

HPLC 波长切换法同时测定白益镇惊丸中的京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷 - I、去氢茯苓酸和茯苓酸

郑晓萍¹, 杨晓娟¹, 杨自荣¹, 李小玲¹, 吕仁¹, 班小军², 黄秀霞^{3*} (1. 甘肃甘州区人民医院, 张掖 734000; 2. 甘肃张掖市食品药品检验检测中心, 张掖 734000; 3. 金昌市人民医院, 金昌 737100)

摘要 **目的:** 建立 HPLC 波长切换法同时测定白益镇惊丸中的京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷 - I、去氢茯苓酸和茯苓酸 5 种活性成分的含量。**方法:** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 乙腈 (A) - 0.5% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 进行梯度洗脱 (0 ~ 11 min, 15.0%A; 11 ~ 22 min, 15.0%A → 28.0%A; 22 ~ 31 min, 28.0%A → 45.0%A; 31 ~ 42 min, 45.0%A → 70.0%A; 42 ~ 50 min, 70.0%A → 15.0%A), 流速 0.9 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 波长切换法检测 (0 ~ 22 min, 238 nm, 京尼平龙胆二糖苷和栀子苷; 22 ~ 31 min, 440 nm, 西红花苷 - I; 31 ~ 50 min, 210 nm, 去氢茯苓酸和茯苓酸), 进样量为 10 μL。**结果:** 京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷 - I、去氢茯苓酸和茯苓酸 5 种成分的质量浓度分别在 5.930 ~ 118.6、11.41 ~ 228.2、4.950 ~ 99.00、4.100 ~ 82.00、4.780 ~ 95.60 μg · mL⁻¹ 呈现良好的线性关系, 相关系数分别为 0.9999、0.9998、0.9994、0.9999、0.9997; 平均加样回收率及相应的 RSD 分别为 99.42% (0.96%)、98.54% (1.08%)、99.06% (1.28%)、97.76% (0.84%)、98.19% (1.59%); 供试品溶液在室温下 12 h 内稳定。**结论:** 本文建立的 HPLC 波长切换法同时测定白益镇惊丸中的 5 种成分, 该方法简便、稳定、可靠, 可作为白益镇惊丸全面可靠的质量控制方法。

关键词: 白益镇惊丸; 京尼平龙胆二糖苷; 栀子苷; 西红花苷 - I; 去氢茯苓酸; 茯苓酸; 波长切换法; 多组分测定

中图分类号: R917; R284 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0275-06
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.008

Simultaneous Determination of Genipin-1-β-D-gentiobioside, Geniposide, Crocin-I, Dehydropachymic Acid and Pachymic Acid in Baiyi Zhenjing Wan by HPLC Wavelength Switching Method

Zheng Xiaoping¹, Yang Xiaojuan¹, Yang Zirong¹, Li Xiaoling¹, Lv Ren¹, Ban Xiaojun², Huang Xiuxia^{3*} (1. Ganzhou District People's Hospital, Zhangye 734000, China; 2. Zhangye Food and Drug Inspection Testing Center, Zhangye 734000, China; 3. People's Hospital of Jinchang City, Jinchang 737100, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC wavelength switching method for simultaneous determination of the contents of genipin-1-β-D-gentiobioside, geniposide, crocin-I, dehydropachymi cacid and pachymic acid in Baiyi Zhenjing Wan. **Methods:** Octadecyl silane bonded silica was used as filler, the mobile phase was acetonitrile (A)-0.5% phosphoric acid solution (B) with gradient elution (0-11 min, 15.0%A; 11-22 min, 15.0%A-28.0%A; 22-31 min, 28.0%A-45.0%A; 31-42 min, 45.0%A-70.0%A; 42-50 min, 70.0%A-15.0%A) at a flow rate of 0.9 mL · min⁻¹, the column temperature was set at 30 °C, and the detection wavelengths were 238 nm (genipin-

1- β -D-gentiobioside and geniposide), 440 nm (crocin-I), 210 nm (dehydropachymic acid and pachymic acid). Sample injection volume was 10 μ L. **Results:** Genipin-1- β -D-gentiobioside, geniposide, crocin-I, dehydropachymic acid and pachymic acid had good linear relationships between the concentration and peak area in the ranges of 5.930-118.6 μ g \cdot mL⁻¹($r=0.9999$), 11.41-228.2 μ g \cdot mL⁻¹($r=0.9998$), 4.950-99.00 μ g \cdot mL⁻¹($r=0.9994$), 4.100-82.00 μ g \cdot mL⁻¹($r=0.9999$), and 4.780-95.60 μ g \cdot mL⁻¹($r=0.9997$), respectively. The average recoveries and the corresponding RSDs were 99.42%(0.96%), 98.54%(1.08%), 99.06%(1.28%), 97.76%(0.84%), 98.19%(1.59%), respectively. The sample solution was stable within 12 h at room temperature. **Conclusion:** An HPLC wavelength switching method has been successfully established for simultaneous determination of 5 components in Baiyi Zhenjing Wan. The established method is simple, accurate and reliable. The method is helpful for the quality control of Baiyi Zhenjing Wan.

Keywords: Baiyi Zhenjing Wan; genipin-1- β -D-gentiobioside; geniposide; crocin-I; dehydropachymic acid; pachymic acid; wavelength switching method; multicomponent determination

白益镇惊丸是由茯苓、栀子(炒)、人参、天竺黄等17味中药材加工而成的复方制剂,该制剂为棕褐色的水蜜丸,具有养血安神的功效,可用于小儿热病体虚、痰鸣气促、抽搐时作、将成慢惊等症状的治疗。

该制剂收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第七册,标准仅规定了性状、显微鉴别及理化鉴别,无其他检测项目^[1]。高效液相色谱法同时测定该制剂中多组分的含量未见文献报道。为有效控制白益镇惊丸的质量,确保临床用药的安全有效,本研究建立了一种较为简单、可靠、准确度高的HPLC波长切换法,对白益镇惊丸中的京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸的含量同时进行测定。样品处理方法简便,测定结果准确,适用于白益镇惊丸质量标准的提高。

1 仪器与试剂

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括SIL-20A双元泵、SPD-M20A可变波长检测器、LC solution色谱工作站);XS205DU电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

白益镇惊丸(每丸重1g,批号:1501305、1501312、1601301,杭州胡庆余堂药业有限公司);京尼平龙胆二糖苷对照品(批号:29307-60-6,含量98.0%,上海融禾医药科技发展有限公司);去氢茯苓酸对照品(批号:77012-31-8,含量98.0%,上海科顺生物科技有限公司)、茯苓酸对照品(批号:29070-92-6,含量98.0%,上

海科顺生物科技有限公司);栀子苷对照品(批号:110749-201316,含量97.5%,使用前无需处理,中国食品药品检定研究院)、西红花苷-I对照品(批号:111588-201303,含量92.6%,使用前无需处理,冷冻避光保存,中国食品药品检定研究院)。乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Phenomene C18(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱;流动相A:乙腈,流动相B:0.5%磷酸溶液,梯度洗脱^[2-5](0~11 min, 15.0%A; 11~22 min, 15.0%A \rightarrow 28.0%A; 22~31 min, 28.0%A \rightarrow 45.0%A; 31~42 min, 45.0%A \rightarrow 70.0%A; 42~50 min, 70.0%A \rightarrow 15.0%A);0~22 min时在238 nm^[6-8]波长下检测京尼平龙胆二糖苷和栀子苷,22~31 min在440 nm^[9-10]波长下检测西红花苷-I,31~50 min在210 nm^[11-12]波长下检测去氢茯苓酸和茯苓酸;流速:0.9 mL \cdot min⁻¹;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量为10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

分别精密称取对照品京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸适量,用70%甲醇分别制成含京尼平龙胆二糖苷0.593 mg \cdot mL⁻¹、栀子苷1.141 mg \cdot mL⁻¹、西红花苷-I 0.495 mg \cdot mL⁻¹、去氢茯苓酸0.410 mg \cdot mL⁻¹和茯苓酸0.478 mg \cdot mL⁻¹的对照品储备溶液。

再分别依次量取上述各对照品储备液适量,

置同一50 mL量瓶中，用70%甲醇制成含京尼平龙胆二糖苷 $0.0593 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、栀子苷 $0.1141 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、西红花苷-I $0.0198 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、去氢茯苓酸 $0.0123 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、茯苓酸 $0.0239 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

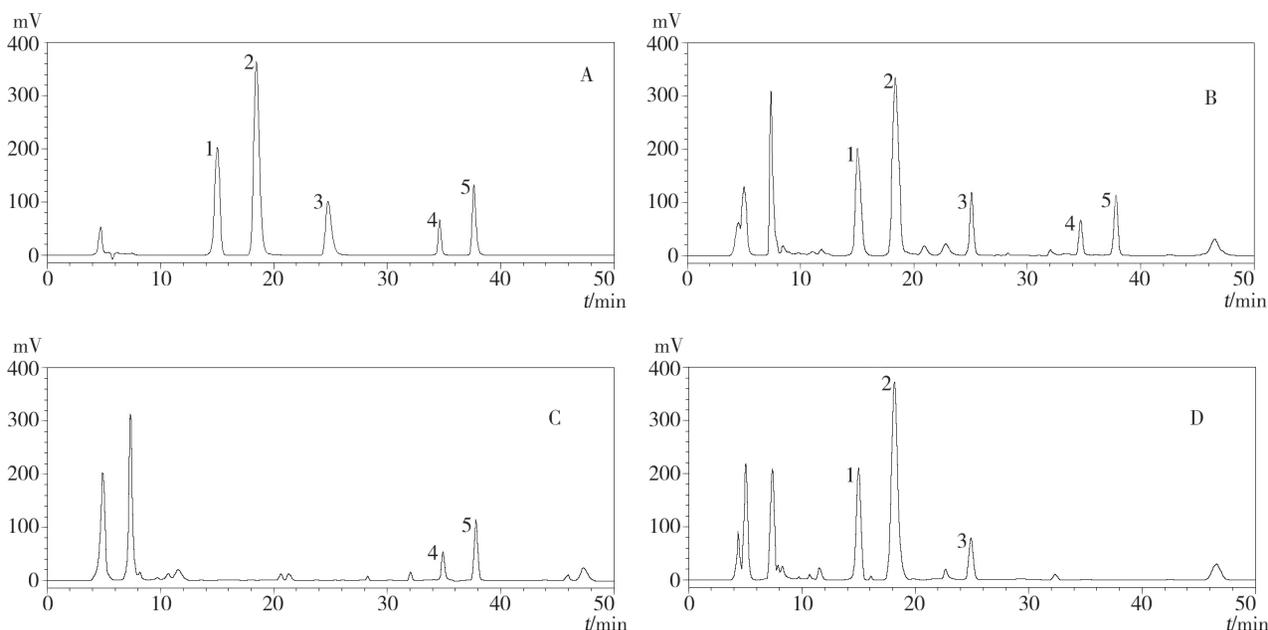
取白益镇惊丸适量，研细，取约5.0 g，精密称定，置50 mL量瓶中，加入70%甲醇约45 mL，超声（功率：100 W，频率：40 kHz）提取30 min，放冷，用70%甲醇加至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性对照溶液

按白益镇惊丸的处方，分别制备不含栀子的阴性样品、不含茯苓的阴性样品，按“2.2.2”节方法制成相应的阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取上述2种阴性对照溶液、混合对照品溶液和供试品溶液，在上述色谱条件下，进行测定。试验结果显示，各阴性对照溶液的色谱图中，在京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸5种成分对应的位置上均无干扰，理论板数均大于2000。色谱图详见图1。



A. 对照品；B. 供试品；C. 栀子阴性；D. 茯苓阴性；

1. 京尼平龙胆二糖苷；2. 栀子苷；3. 西红花苷-I；4. 去氢茯苓酸；5. 茯苓酸。

图1 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”节对照品储备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL，各置10 mL量瓶中，用70%甲醇稀释至刻度，摇匀，制成一系列浓度的混合对照品溶液。按照上述色谱条件，进行测定，采用质量浓度 X 作为横坐标，测得的峰面积 Y 作为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程，如表1所示。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”节混合对照品溶液，按“2.1”节色谱条件测定，连续进样6次，测定峰面积，结果京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸峰面积的RSD分别为0.92%、

0.75%、1.02%、1.11%、1.08%，表明仪器具有良好的精密度。

2.6 稳定性试验

取批号1501305的白益镇惊丸的供试品溶液，于配制后在室温下放置0、2、4、6、8、12 h，按上述色谱条件，分别进样，每次进样量为10 μL ，测定京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸的峰面积值，并求得京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸峰面积的RSD分别为0.88%、0.64%、1.01%、1.16%和1.07%。结果显示白益镇惊丸供试品溶液在室温下12 h内很稳定。

表1 线性关系试验结果

所测组分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
京尼平龙胆二糖苷	$y=1.5341 \times 10^6x + 338.6$	5.930 ~ 118.6	0.9999
栀子苷	$y=1.9274 \times 10^6x - 405.2$	11.41 ~ 228.2	0.9998
西红花苷 - I	$y=1.2072 \times 10^6x + 225.1$	4.950 ~ 99.00	0.9994
去氢茯苓酸	$y=8.5979 \times 10^5x + 448.7$	4.100 ~ 82.00	0.9999
茯苓酸	$y=1.1356 \times 10^6x - 172.8$	4.780 ~ 95.60	0.9997

2.7 重复性试验

取批号1501305的白益镇惊丸样品6份,按“2.2.2”节方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,进行测定,分别计算京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸的含量,并计算所测5种组分京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸含量的RSD依次为1.39%、1.24%、1.66%、1.84%和1.71%。结果表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的白益镇惊丸(批号:1501305)适量,研细,称定6份,每份约2.5 g,精密称定,置50 mL量瓶中,精密加入混合对照品溶液25 mL、70%甲醇20 mL,超声(功率:100 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷,用70%甲醇加至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,作为加样回收样品试液。按照上述色谱条件,进行测定,计算5种组分的回收率及RSD,结果见表2~6。

表2 京尼平龙胆二糖苷回收率试验结果

称取量 / g	样品中含量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均值 / %	RSD / %
2.5006	1.5104	1.4825	3.0005	100.51	99.42	0.96
2.5013	1.5108	1.4825	2.9967	100.23		
2.4990	1.5094	1.4825	2.9602	97.86		
2.5001	1.5101	1.4825	2.9771	98.95		
2.4998	1.5099	1.4825	2.9828	99.35		
2.5016	1.5110	1.4825	2.9880	99.63		

表3 栀子苷回收率试验结果

称取量 / g	样品中含量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均值 / %	RSD / %
2.5006	2.8457	2.8525	5.6835	99.48	98.54	1.08
2.5013	2.8465	2.8525	5.6201	97.23		
2.4990	2.8439	2.8525	5.6344	97.83		
2.5001	2.8451	2.8525	5.7009	100.12		
2.4998	2.8448	2.8525	5.6500	98.34		
2.5016	2.8468	2.8525	5.6497	98.26		

表4 西红花苷-I回收率试验结果

称取量 / g	样品中含量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均值 / %	RSD/ %
2.5006	0.5301	0.4950	1.0208	99.13		
2.5013	0.5303	0.4950	1.0293	100.81		
2.4990	0.5298	0.4950	1.0216	99.35		
2.5001	0.5300	0.4950	1.0098	96.93	99.06	1.28
2.4998	0.5300	0.4950	1.0185	98.69		
2.5016	0.5303	0.4950	1.0226	99.45		

表5 去氢茯苓酸回收率试验结果

称取量 / g	样品中含量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均值 / %	RSD/ %
2.5006	0.2976	0.3075	0.5985	97.85		
2.5013	0.2977	0.3075	0.6008	98.57		
2.4990	0.2974	0.3075	0.6014	98.86		
2.5001	0.2975	0.3075	0.5953	96.85	97.76	0.84
2.4998	0.2975	0.3075	0.5971	97.43		
2.5016	0.2977	0.3075	0.5960	97.01		

表6 茯苓酸回收率试验结果

称取量 / g	样品中含量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均值 / %	RSD/ %
2.5006	0.6176	0.5975	1.1981	97.15		
2.5013	0.6178	0.5975	1.2079	98.76		
2.4990	0.6173	0.5975	1.2184	100.60		
2.5001	0.6175	0.5975	1.1936	96.42	98.19	1.59
2.4998	0.6175	0.5975	1.1979	97.14		
2.5016	0.6179	0.5975	1.2099	99.08		

2.9 样品的测定

取3批白益镇惊丸,按“2.2.2”节方法制备供

试品溶液,在上述色谱条件下,进样测定,结果见表7。

表7 含量测定结果

mg · 丸⁻¹

批号	京尼平龙胆二糖苷	栀子苷	西红花苷-I	去氢茯苓酸	茯苓酸
1501305	0.604	1.138	0.212	0.119	0.247
1501312	0.601	1.136	0.215	0.116	0.249
1601301	0.598	1.140	0.208	0.122	0.243

3 讨论

3.1 测定波长和流动相的选择

采用京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸各对照品溶液进行全波长紫外扫描,最终确定京尼平龙胆二糖苷和栀子苷的检测波长为238 nm,西红花苷-I的检测波长为440 nm,去氢茯苓酸和茯苓酸的检测波长为210 nm。

在流动相的选择上,考察了乙腈-0.5%磷酸溶液、乙腈-0.05%磷酸溶液^[13]和乙腈-0.1%磷酸溶液的流动相体系,由于该制剂含多种中药材,且各药材又含多种组分,为了使各组分之间更好地得到分离,综合考虑,最终选择乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相体系。

3.2 流速的考察

分别对流动相流速(0.8、0.9、1.0 mL · min⁻¹)进行考察,以不同流速对各成分峰分离度及峰形的影响为指标,最终选择0.9 mL · min⁻¹作为定量测定流动相的流速。

3.3 提取方式及提取溶剂的选择

曾考察不同提取方式(加热回流、超声处理、索氏提取)及提取溶剂(甲醇^[14]、70%甲醇^[15]、40%甲醇)对样品所测各组分提取效果的影响,综合考虑所测各成分的提取率和操作的便捷性,最终确定提取方法为70%甲醇超声提取30 min。

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: 中药成方制剂第七册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 48-48.
- [2] 中国药典: 一部[S]. 2015: 248-249, 240-241.
- [3] 付小梅, 刘婧, 裴建国, 等. HPLC法同时测定栀子类药材中10个主要有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 615-621.
- [4] 车爽, 李清, 霍艳双, 等. 波长转换 RP-HPLC 法同时

测定茯苓不同部位中5种三萜酸含量[J]. 药学学报, 2010, 45(4): 494-497.

- [5] 于能江, 郭继芬, 张永祥, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测-质谱法鉴定茯苓中的三萜成分[J]. 分析化学研究报告, 2004, 32(7): 866-870.
- [6] 曾彦雯, 梁华正, 贺玉兰, 等. 京尼平和栀子苷含量的高效液相色谱法同时测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 21(10): 2344-2345.
- [7] 钱璐, 石燕红, 王瑞, 等. UPLC法测定栀子中的4种成分[J]. 中成药, 2016, 38(3): 708-711.
- [8] 刘芳, 唐灿, 郑海芳, 等. 栀子主要有效成分与微量元素间的量变规律研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(5): 893-899.
- [9] 廖华军, 檀伟静, 房英娟, 等. 多波长高效液相色谱法测定不同产地栀子中3种有效成分的含量[J]. 福建中医药大学学报, 2012, 22(6): 36-38.
- [10] 徐燕, 曹进, 罗国安, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分[J]. 药学学报, 2003, 38(7): 543-546.
- [11] 高晓霞, 于治国, 赵云丽, 等. HPLC法同时测定茯苓中去氢茯苓酸和茯苓酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(4): 295-298.
- [12] 李朝骏, 顾志华. HPLC-DAD法同时测定消化虫散中6种成分[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1040-1043.
- [13] 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.
- [14] 李小玲, 班小军, 何胜利. HPLC法同时测定三白草肝炎糖浆中去氢土莫酸、茯苓酸、三白草酮和里卡灵A的含量[J]. 中国药事, 2016, 30(3): 285-290.
- [15] 师永花, 师永清. 双波长RP-HPLC法同时测定黄连上清丸中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(7): 747-750.

(收稿日期 2016年8月17日 编辑 王雅雯)