岛津 SHIMADZU
Excellence in Science

四季青配方颗粒特征图谱分析及含量测定

LC-316

摘要： 本文使用岛津高效液相色谱仪建立了四季青配方颗粒的特征图谱及含量测定的分析方法。四季青配方颗粒特征图谱分析结果表明，色谱方法系统适用性和专属性良好。含量测定结果表明，目标化合物长梗冬青苷在 7.810~500.0 μg/mL 范围内，相关系数为 0.9993；供试品溶液重复性保留时间 RSD% 为 0.06%，峰面积 RSD% 为 1.45%；加样回收率为 103.6%。该方法准确可靠，可用于实际样品的检测。

关键词： 四季青配方颗粒　特征图谱　含量测定　质量控制

四季青为冬青科植物，其具有清热解毒，消肿祛瘀的功效。可用于肺热咳嗽，咽喉肿痛，痢疾，胁痛，热淋；外治烧烫伤，皮肤溃疡。中药配方颗粒是中药汤剂的现代化产品，这种颗粒剂的使用应该在中医药理论指导下，按照中医开具的临床处方调配后，依照调配剂量冲服给患者使用，且需要保证中药配方颗粒冲泡后的临床疗效应当和相应饮片煎煮中药汤剂保持一致。将其制备成中药配方颗粒相比传统中药饮片，可以免去临用前煎煮的麻烦，大大节省时间精力，中药配方颗粒这一新兴中药服药方式的质量标准进行全国规范的统一，对中药市场的长远发展具有深远意义。

现行中国药典、国家药品标准及省级药品标准中，均无对四季青配方颗粒的质量控制指标制定标准，对市场掺伪现象等难以控制。因此，有必要对其活性成分、作用机理及质控方法进行更深入的研究。本实验使用岛津高效液相色谱仪建立了四季青配方颗粒中的长梗冬青苷含量测定方法，对四季青配方颗粒特征图谱进行系统研究。该项目已报广东省级标准。

实验部分

1.1 仪器

四季青配方颗粒特征图谱分析使用岛津 LC-2030C 3D 高效液相色谱仪。

四季青配方颗粒含量测定使用岛津 Nexera LC-40 系列高效液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器	SCL-40	自动进样器	SIL-40C XR
柱温箱	CTO-40C	输液泵	LC-40D XR ×2
脱气机	DGU-405	色谱工作站	LabSolutions Ver. 5.109
检测器	ELSD-LT III		

样品前处理

2.1 特征图谱分析样品前处理

参照物溶液制备：取四季青对照药材粉末约 1 g，置具塞锥形瓶中，加水 20 mL，加热回流 30 分钟，滤过，滤液蒸干，放冷，残渣精密加入甲醇 20 mL，密塞，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 分钟，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，作为对照药材参照物溶液。取原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、咖啡酸、山奈酚 -3-O- 芸香糖苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 各含 200 μg 的溶液，作为对照品参照物溶液。

供试品溶液的制备：取本品约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 20 mL，密塞，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 分钟，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2 含量测定样品前处理

对照品溶液的制备：取长梗冬青苷对照品适量，精密称定，加 80% 甲醇制成每 1 mL 含 0.3 mg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备：取本品约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇溶液 50 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用 80% 甲醇溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

结果与讨论

3.1 龙眼肉配方颗粒特征图谱分析结果

3.1.1 系统适用性

取 2.1 中的供试品溶液和对照品溶液，按表 1~2 分析条件进行分析，验证四季青饮片标准汤剂的色谱条件和系统适应性是否适用于四季青配方颗粒，并考察四季青配方颗粒阴性样品是否会造成干扰，色谱图如图 1~2 所示，结果见表 3。结果表明，空白对照对特征图谱无干扰，色谱方法系统适用性和专属性良好，可以作为四季青配方颗粒特征图谱的检测方法（本方法规定理论板数按 5- 羟甲基糠醛峰计算应不低于 2500）。

表 1　四季青配方颗粒特征图谱分析条件

仪器	LC-2030C 3D
色谱柱	WondaSil C18 250 mm×4.6 mm I.D.，5.0 μm； 岛津（上海）实验器材有限公司；P/N：5020-39003
流动相	A相-0.1%磷酸水溶液；B相-乙腈
流速	1.0 mL/min
柱温	20℃
检测波长	PDA（300 nm）
进样体积	10 μL
洗脱方式	梯度洗脱，B相起始浓度为10%，时间程序见表2

表 2. 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
10.00	泵	B Conc	10
25.00	泵	B Conc	18
40.00	泵	B Conc	18
42.00	泵	B Conc	20
50.00	泵	B Conc	20
52.00	泵	B Conc	90
58.00	泵	B Conc	90
60.00	泵	B Conc	10
70.00	控制器	Stop	

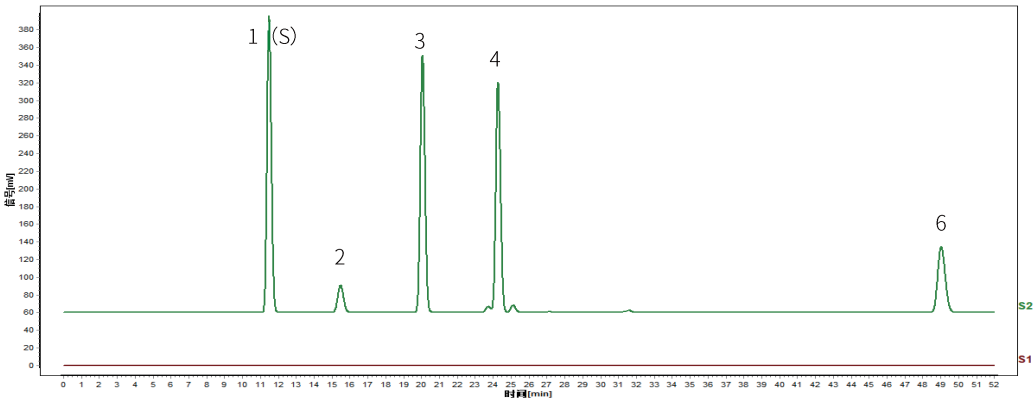

图 1　专属性试验色谱图（中药色谱指纹图谱相似度评价系统）
（S1：空白对照图谱；S2：对照品溶液图谱）
（峰 1（S）： 原儿茶酸；峰 2：紫丁香苷；峰 3：绿原酸；峰 4：咖啡酸；峰 6：山奈酚 -3-O- 芸香糖苷）

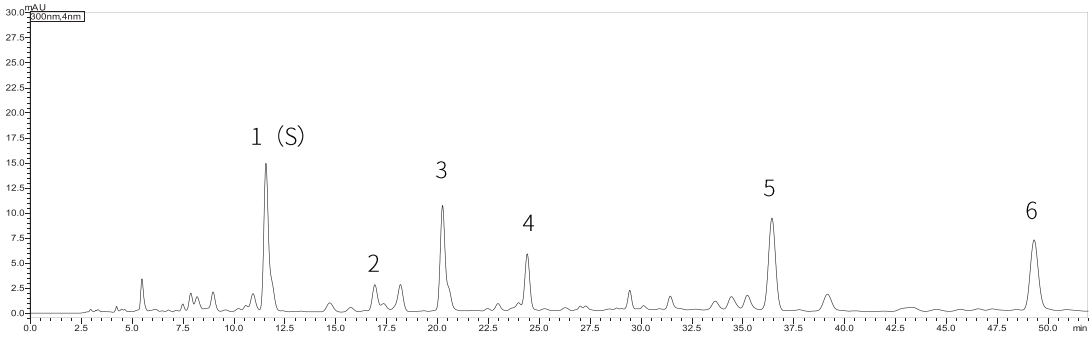

图 2　供试品溶液色谱图
（峰 1（S）： 原儿茶酸；峰 2：紫丁香苷；峰 3：绿原酸；峰 4：咖啡酸；峰 6：山奈酚 -3-O- 芸香糖苷）

表 3　系统适用性参数

类型	特征峰 No.	保留时间 (min)	峰面积	高度	拖尾因子	分离度	理论板数
对照品溶液	1（S）	11.492	5737956	335776	1.117	8.154	9926
	2	15.487	704270	31006	1.049	7.457	10311
	3	20.066	5323024	290961	1.084	8.298	26434
	4	24.285	4912957	260890	1.090	0.987	36462
	6	49.046	2183704	74607	1.114	26.121	62181
供试品溶液	1（S）	11.580	262908	14649	1.519	1.419	11481
	2	16.928	47041	2588	--	2.403	19267
	3	20.249	202520	10387	1.508	4.295	31527
	4	24.415	95935	5598	--	0.797	45972
	5	36.445	222011	9161	1.020	1.944	50569
	6	49.181	1066526	35405	1.157	0.924	62985

3.1.2 精密度

取 2.1 制得的供试品溶液，按 3.1.1 中的分析条件，重复进样 6 次，测定 5 个特征峰的保留时间和峰面积并进行分析，结果见表 4。结果表明，各特征峰与参照物 S 峰 (1 号峰) 的相对保留时间 RSD% 为 0.02~0.15%，各特征峰与参照物 S 峰 (1 号峰) 的相对峰面积的 RSD% 为 0.45~1.02%，仪器精密度良好。

表 4　精密度试验结果（n=6）

特征峰 No.	保留时间（min）	相对保留时间	相对保留时间 RSD%(n=6)	峰面积	相对峰面积	相对峰面积 RSD%(n=6)
1	11.531	/	/	2495789	/	/
2（S）	16.872	1.46	0.02	609311	0.24	0.45
3	20.106	1.74	0.15	1878665	0.75	0.95
4	24.334	2.11	0.03	968037	0.39	0.62
5	36.191	3.14	0.08	2144924	0.86	1.02
6	48.954	4.25	0.08	1990325	0.8	0.92

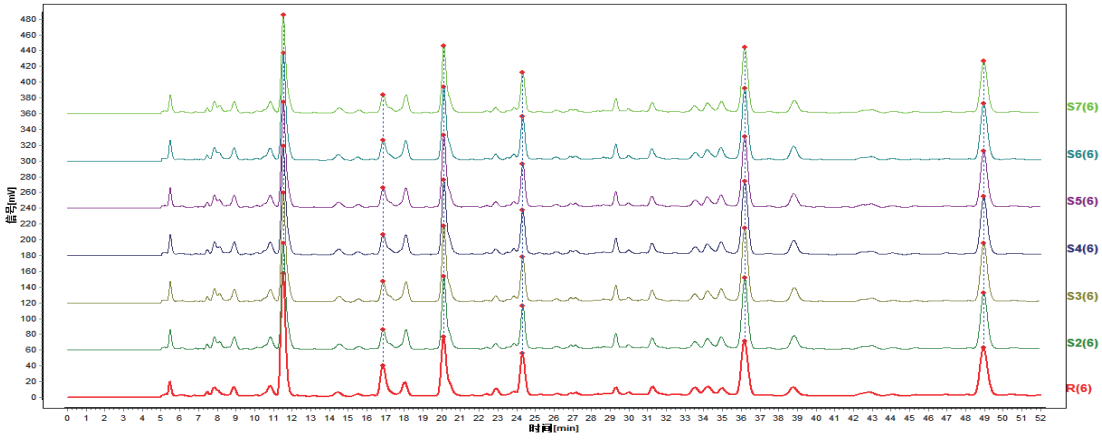

图 3　精密度试验色谱图（中药色谱指纹图谱相似度评价系统）
（R：四季青饮片标准汤剂对照图谱；S2~S7：四季青配方颗粒供试品溶液图谱）

3.1.3 样品测定

取 3 批四季青配方颗粒样品，按 2.1 分别制得供试品溶液，按 3.1.1 中的分析条件进行测定。结果表明，3 批四季青配方颗粒样品的各特征峰规定的相对保留时间均在规定的允差范围（±10%）以内。

表 5　3 批四季青配方颗粒样品相对保留时间结果

特征峰 No.	样品 1	样品 2	样品 3	相对保留时间允差范围（±10%）
1	/	/	/	/
2（S）	1.46	1.46	1.46	1.31-1.61
3	1.75	1.75	1.75	1.57-1.92
4	2.11	2.11	2.11	1.90-2.32
5	3.14	3.14	3.14	2.83-3.45
6	4.25	4.25	4.25	3.82-4.67

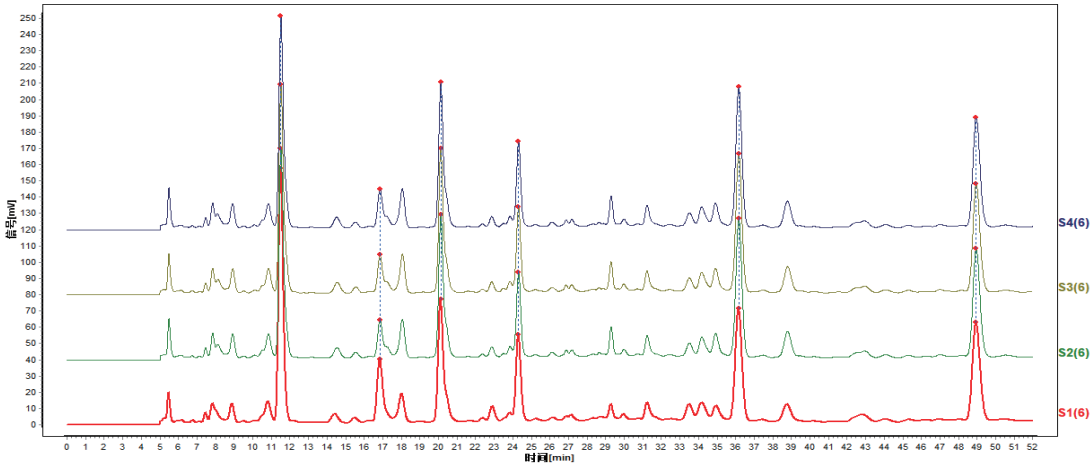

图 4　3 批四季青配方颗粒样品色谱图（中药色谱指纹图谱相似度评价系统）
（S1：四季青饮片标准汤剂对照特征图谱；S2-S4：3 批四季青配方颗粒特征图谱）

3.2 四季青配方颗含量测定

3.2.1 系统适用性

取 2.2 中的对照品溶液和供试品溶液，按表 6~7 分析条件进行分析，色谱图见图 5~6，系统适用性结果见表 8。结果表明，对照品溶液和供试品溶液色谱图基线平稳，供试品溶液中长梗冬青苷峰理论板数为 40093，对照品目标峰峰面积，峰形，分离度，拖尾因子，理论塔板数合适，且对照品溶液目标峰位置无干扰，可以作为四季青配方颗粒含量测定的分析条件（本方法规定：若验证结果基线平稳，理论板数达到要求，对照品色谱峰峰面积，峰形，分离度，拖尾因子合适且对照品色谱峰位置无干扰，则可确定该色谱条件并进行后续研究）。

表 6　龙眼肉配方颗粒含量测定分析条件

仪器	LC-40（Nexera XR）
色谱柱	ZORBAX Eclipase XDB-C18（250 mm×4.6 mm I.D.，5.0 μm）
流动相	A相-10%异丙醇水溶液；B相-10%异丙醇甲醇溶液
流速	1.0 mL/min
柱温	40℃
进样体积	10 μL
ELSD条件	Gain = 7, T = 40℃, Filter = 3 s, P = 343 kPa
洗脱方式	梯度洗脱，B相起始浓度为30%，时间程序见表2

表 7　梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
10.00	泵	B Conc	35
12.00	泵	B Conc	43
30.00	泵	B Conc	43
31.00	泵	B Conc	30
40.00	控制器	Stop	

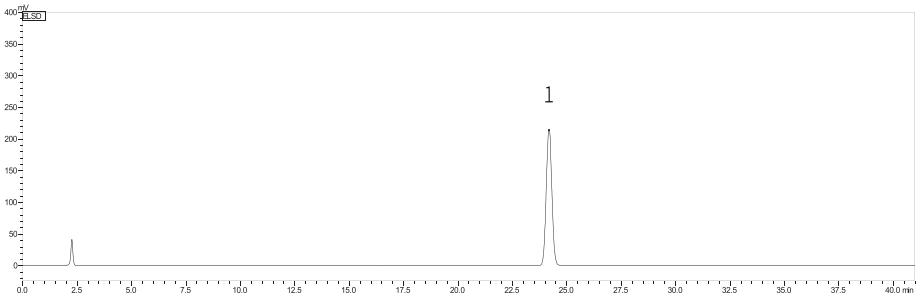

图 5　300 μg/mL 对照品溶液色谱图（峰 1：长梗冬青苷）

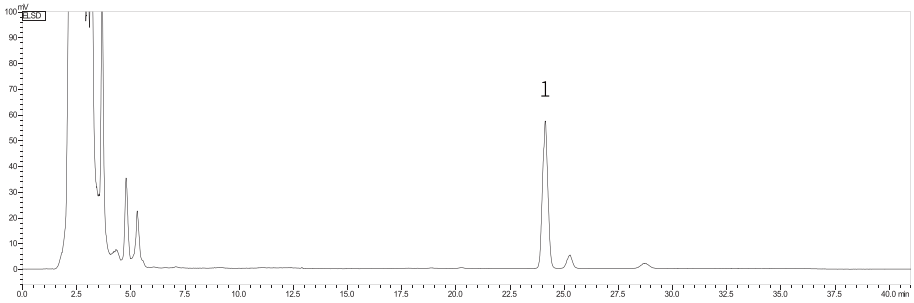

图 6　供试品溶液色谱图（峰 1：长梗冬青苷）

表 8　色谱峰系统适应性参数

化合物名称	保留时间	峰面积	分离度	拖尾因子	理论板数
长梗冬青苷（对照品）	24.211	3956314	67.46	1.056	47537
长梗冬青苷（供试品）	24.137	988733	8.153	1.037	40093

3.2.2 线性

按 2.2 中的对照品溶液制备方式，用 80% 甲醇分别制成浓度为 7.810~500.0 μg/mL 的标准工作溶液，按照 3.2.1 中的分析条件进行测定。以浓度指数为横坐标，峰面积指数为纵坐标，进行线性回归分析。结果表明，长梗冬青苷线性良好，线性相关系数 r=0.9993，具体结果见表 9。

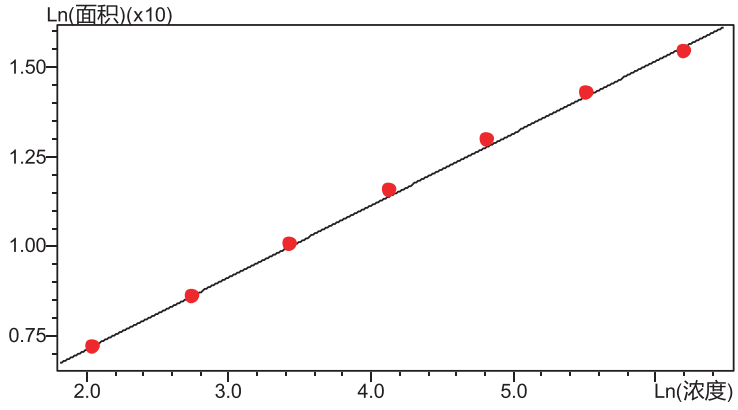

图 7　长梗冬青苷校准曲线

表 9　长梗冬青苷标准曲线结果

化合物名称	线性范围（μg/mL）	回归方程	相关系数（r）	准确度 (%)	检测限 LOD（μg/mL）	定量限 LOQ（μg/mL）
长梗冬青苷	7.810~500.0	$Y = X^{2.01302} \times EXP(3.09497)$	0.9993	91.7-105.9	1.634	5.445

3.2.3 精密度

取供试品溶液，按照 3.2.1 分析条件连续进样 6 次，考察仪器精密度。结果如表 10，长梗冬青苷保留时间 RSD% 为 0.06%，峰面积 RSD% 为 1.45%，仪器精密度良好。

表 10　精密度试验结果（n=6）

化合物名称	保留时间 (min)	峰面积 (mV)
长梗冬青苷	24.142	999934
	24.174	981212
	24.173	963074
	24.186	1001721
	24.170	981419
	24.142	986160
RSD%	0.06	1.45

3.2.4 样品测定

取 3 批四季青配方颗粒样品，按 2.2 制得供试品溶液，按 3.2.1 中的分析条件进行测定，含量测定结果见表 11。3 批四季青配方颗粒样品含量为 2.85~3.06%，RSD% 为 0.71~1.67%。

表 11　供试品溶液测试结果（n=2）

化合物名称	样品 1		样品 2		样品 3	
	含量（%）	RSD（%）	含量（%）	RSD（%）	含量（%）	RSD（%）
长梗冬青苷	2.916 2.986	1.67	2.828 2.868	1.00	3.074 3.043	0.71

3.2.5 加样回收率

取同一批号、同一浓度的 9 份样品，分别精密加入混合对照品溶液，配制成低、中、高浓度的加样回收率溶液，按 2.2 中供试品溶液的制备进行样品前处理，使用随行样品含量计算回收率，回收率测定结果见表 12。长梗冬青苷回收率为 103.6%，表明方法准确性良好。

表 12　回收率测定结果（n=3）

化合物名称	低浓度	中浓度	高浓度
长梗冬青苷	103.9	101.83	104.9

结论

本文使用岛津高效液相色谱仪建立了龙眼肉配方颗粒的特征图谱及其糖类含量测定的分析方法。龙眼肉配方颗粒特征图谱及含量测定结果表明，系统适应性和专属性良好，线性、精密度、回收率结果良好，该方法为制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作提供了参考。

岛津应用云

岛津企业管理（中国）有限公司 –分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center

Email: dr_jin@shimadzu.com.cn Tel: 86(21)34193983 http://www.shimadzu.com.cn