

HPLC 法同时测定舒肝丸中 4 种成分

孙慧珠, 王晓蕾, 徐 乐, 刘永利*
(河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定舒肝丸(川楝子、延胡索、白芍等)中 4 种成分的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.05% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 230 nm。**结果** 芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷分别在 0.040 44~1.011、0.045 20~1.130、0.047 08~1.177、0.047 24~1.181 μg 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率分别为 100.5%、98.6%、98.4%、101.3%, RSD 分别为 1.5%、0.9%、1.2%、1.1%。7 家厂家 3 个剂型样品中各成分含有量有明显差异。**结论** 舒肝丸质量参差不齐, 应引起关注。

关键词: 舒肝丸; 芍药苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)09-1850-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.018

Simultaneous determination of four constituents in Shugan Pills by HPLC

SUN Hui-zhu, WANG Xiao-lei, XU Le, LIU Yong-li*
(Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Shugan Pills (*Toosendan Fructus*, *Corydalis Rhizoma*, *Paeoniae Radix Alba*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.05% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 230 nm. **RESULTS** Paeoniflorin, naringin, hesperidin and neohesperidin showed good linear relationships within the ranges of 0.040 44 – 1.011, 0.045 20 – 1.130, 0.047 08 – 1.177 and 0.047 24 – 1.181 μg ($r=0.999\ 9$), whose average recoveries were 100.5%, 98.6%, 98.4% and 101.3% with the RSDs of 1.5%, 0.9%, 1.2% and 1.1%, respectively. The contents of various constituents in the samples with three dosage forms from seven manufacturers showed obvious differences.

CONCLUSION We should pay attention to the uneven quality of Shugan Pills.

KEY WORDS: Shugan Pills; paeoniflorin; naringin; hesperidin; neohesperidin; HPLC

舒肝丸由川楝子、醋延胡索、白芍(酒炒)、片姜黄、木香、沉香、豆蔻仁、砂仁、姜厚朴、陈皮、枳壳(炒)、茯苓、朱砂 13 味药组成, 各药味粉碎后加入不同辅料制成大蜜丸、小蜜丸、水蜜丸或水丸, 临床上主要用于舒肝和胃、理气止痛等。目前, 其质量标准^[1]设立了白芍中芍药苷含有量的 HPLC 法测定, 文献[2-3]也均报道了白芍或延胡索中单一成分含有量的测定, 但对处方中

其他药味成分含有量无测定报道。为了更好地控制舒肝丸内在质量, 保证其临床用药的安全有效, 在前期报道的基础上^[4-5], 本实验建立 HPLC 法同时测定其中芍药苷、橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷的含有量, 可为其质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪; KQ-400KDE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);

收稿日期: 2016-12-06

作者简介: 孙慧珠(1985—), 女, 硕士生, 从事中药质量标准研究。Tel: (0311) 85212004-8020, E-mail: sunhuizhu@163.com

* 通信作者: 刘永利(1973—), 男, 硕士, 主任药师, 从事中药质量控制方法研究。Tel: (0311) 89892091, E-mail: liuyongli2008@126.com.

AE240 电子天平(上海梅特勒仪器有限公司)。

1.2 试药 芍药苷(批号 110736-201035, 含有量 96.4%)、柚皮苷(批号 110722-201111)、橙皮苷(批号 110721-201014, 含有量 95.3%)、新橙皮苷(批号 111857-201102, 含有量 99.6%) 对照品购自中国食品药品检定研究院。舒肝丸共 10 批, 购自药品经营公司与药店, 其中大蜜丸来自 4 家生产企业(批号分别为 15015052、15031021、1505118、395034), 水蜜丸来自 3 家生产企业(批号分别为 3035559、15035195、20140801、20150501), 小蜜丸来自 1 家生产企业(批号分别为 150201、150401)。甲醇、乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司); 其他试剂均为分析纯; 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品 0.010 11、0.011 30、0.011 77、0.011 81 g, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 各精密量取 5 mL, 置于同一 50 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取重量差异项下本品, 剪碎, 精密称取约 0.8 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 加热回流 90 min, 取出, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方比例及工艺制备缺白芍、枳壳、陈皮的阴性样品, 按“2.1.2”项下方法制备相应阴性溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验 Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(B), 梯度洗脱(0~40 min, 15%→25% A); 柱温 35℃; 检测波长 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 5 μL。理论塔板数按芍药苷峰计, 大于 8 000, 各峰与相邻峰的分离度均大于 1.5。

2.3 专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液在“2.2”项色谱条件下进样分析, 发现样品色谱在与对照品色谱相同的保留时间处有色谱峰, 阴性无干扰, 待测成分与其他成分分离度良好, 具体见图 1。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 2 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液 II, 精密量取 5、10 μL, 以及对照

品溶液 5、10、25 μL 注入液相色谱仪, 在“2.2”项色谱条件下测定。以对照品进样量为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y) 进行线性回归, 得芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷回归方程分别为 $Y = 1.224 \times 10^6 X + 1\,727.45$ 、 $Y = 2.127 \times 10^6 X + 5\,288.04$ 、 $Y = 1.897 \times 10^6 X + 4\,370.25$ 、 $Y = 2.115 \times 10^6 X + 5\,287.15$, 相关系数均为 0.999 9, 分别在 0.040 44~1.011、0.045 20~1.130、0.047 08~1.177、0.047 24~1.181 μg 范围内线性关系良好。

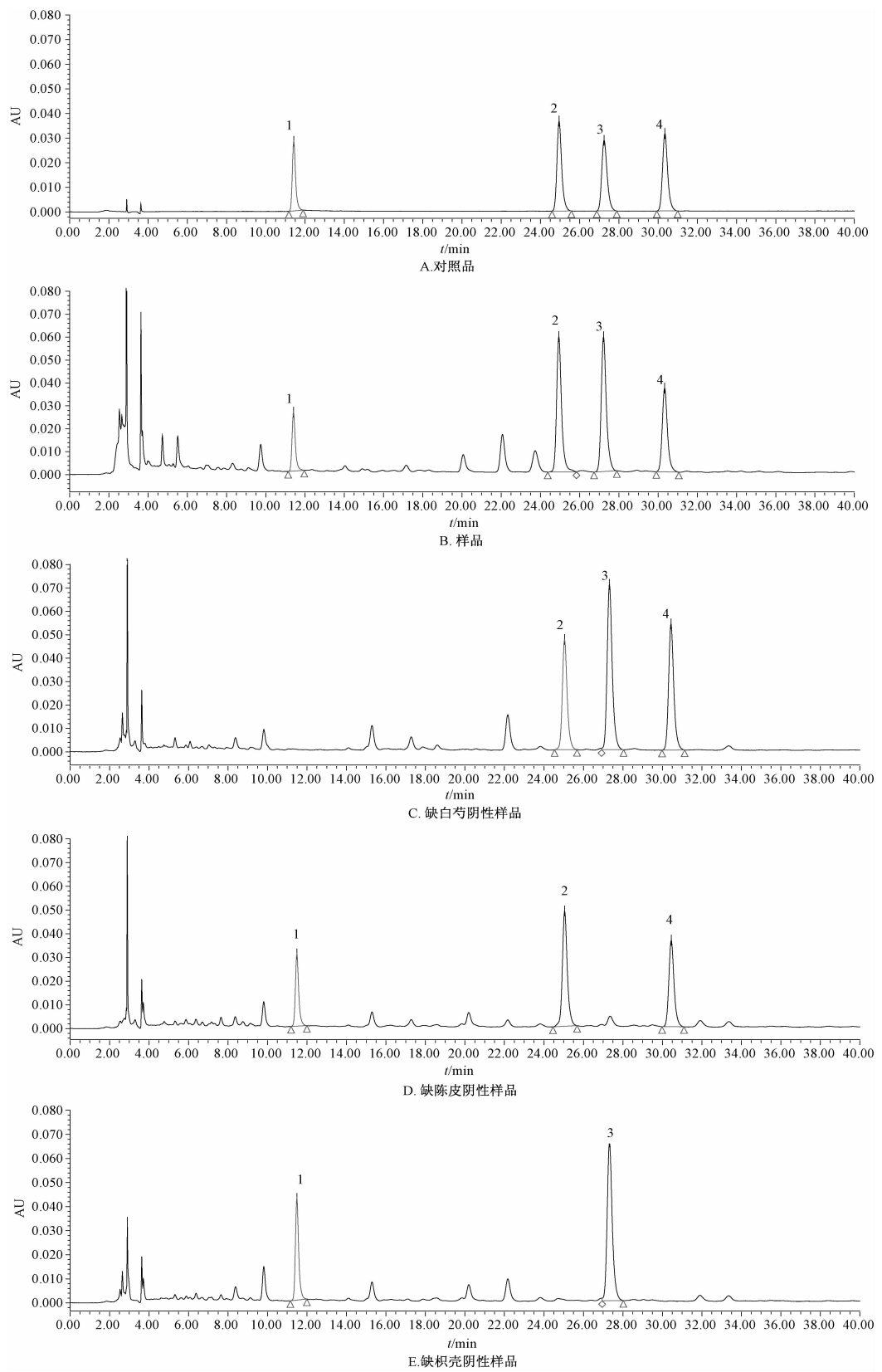
2.5 精密度试验 取同一份对照品溶液, 连续进样 5 次, 测得芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积 RSD 分别为 0.9%、1.2%、1.1%、1.3%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一大蜜丸(批号 15015052) 约 0.64、0.8、0.96 g, 各 3 份, 按“2.1.2”项下方法制备 9 份供试品溶液, 测得芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含有量 RSD 分别为 1.4%、1.6%、1.7%、1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 15015052), 在 0、2、7、13、20 h 进样测定, 测得芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积 RSD 分别为 1.1%、1.3%、0.9%、1.0%, 表明溶液在室温下 20 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取“2.6”项下含有量已知的样品(批号 15015052) 0.4 g, 共 9 份, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入对照品溶液(低, 芍药苷 0.011 70 mg/mL, 柚皮苷 0.018 08 mg/mL, 橙皮苷 0.017 95 mg/mL, 新橙皮苷 0.018 82 mg/mL; 中, 芍药苷 0.015 59 mg/mL, 柚皮苷 0.022 6 mg/mL, 橙皮苷 0.022 43 mg/mL, 新橙皮苷 0.023 53 mg/mL; 高, 芍药苷 0.019 49 mg/mL, 柚皮苷 0.027 12 mg/mL, 橙皮苷 0.026 92 mg/mL, 新橙皮苷 0.028 23 mg/mL) 各 25 mL, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下分析, 结果见表 1~4。

2.9 耐用性试验 取同一批样品(批号 15015052), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 选择 Thermo Acclaim C₁₈、Shim-pack Inertsil ODS-3、Boston Green ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 进行测定, 结果见表 5, 表明色谱柱耐用性良好。



1. 芍药苷 2. 柚皮苷 3. 橙皮苷 4. 新橙皮苷
1. paeoniflorin 2. naringin 3. hesperidin 4. neohesperidin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表 1 芍药苷加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 1 Results of recovery tests for paeoniflorin (n=9)

取样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回	RSD/
g	mg	mg	mg	%	收率/%	%
0.400 8	0.358 5	0.292 4	0.642 4	97.09		
0.401 1	0.358 8	0.292 4	0.653 9	100.92		
0.401 2	0.358 9	0.292 4	0.653 3	100.68		
0.401 0	0.358 7	0.389 8	0.752 2	100.95		
0.402 0	0.359 6	0.389 8	0.750 1	100.18	100.5	1.5
0.401 4	0.359 0	0.389 8	0.753 1	101.10		
0.401 5	0.359 2	0.487 3	0.847 8	100.27		
0.402 7	0.360 2	0.487 3	0.856 3	101.81		
0.400 4	0.358 2	0.487 3	0.854 2	101.79		

表 2 柚皮苷加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests for naringin (n=9)

取样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回	RSD/
g	mg	mg	mg	%	收率/%	%
0.400 8	0.569 8	0.452 0	1.010 6	97.52		
0.401 1	0.570 2	0.452 0	1.018 9	99.27		
0.401 2	0.570 4	0.452 0	1.020 0	99.47		
0.401 0	0.570 1	0.565 0	1.124 2	98.07		
0.402 0	0.571 6	0.565 0	1.125 8	98.09	98.6	0.9
0.401 4	0.570 6	0.565 0	1.127 4	98.55		
0.401 5	0.570 8	0.678 0	1.236 7	98.22		
0.402 7	0.572 5	0.678 0	1.239 6	98.39		
0.400 4	0.569 3	0.678 0	1.247 5	100.03		

表 5 色谱柱耐用性试验结果

Tab. 5 Results of serviceability tests for columns

色谱柱	理论塔板数	芍药苷/(mg·g ⁻¹)	柚皮苷/(mg·g ⁻¹)	橙皮苷/(mg·g ⁻¹)	新橙皮苷/(mg·g ⁻¹)
Thermo Acclaim C ₁₈	24 438	1.243	1.967	1.508	1.074
Shim-pack Inertsil ODS-3	25 635	1.241	1.955	1.515	1.109
Boston Green ODS	20 527	1.202	1.889	1.440	1.063
平均值		1.229	1.937	1.488	1.082
RSD/%		1.9	2.2	2.8	2.3

2.10 样品含有量测定

取 10 批样品，按

色谱条件下测定，记录峰面积，外标法测定含有

“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项

量，结果见表 6。

表 6 各成分含有量测定结果 (n=2)

Tab. 6 Results of content determination of various constituents (n=2)

规格	编号	芍药苷/(mg·g ⁻¹)	柚皮苷/(mg·g ⁻¹)	橙皮苷/(mg·g ⁻¹)	新橙皮苷/(mg·g ⁻¹)
大蜜丸	15015052	1.205	1.937	1.386	1.074
	15031021	0.647	1.930	1.918	1.534
	1505118	1.284	1.403	1.405	1.379
	395034	0.651	1.766	1.637	0.991
水蜜丸	3035559	1.197	3.098	3.006	1.610
	15035195	1.782	2.438	2.372	1.871
	20140801	1.462	0.805	7.368	0.618
	20150501	1.423	0.899	6.602	0.385
小蜜丸	15020	0.981	1.993	1.718	1.233
	15040	1.179	1.489	1.452	1.047
	$\bar{x} \pm s$	1.181 ± 0.352	1.776 ± 0.684	2.886 ± 2.224	1.174 ± 0.452
	RSD/%	29.82	38.54	77.07	38.53

表 3 橙皮苷加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 3 Results of recovery tests for hesperidin (n=9)

取样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回	RSD/
g	mg	mg	mg	%	收率/%	%
0.400 8	0.620 0	0.448 7	1.065 3	99.24		
0.401 1	0.620 4	0.448 7	1.071 0	100.42		
0.401 2	0.620 6	0.448 7	1.062 6	98.51		
0.401 0	0.620 2	0.560 8	1.171 7	98.34		
0.402 0	0.621 8	0.560 8	1.167 5	97.31	98.4	1.2
0.401 4	0.620 8	0.560 8	1.170 4	98.00		
0.401 5	0.621 1	0.673 0	1.274 7	97.12		
0.402 7	0.622 9	0.673 0	1.275 0	96.89		
0.400 4	0.619 4	0.673 0	1.288 1	99.36		

表 4 新橙皮苷加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 4 Results of recovery tests for neohesperidin (n=9)

取样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收	RSD/
g	mg	mg	mg	%	率/%	%
0.400 8	0.536 2	0.470 5	1.002 9	99.19		
0.401 1	0.536 6	0.470 5	1.010 0	100.62		
0.401 2	0.536 8	0.470 5	1.019 9	102.68		
0.401 0	0.536 4	0.588 1	1.135 9	101.94		
0.402 0	0.537 8	0.588 1	1.133 8	101.34	101.3	1.1
0.401 4	0.537 0	0.588 1	1.132 7	101.29		
0.401 5	0.537 2	0.705 8	1.247 1	100.58		
0.402 7	0.538 7	0.705 8	1.254 8	101.46		
0.400 4	0.535 7	0.705 8	1.258 0	102.34		

3 讨论

3.1 流动相选择 参照 2015 年版《中国药典》中白芍、枳壳、陈皮含有量测定的洗脱条件，本实验考察了乙腈-0.1% 磷酸为流动相，发现冲出的杂质峰较多，基线噪音较高。再进一步考察了乙腈-水和乙腈-0.05% 磷酸，发现前者中柚皮苷和橙皮苷色谱峰有拖尾现象，而后者中基线噪音得到改善，各色谱峰峰形良好。

舒肝丸药味多，成分复杂，性质相近，查阅文献 [6-12]，最终确定梯度洗脱条件，可在 40 min 内完成对芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 4 种成分含有量的同时测定，大大提高了检验效率。

3.2 检测波长选择 本实验采用二极管阵列检测器，在 200 ~ 400 nm 范围内进行光谱扫描，发现芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷最大吸收波长分别为 230、282、282、282 nm，芍药苷在 282 nm 处几乎无吸收，而柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷在 230 nm 处均有较强的肩峰。提取 230 nm 波长色谱图，发现各成分响应均较高，与杂质峰分离良好，故选择检测波长为 230 nm。

3.3 提取方法选择 本实验考察了 50% 甲醇、70% 甲醇、乙醇、稀乙醇，发现以 50% 甲醇、稀乙醇为溶剂提取时提取率较低，以甲醇、70% 甲醇为溶剂提取时提取率接近，但后者所得样品较混浊，难于过滤，故选择甲醇作为提取溶剂。然后，考察了超声提取法与加热回流法，发现后者提取率高于前者，故选择加热回流法提取样品。再考察了提取 30、60、90、120 min 对测定结果的影响，发现提取 90、120 min 提取率接近，而且均较高，为了保证安全，选择提取 90 min。

3.4 含有量分析 表 6 显示，不同剂型、厂家样品中各成分含有量存在差异，由于处方中各药味均

以原粉入药，故推测可能是投料用饮片质量参差不齐所致。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：1600.

[2] 孙大鹏. 高效液相色谱法测定舒肝丸中芍药苷含量[J]. 现代中药研究与实践，2006，20(2)：32-33.

[3] 朱晓军，陈 彬. 高效液相色谱法测定舒肝丸中延胡索乙素的含量[J]. 医药导报，2006，25(6)：570-572.

[4] 黄爱华，曹 骋，曾元儿，等. HPLC 法测定不同规格酸橙枳壳中新橙皮苷和柚皮苷的含量[J]. 药物分析杂志，2009，29(9)：1448-1450.

[5] 崔 璐，孙小玲，郝延军，等. HPLC 法同时测定前列癉必通片中 6 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志，2015，35(11)：1914-1918.

[6] 李 想，卢静华. HPLC 法同时测定加味香连丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷和黄芩苷[J]. 中成药，2015，37(9)：1955-1958.

[7] 王跃生，饶 毅，魏惠珍，等. HPLC-“内标”多控法测定四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷[J]. 中草药，2008，39(9)：1316-1319.

[8] 徐海燕，金 艺，张红霞，等. HPLC 同时测定胃力片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中成药，2010，32(8)：1355-1357.

[9] 张春辉，邱学伟，单秀明，等. HPLC-ELSD 法同时测定跌打片中 8 种成分[J]. 中成药，2016，36(4)：801-806.

[10] 李 松，浦香兰. HPLC-DAD 法测定接骨丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B 和丹参酮 II A[J]. 现代药物与临床，2015，30(2)：153-156.

[11] 施 法，白旭东，董 斌，等. HPLC 法同时分析测定明目上清片中 10 个化学成分[J]. 药物分析杂志，2014，34(1)：91-95.

[12] 方娆莹，李 苑，钟红兰，等. 高效液相色谱法测定三七伤药胶囊中 4 种成分研究[J]. 亚太传统医药，2014，10(14)：22-23.