

对桑叶配方颗粒芦丁含量测定中色谱柱使用的建议

李文斌, 池艳艳, 程菲, 徐莹*
(天津迪科马实验设备有限公司, 天津 300499)

摘要 目的: 建议在桑叶配方颗粒芦丁含量测定项使用极性改性 C₁₈ 色谱柱。方法: 分别使用多款不同规格的十八烷基键合硅胶(C₁₈) 固定相色谱柱, 考察桑叶配方颗粒中芦丁的分离情况。结果: 使用极性改性 C₁₈ 色谱柱能有效分离芦丁及其共存成分。结论: 色谱柱是影响含量测定结果准确性的关键因素, 在实际检测过程中应充分考虑不同色谱柱之间的差异, 降低因色谱柱选择性差异导致检测结果不准确的风险。

关键词: 桑叶配方颗粒; 质量标准; 芦丁; 高效液相色谱; 色谱柱

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2022)05-0561-06

doi: 10.19778/j.chp.2022.05.020

Suggestion on the use of chromatographic column in the content determination of rutin in mulberry leaf formula granules

LI Wenbin, CHI Yanyan, CHENG Fei, XU Ying*
(Tianjin Dikma Experimental Equipment Co., Ltd. Tianjin 300499, China)

Abstract Objective: It is recommended to use a polar modified C₁₈ chromatographic column in the content determination of rutin in mulberry leaf formula granules. **Methods:** A variety of octadecyl-bonded silica gel (C₁₈) stationary phase columns with different specifications were used to investigate the separation of rutin in mulberry leaf formula granules. **Results:** Effective separation of rutin and its coexisting components using a polar-modified C₁₈ column is achieved. **Conclusion:** The chromatographic column is a key factor affecting the accuracy of content determination results. In the actual detection process, the differences between different chromatographic columns should be fully considered to reduce the risk of inaccurate detection results due to differences in column selectivity.

Key words: mulberry leaf formula granules; quality standard; rutin; HPLC; chromatographic column

高效液相色谱法高效、灵敏、专属性强、重现性好, 是中药质量检测中的主要技术手段^[1]。色谱柱是影响 HPLC 定性及定量测定结果的关键风险要素, 采用不同品牌、不同型号的色谱柱分析同一样品时, 色谱柱选择性的不同会使目标物质的保留时间、分离度、出峰顺序等表现出较大的差异^[2-6]。桑叶配方颗粒, 为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成。桑叶配

方颗粒国家药品标准 YBZ-PFKL-2021108^[7] 中以芦丁作为含量指标, 采用 HPLC 进行测定。本文就不同色谱柱选择性对结果的影响, 提出对色谱柱使用的建议。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 型 HPLC 仪(日本 Shimadzu 公司), 二极管阵列检测器; AUY120 型电子天平(日本

第一作者简介: 李文斌, 高级工程师; 研究方向: 色谱分离分析。Tel: 13820815004; E-mail: li_wenbin@dikma.com.cn

* 通讯作者简介: 徐莹, 工程师; 研究方向: 色谱分离分析。Tel: 18902003827; E-mail: luaralucky2012@126.com

Shimadzu 公司); KQ5200B 型超声波清洗器(巩义市子华仪器有限责任公司)。

甲醇、磷酸(色谱纯, Dikma 公司); 水为屈臣氏蒸馏水; 芦丁对照品(纯度 98.8% , 坛墨质检); 桑叶对照药材(北京谱析标准技术有限公司); 桑叶配方颗粒(某制药有限公司, 批号为 1070441、0031871)。

2 实验方法

参照中药配方颗粒药品标准桑叶配方颗粒 YBZ-PFKL-2021108 中的含量测定方法。

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取芦丁对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取桑叶配方颗粒适量, 研细, 取约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 桑叶对照药材溶液 取桑叶对照药材 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入水 50 mL, 加热回流 45 min, 滤过, 滤液置水浴蒸干, 残渣加 50% 甲醇 25 mL, 超声(功率 350 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱

温: 30 °C; 流动相 A: 甲醇; 流动相 B: 0.5% 磷酸水溶液; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 梯度洗脱程序: 0 ~ 16 min, 70% B → 38% B; 16 ~ 18 min, 38% B → 70% B; 18 ~ 30 min, 70% B; 进样量: 10 μL; 检测波长: 358 nm。系统适用性, 理论板数按芦丁峰计算应不低于 5 000。

3 结果与讨论

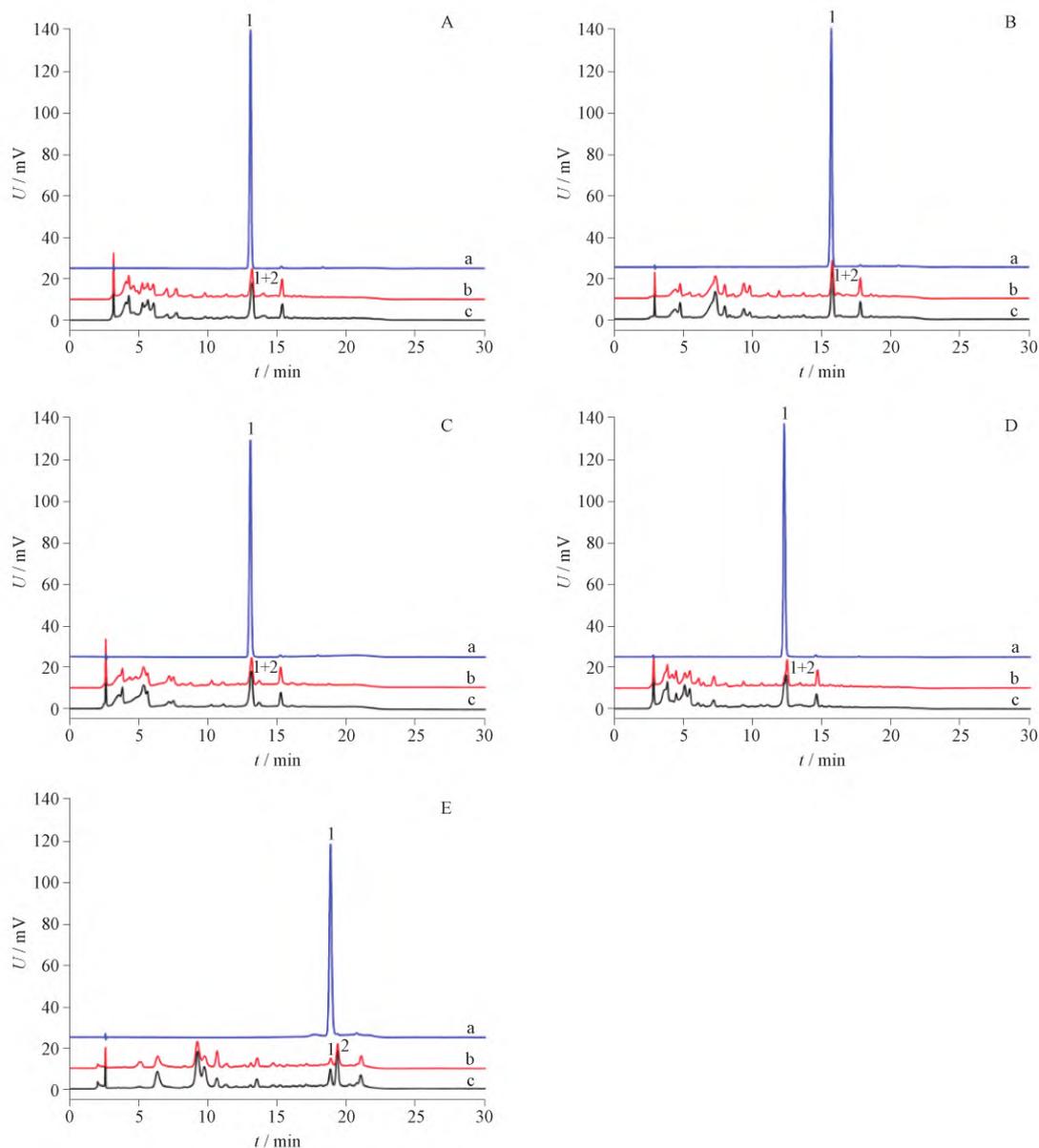
3.1 不同 C₁₈ 色谱柱分离情况

选用多款分离性能、保留能力、选择性有差异的液相色谱柱, 详细信息见表 1。其中 1 号为普通 C₁₈ 色谱柱, 保留能力居中; 2 号为高载样量色谱柱, 对普通化合物具有较强的保留能力; 3 号是最常用的反相色谱柱之一, 能使碱性化合物具有出色的峰形, 但其比表面积及碳载量不高, 保留能力较弱; 4 号有较高的化学稳定性及独特的硅胶制备工艺。以上 4 款为通用型、反相作用力为主的 B 型色谱柱。5 ~ 8 号柱为含有极性基团的 C₁₈ 固定相, 对极性相近化合物及立体结构化合物具有独特的选择性。根据 USP-PQRI 数据库, 可比较不同色谱柱的相似性参数 F, 当两支色谱柱 F ≤ 3 时, 通常认为对任何样品都可给出一个等效和可接受的分离结果, 而 3 号、4 号、6 号色谱柱与 5 号色谱柱相比, F 值分别为 27.11、14.83 和 13.9, 选择性显著不同, 其他色谱柱未被 USP-PQRI 数据库收录。1 ~ 5 号色谱柱色谱分离结果见图 1。

表 1 色谱柱信息

Tab. 1 Chromatographic columns information

序号 (No.)	品牌 (brand)	型号 (model)	规格 (specification)	键合相特点 (bonded phase characteristics)	碳载量 (carbon load) / %	比表面积 (surface area) / (m ² · g ⁻¹)	类型 (column category)
1	Dikma	Diamonsil Plus C ₁₈	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	二次封端 (double end-capping)	14	200	B
2	Dikma	Platisil ODS	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	高密度键合 (high dense bonding)	15	440	B
3	Agilent	ZORBAX SB-C ₁₈	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	二异丁基侧链基团 (diisobutyl side-chain radical)	10	180	B
4	Waters	Xbridge BEH C ₁₈	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	亚乙基桥杂化颗粒 (EthyleneBridgedHybrid)	17	183	B
5	Dikma	Spursil C ₁₈ -EP	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	含极性基团 (with polar group)	24	440	EP
6	Dikma	Spursil C ₁₈	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	含极性基团 (with polar group)	25	440	B
7	Dikma	Diamonsil PlusC ₁₈ -A	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	含极性基团 (with polar group)	15	200	B
8	Dikma	Diamonsil PlusC ₁₈ -B	4.6 mm × 250 mm, 5 μm	含极性基团 (with polar group)	16	200	EP



A. Diamonsil Plus C₁₈ B. Platisil ODS C. ZORBAX SB-C₁₈ D. Xbridge BEH C₁₈ E. Spursil C₁₈-EP
 a. 芦丁对照品 (rutin reference substance) b. 桑叶配方颗粒供试品 (mulberry leaf granules sample) 1070441 c. 桑叶配方颗粒供试品 (mulberry leaf granules sample) 0031871

1. 芦丁 (rutin) 2. 共有成分 (coexisting component)

图 1 不同 C₁₈ 色谱柱分离的色谱图

Fig. 1 Chromatograms separated by different C₁₈ chromatographic columns

通过以上 5 款不同 C₁₈ 色谱柱对芦丁对照品及桑叶配方颗粒供试品的分离情况对比,对照品保留时间略有差异,其中 Spursil C₁₈-EP 出峰最晚,原因是芦丁作为黄酮类化合物,由槲皮素、葡萄糖和鼠李糖 3 部分组成,含有 4 个酚羟基和 6 个糖苷羟基,其疏水参数计算参考值 (XLogP3-AA) 为-1.3,由于极性基团的存在,使其与色谱柱嵌入的极性基团存在氢键等极性作用力,致其保留能力增强,但峰形都比

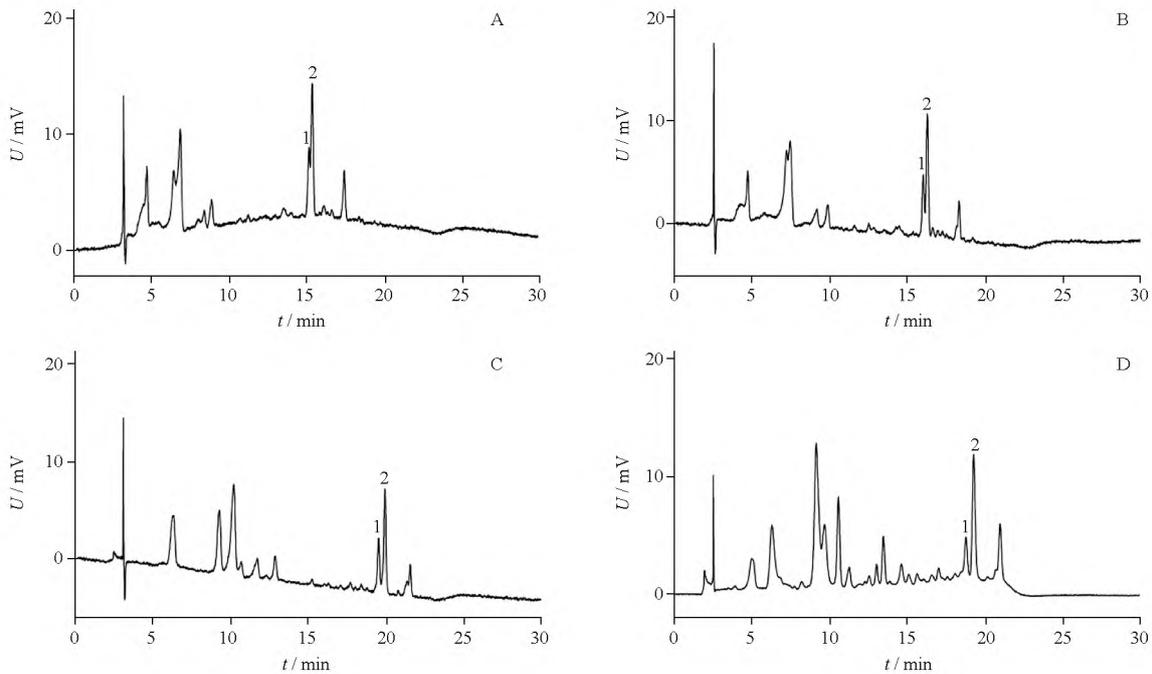
较尖锐、对称,拖尾因子均在 0.95 ~ 1.05 之间。在供试品谱图中 A 款通用型色谱柱芦丁峰拖尾因子较小,前延严重,根据二极管阵列检测器光谱对比及峰纯度计算,证明此峰中含有杂质存在。Spursil C₁₈-EP 能够将芦丁与共存成分实现较好分离 (分离度 ≥ 1.5) 且芦丁峰形对称 (见图 1, E)。其原因可能为供试品中含有与芦丁极性相近的化合物,在只有反相作用分离机制的固定相中无法分离,而 Spur-

sil C₁₈-EP 色谱柱由于填料表面嵌入了极性基团,除具有普通的反相作用力外,还可以对含有极性基团的极性相近化合物具有明显的选择性。以上 5 款色谱柱的理论板数均符合标准方法的系统适用性要求(理论板数按芦丁峰计算应不低于 5 000),由此可见,仅考虑理论板数有时并不能保证实验结果的准确性,还要充分考虑不同色谱柱之间的选择性差异带来的风险。

3.2 不同极性改性色谱柱对比

本文选用 4 款极性改性色谱柱,其中 Plus C₁₈-A 为极性基团封尾的低比表面积色谱柱,Plus C₁₈-B 为极性基团嵌入的低比表面积色谱柱,Spursil C₁₈ 为极

性基团封尾的高比表面积色谱柱,Spursil C₁₈-EP 为极性基团嵌入的高比表面积色谱柱,极性顺序 Plus C₁₈-A < Spursil C₁₈ < Plus C₁₈-B < Spursil C₁₈-EP。实验结果见图 2。4 款极性改性色谱柱均能将目标化合物芦丁与共有峰达到一定程度的分离,分离度分别为 0.60、0.93、1.42、1.51,随着色谱柱极性增强,化合物分离度增大,其中 Spursil C₁₈-EP 由于极性基团的嵌入以及较高的比表面积,分离度优于其他 3 款色谱柱。极性改性色谱柱与普通 C₁₈ 色谱柱的主要区别在于极性基团的引入,虽然分离度有所不同,但均可分离供试品中与芦丁极性相近的色谱峰。



A. Diamonsil Plus C₁₈-A B. Spursil C₁₈ C. Diamonsil Plus C₁₈-B D. Spursil C₁₈-EP

1. 芦丁(rutin) 2. 共有成分(coexisting component)

图 2 不同极性改性 C₁₈ 色谱柱分离的色谱图

Fig. 2 Chromatograms separated by different polar-modified C₁₈ columns

3.3 目标峰确认

采用 Spursil C₁₈-EP,供试品在芦丁峰相应位置出现 1、2 两个色谱峰(见图 1),通过保留时间可判断 1 号峰为芦丁目标成分峰。采用供试品加标的方式,即 1 mL 桑叶配方颗粒供试品溶液中加入 1 mg · mL⁻¹ 芦丁对照品溶液 10 μL,实验结果见图 3、表 2。结果显示,1 号峰面积相应增加,2 号峰面积几乎没有变化,证明 1 号峰为芦丁目标成分峰。

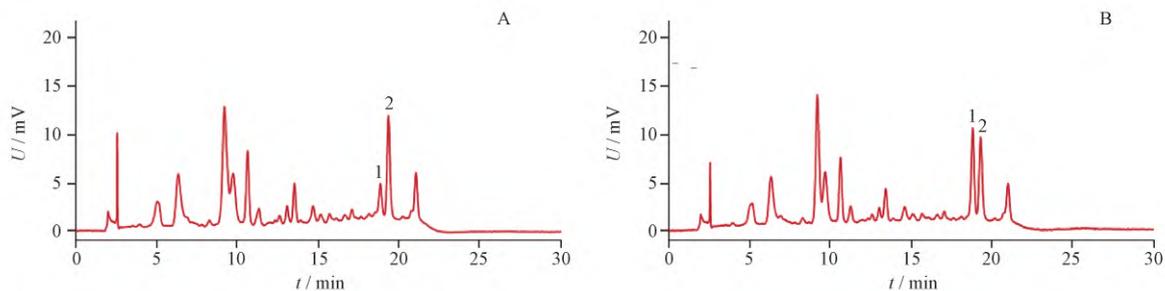
3.4 共有峰确认

采用 Spursil C₁₈-EP 色谱柱,两个不同批次的桑

叶配方颗粒中均可分离出 2 号成分峰,为了验证该色谱峰的来源,采用相同色谱条件分析桑叶对照药材溶液(2.1.3),所得图谱见图 4。桑叶对照药材溶液在同一位置显示相同色谱峰,可见该色谱峰是桑叶药材中的共有成分。因此,在采用药品标准 YBZ-PFKL-2021108 进行含量测定时,应将该成分与目标成分芦丁分离,以避免影响芦丁含量的测定结果。

3.5 方法学验证

采用 Spursil C₁₈-EP 色谱柱对桑叶配方颗粒中芦丁含量测定分析方法进行方法学验证。



A. 供试品溶液 批号 1070441 (sample, lot1070441) B. 供试品加标溶液 (spiked sample)

1. 芦丁 (rutin) 2. 共有成分 (coexisting component)

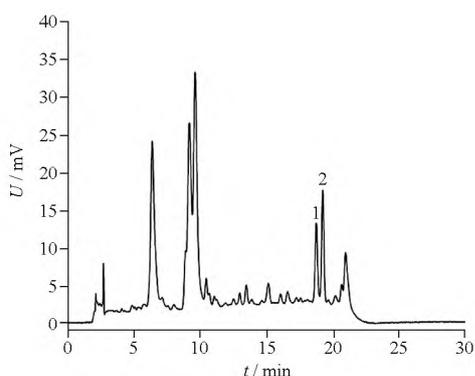
图 3 供试品及加标溶液在 Spursil C₁₈-EP 柱上的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of test sample and spiked solution on Spursil C₁₈-EP column

表 2 供试品及加标溶液中芦丁测定的色谱数据

Tab. 2 Chromatographic data for determination of rutin in sample and spiked solution

溶液类型 (solution type)	峰号 (peak number)	t _R / min	峰面积 (area)	拖尾因子 (tailing factor)	分离度 (resolution)
供试品溶液 批号 1070441 (sample, lot1070441)	1	18.824	35 139	1.00	/
	2	19.321	126 719	1.10	1.50
供试品加标溶液 (spiked sample)	1	18.803	136 565	1.01	/
	2	19.292	124 157	1.10	1.50



1. 芦丁 (rutin) 2. 共有成分 (coexisting component)

图 4 桑叶对照药材溶液在 Spursil C₁₈-EP 柱上的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of mulberry leaf reference medicinal material solution on Spursil C₁₈-EP column

3.5.1 线性关系 分别取浓度为 1、5、10、50、100、200 μg · mL⁻¹ 的芦丁对照品溶液,按照“2.2”项下条件进样测定,以对照品质量浓度为横坐标 (X, μg · mL⁻¹) 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归,得标准曲线方程为: Y = 12 153X + 2 273, r = 0.999 7, 线性关系良好。

3.5.2 精密度试验 精密吸取浓度为 100 μg · mL⁻¹ 的芦丁对照品溶液,按照“2.2”项下条件,连续进样 6 次,芦丁峰面积的平均值为 1122654, RSD 为

0.82%, 表明仪器精密度良好。

3.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h,按照“2.2”项下条件进样分析,测得芦丁峰面积的平均值为 91224, RSD 为 0.93%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

3.5.4 重复性试验 取同一批桑叶配方颗粒 6 份,按照“2.1.2”项下方法操作,制成供试品溶液,按照“2.2”项下条件测定,样品中芦丁的含量平均值为 0.7 mg, RSD 为 1.22%, 表明该方法重复性良好。

3.5.5 回收率试验 取已知含量的桑叶配方颗粒 (批号 0031871, 含量为 0.7 mg · g⁻¹) 6 份,每份约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 1 mg · mL⁻¹ 芦丁对照品溶液 0.2 mL,按照“2.1.2”项下方法操作,制成供试品溶液,按照“2.2”项下条件测定,计算回收率,结果芦丁的平均回收率为 98.5%, RSD 为 1.66%。

3.6 不同色谱柱的样品测定结果

不同色谱柱测定得到的桑叶配方颗粒中芦丁的含量结果统计见表 4。由于 Spursil C₁₈-EP 色谱柱能够将芦丁与共存成分分离,导致芦丁含量测定结果与其他 4 款色谱柱差异较大。其他 4 款色谱柱测得结果虽符合要求,但可能并非真实含量。

表3 不同色谱柱测定桑叶配方颗粒中芦丁含量结果

Tab.3 Determination results of rutin in mulberry leaf formula granules by different chromatographic columns

色谱柱型号 (column model)	峰面积(area)			含量(content) / (mg • g ⁻¹)	
	对照品 (reference)	供试品 1070441 (sample1070441)	供试品 0031871 (sample0031871)	供试品 1070441 (sample1070441)	供试品 0031871 (sample0031871)
Diamonsil Plus C ₁₈	1 052 681	180 268	260 927	1.4	2.1
Platisil ODS	1 067 870	184 989	275 281	1.4	2.1
ZORBAX SB-C ₁₈	1 087 750	184 146	269 142	1.4	2.1
Xbridge C ₁₈	1 070 426	160 358	265 921	1.2	2.1
Spursil C ₁₈ -EP	1 123 782	35 139	90 878	0.3	0.7

4 建议

通过多款 C₁₈ 色谱柱对桑叶配方颗粒中芦丁的分析情况得出,使用极性较强的极性改性 C₁₈ 色谱柱能够将芦丁与其共有成分分离,因此测得的含量值更准确可信。实验结果进一步表明,色谱柱是影响液相色谱法测定结果准确性的关键因素,应充分考虑不同色谱柱之间的差异,减少因色谱柱选择导致的结果不准确等问题。

参考文献

- [1] 王磊. 高效液相色谱法在中药质量检测中的运用实践研究[J]. 中国处方药, 2018, 16(8): 27
WANG L. Study on the use of high performance liquid chromatography in the quality testing of traditional Chinese medicine[J]. J China Prescrip Drug, 2018, 16(8): 27
- [2] 张夏, 胡昌勤. 色谱柱表征体系在选择最佳反相色谱柱中的应用[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 942
ZHANG X, HU CQ. Application of column characterization systems in selecting optimal RP-HPLC columns[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(6): 942
- [3] 王明娟, 刘雅丹, 胡晓茹, 等. 色谱柱选择对六味安消胶囊中大黄素和大黄酚含量测定的影响[J]. 色谱, 2016, 34(11): 1077
WANG MJ, LIU YD, HU XR, et al. Influence of column selection in assay of emodin and chrysophanol in LiuweiAnxiaocapsules[J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(11): 1077
- [4] 商国举, 尹文龙, 蔡振华, 等. 药物分析中 C₁₈ 色谱柱的差异与选择[J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 341
SHANG GJ, YIN WL, CAI ZH, et al. The difference and selection of C₁₈ column in drug analysis[J]. Drug Evaluat Res, 2015, 38(3): 341
- [5] 叶六平, 孙磊, 王明娟, 等. 等效色谱柱选择在大黄和补骨脂多成分高效液相色谱分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 945
YE LP, SUN L, WANG MJ, et al. Application of equivalent high performance liquid chromatographic column selection for multi-compound analysis of Rhei Radix et Rhizoma and PsoraleaeFructus[J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(6): 945
- [6] 李莉, 李硕, 王海燕, 等. 色谱柱选择对 23 种防腐剂测定结果的影响[J]. 色谱, 2022, 40(2): 190
LI L, LI S, WANG HY, et al. Influence of chromatographic column selection on the determination of 23 preservatives[J]. Chin J Chromatogr, 2022, 40(2): 190
- [7] 桑叶配方颗粒[S]. 国家药品标准, YBZ-PFKL-2021108
Sangye Dispensing Granules[S]. National Drug Standards, YBZ-PFKL-2021108

(收稿日期: 2022-03-30)