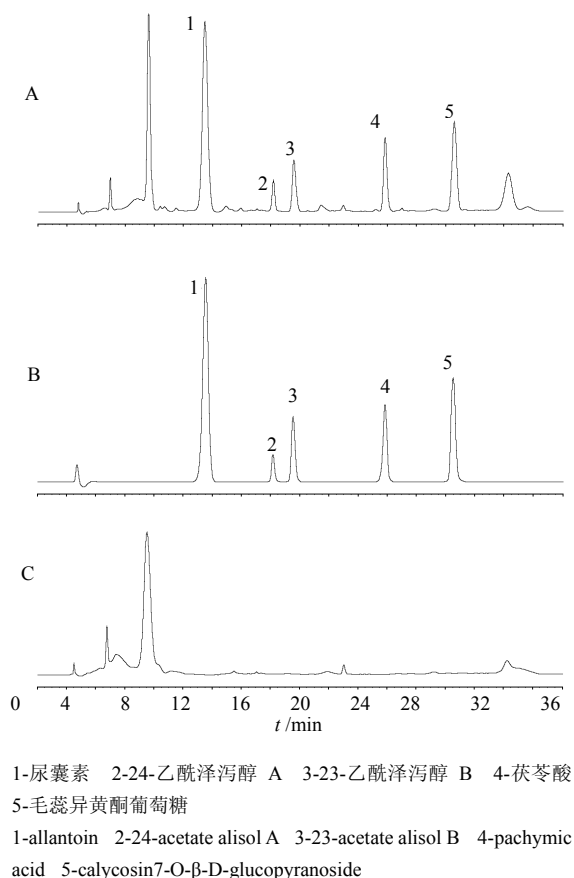


图 1 参芪消渴颗粒 (A)、对照品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of Shenqi Xiaoke Granules (A), reference substances (B), and negative sample (C)

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积值,结果尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽

泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 值分别为 0.97%、1.14%、0.64%、1.07%、1.11%。

2.6 稳定性试验

取批号 20151106 参芪消渴颗粒样品,制备供试品溶液,室温下分别在 0、3、6、9、12、18、24 h 进样测定,记录尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的峰面积值,计算得这 5 种成分峰面积的 RSD 值分别为 0.88%、1.20%、0.48%、1.06%、1.03%。表明在室温下,供试品溶液中所测 5 种成分在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取批号 20151106 参芪消渴颗粒样品 6 份,制备供试品溶液,进样测定,结果尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数的 RSD 值分别为 1.00%、0.59%、1.07%、1.24%、0.93%。

2.8 回收率试验

取批号 20151106 的参芪消渴颗粒适量,研成细粉,取 6 份,每份约 1.5 g,精密称定,精密加入质量浓度分别为尿囊素 0.427 mg/mL、24-乙酰泽泻醇 A 0.207 mg/mL、23-乙酰泽泻醇 B 0.268 mg/mL、茯苓酸 0.311 mg/mL 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.198 mg/mL 的单一成分对照品溶液 5、1、2、2、4 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率,结果尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均回收率分别为 97.99%、99.34%、98.20%、96.57%、98.98%,RSD 值分别为 0.62%、1.14%、1.28%、0.79%、0.93%。

2.9 样品测定

取参芪消渴颗粒,制备供试品溶液,进样测定,每批测定 3 份,采用外标法计算尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质量分数,结果见表 2。

表 2 芪消渴颗粒中尿囊素、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定结果

Table 2 Determination of allantoin, 24-acetate alisol A, 23-acetate alisol B, pachymic acid, and calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside in Shenqi Xiaoke Granules

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	尿囊素	24-乙酰泽泻醇 A	23-乙酰泽泻醇 B	茯苓酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
20151106	1.434	0.137	0.359	0.412	0.536
20151202	1.706	0.140	0.413	0.378	0.411
20160316	1.218	0.144	0.307	0.461	0.607

3 讨论

3.1 供试品处理方法的选择与优化

供试品处理方法主要考察了提取方式、提取溶剂和提取的时间。(1)提取方式的考察:分别对供试品溶液超声波超声提取、加热回流提取、索氏提取相同时间,以所测各成分的提取率为指标,优选最佳的提取方式,结果表明:在相同的提取时间条件下,超声波超声提取与索氏提取所测各成分提取效果相当,均高于加热回流提取结果,考虑到操作的便捷性和可控性,优选超声提取作为供试品溶液制备的提取方式。(2)提取溶剂的考察:分别对样品采用甲醇、50%甲醇、乙醇进行超声提取相同时间,以所测各成分的提取率为指标,优选最佳的提取方式,结果在相同的超声提取时间条件下,甲醇作为提取溶剂时,所测各成分的提取率最高,故选取甲醇作为供试品溶液制备的提取溶剂。(3)提取时间的考察:分别采用甲醇对供试品超声提取15、30、45 min,以尿囊素、24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的提取率为指标,结果甲醇超声提取30 min和超声提取45 min,所测各成分提取率相当,但明显高于甲醇超声提取15 min的结果,故选取提取30 min作为供试品溶液制备的提取时间。上述对比试验表明:参芪消渴颗粒供试品溶液制备的最佳提取方案为甲醇超声提取30 min。

3.2 流动相的确定

在流动相的确定上,首先考察了乙腈-水流动相体系^[3-4,6],发现分离效果不理想,存在漂移现象,在此基础上作者考察了乙腈-磷酸溶液系统,同时通过对比试验摸索磷酸溶液的浓度(0.05%磷酸溶液^[5,10]、0.1%磷酸溶液^[8]、0.2%磷酸溶液),以所测各成分尿囊素、24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的分离效果、峰形以及基线平稳情况为指标,最终选取乙腈-0.1%磷酸

溶液进行梯度洗脱为流动相体系。

本实验建立了HPLC波长切换法同时测定参芪消渴颗粒中5种成分尿囊素、24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、茯苓酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷,通过系统适用性试验、线性关系考察、精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验等较全面的验证,实验结果表明,所建立方法和实验结果可为参芪消渴颗粒的质量标准研究提供参考。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第十七册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:136.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2015:229,302.
- [3] 文庆,聂平,丁野,等. HILIC-HPLC法测定山药中尿囊素的含量[J]. 中南药学,2014,12(2):169-171.
- [4] 陈建忠,潘馨,黄若旺. HPLC法同时测定泽泻中2种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(5):721-723.
- [5] 沈玉萍,杨欢,陈斌,等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中4种三萜酸的含量[J]. 中国药学杂志,2011,46(5):388-390.
- [6] 王晓辉,刘涛,李清,等. 高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分[J]. 色谱,2006,24(5):486-488.
- [7] 乔宇,廖李,汪兰,等. 不同山药品种尿囊素含量的测定[J]. 湖北农业科学,2014,53(22):5528-5530.
- [8] 吴秋云,陈艳红,谢友良. 不同产地泽泻有效成分的含量测定[J]. 临床医学工程,2010,17(10):60-61.
- [9] 文红梅,彭国平,池玉梅,等. 泽泻药材的质量标准研究I——泽泻中2种泽泻醇的HPLC测定法[J]. 药物分析杂志,1998,18(6):375-377.
- [10] 刘校妃,李健康,唐怡,等. 茯苓中去氢土莫酸和茯苓酸含量的高效液相色谱波长切换法同时测定[J]. 时珍国医国药,2016,27(3):516-518.
- [11] 宋成英,封加福. HPLC同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):115-117.