

HPLC 法测定炎热清片中 4 种成分

夏方亮

(滨州市食品药品检验检测中心, 山东 滨州 256600)

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定炎热清片中龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷的含有量。方法 分析采用 C₁₈ 色谱柱; 以甲醇-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 检测波长 254 nm。结果 龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷分别在 12.17 ~ 304.2、54.99 ~ 1 375、5.320 ~ 133.0、479.2 ~ 11 980 ng 范围内呈良好的线性关系, *R* 分别为 0.999 5、0.999 6、0.999 7、1.000, 平均回收率 (*n*=6) 分别为 99.36%、99.37%、98.24%、98.96%。结论 该方法可靠准确, 专属性强, 可用于炎热清片的质量控制。

关键词: 炎热清片; 龙胆苦苷; 栀子苷; 芒果苷; 黄芩苷; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2016)08-1859-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.044

炎热清片由湖北华龙生物制药有限公司生产, 处方中含玄参、龙胆、柴胡、栀子、知母、黄芩等药材, 功效解表清里, 清热解暑, 用于呼吸道炎、支气管炎、肺炎和急性扁桃体炎。目前, 其质量标准为国家食品药品监督管理局药品标准 (YBZ13632005-2012Z-7), 采用 HPLC 法测定黄芩苷含有量, 只能对黄芩进行质量控制。本实验采用 HPLC 法同时测定龙胆主要成分龙胆苦苷、栀子主要成分栀子苷、知母主要成分芒果苷和黄芩主要成分黄芩苷, 以提高该药物质量标准。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, 配置 Prominence SPD-20A/UV-VIS 检测器 (日本岛津公司)。炎热清片 (湖北华龙生物制药有限公司, 批号 20141002、20141221、20141226)。龙胆苦苷 (批号 110770-201515, 含有量 99.1%)、栀子苷 (批号 110749-201316, 含有量 97.5%)、芒果苷 (批号 111607-200402, 含有量 100.0%)、黄芩苷 (批号 110715-201117, 含有量 91.7%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Tedia 公司); 其他试剂为分析纯; 水为纯化水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 依利特 Sinochrom ODS-BP 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (程序见表 1); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取龙胆苦苷对照品 12.28 mg, 置于 100 mL 量瓶中; 栀子苷对照品 28.20 mg, 置于 50 mL 量瓶中; 芒果苷对照品 10.64 mg, 置于 200 mL 量瓶中; 黄芩苷对照品 130.65 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 70% 甲醇溶解

并稀释至刻度, 作为对照品贮备液。精密量取 5 mL, 置于同一 50 mL 量瓶中, 70% 甲醇稀释至刻度, 即得。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 甲醇/%	B 0.1% 磷酸/%
0 ~ 28	25	75
28 ~ 29	47	53
29 ~ 50	47	53
50 ~ 51	25	75
51 ~ 60	25	75

2.2.2 供试品溶液 取本品适量, 除去包衣, 研细, 混匀, 精密称取 0.5 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇适量, 超声 (250 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

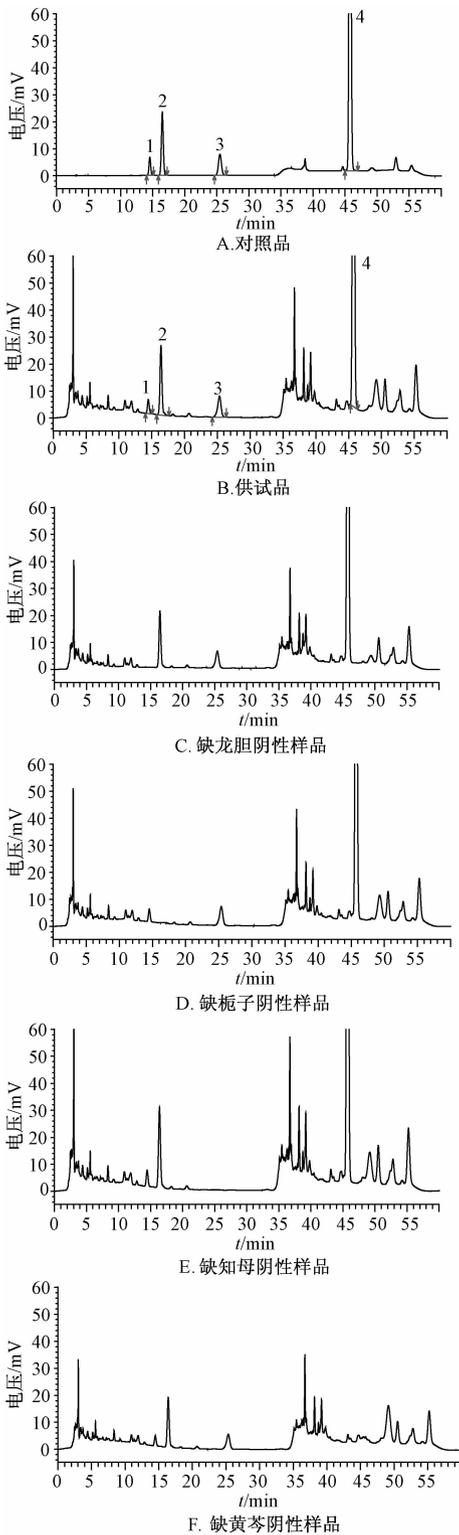
2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例, 配制不含龙胆、栀子、知母或黄芩的样品, 按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 取上述对照品、供试品和阴性样品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 色谱图见图 1。由图可知, 4 种成分分离度较高, 其中龙胆苦苷保留时间在 14.5 min 左右, 理论塔板数高于 12 000; 栀子苷在 16.4 min 左右, 高于 13 000; 芒果苷在 25.3 min 左右, 高于 11 000, 黄芩苷在 45.7 min 左右, 高于 150 000, 龙胆苦苷和栀子苷分离度大于 3, 栀子苷和芒果苷分离度大于 12, 芒果苷和黄芩苷分离度大于 28, 阴性无干扰。

2.4 线性关系考察 取对照品溶液适量, 在“2.1”项色谱条件下进样 1、5、10、15、20、25 μL, 以进样量 (ng) 为横坐标 (*x*), 峰面积为纵坐标 (*y*) 进行回归, 得回归方程 (*n* = 6) 分别为龙胆苦苷 $y = 1\ 051.1x - 2\ 027.9$ ($R^2 = 0.999\ 5$)、栀子苷 $y = 904.91x - 4\ 160.9$ ($R^2 =$

收稿日期: 2016-04-27

作者简介: 夏方亮, 男, 主管药师, 从事药品质量研究。Tel: 15305433932, E-mail: xiafl1980@126.com



1. 龙胆苦苷 2. 栀子苷 3. 芒果苷 4. 黄芩苷

图1 HPLC 色谱图

0.999 6)、芒果苷 $y = 4\ 646x - 1\ 116.8$ ($R^2 = 0.999\ 7$)、黄芩苷 $y = 3\ 202\ 129x - 2\ 715\ 764$ ($R^2 = 1$), 表明分别在 12.17 ~ 304.2、54.99 ~ 1 375、5.320 ~ 133.0、479.2 ~ 11 980 ng 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL , 测得龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 0.13%、0.12%、0.08% 和 0.09%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下, 于 0、3、6、12、24 h 进样, 进样量 10 μL , 测得龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 0.17%、0.21%、0.18% 和 0.12%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批号样品 6 份 (批号 20141002), 每份 0.5 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷含有量 RSD 分别为 0.21%、0.15%、0.22%、0.16%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取样品细粉 (龙胆苦苷 0.811 2 mg/g、栀子苷 4.871 mg/g、芒果苷 0.564 6 mg/g、黄芩苷 48.61 mg/g) 6 份, 每份 0.25 g, 分别精密加入“2.2.1”项下对照品贮备液 2、2.5、3、2.5 mL, 按“2.2.2”项下方法制备约为样品质量浓度 100% 的供试品溶液, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

成分	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/%
龙胆苦苷	0.253 7	0.205 8	0.243 4	0.446 9	98.88	99.36
	0.254 1	0.206 1	0.243 4	0.446 2	98.39	
	0.256 3	0.207 9	0.243 4	0.447 2	98.02	
	0.253 5	0.205 6	0.243 4	0.449 5	100.22	
	0.251 1	0.203 7	0.243 4	0.448 7	100.79	
	0.255 2	0.207 0	0.243 4	0.450 2	99.89	
栀子苷	0.253 7	1.236	1.375	2.588	98.16	99.37
	0.254 1	1.238	1.375	2.624	100.91	1.4
	0.256 3	1.248	1.375	2.589	97.24	
	0.253 5	1.235	1.375	2.605	99.61	
	0.251 1	1.223	1.375	2.603	100.40	
	0.255 2	1.243	1.375	2.617	99.91	
芒果苷	0.253 7	0.143 2	0.159 6	0.299 3	97.53	98.24
	0.254 1	0.143 5	0.159 6	0.300 6	98.28	0.65
	0.256 3	0.144 7	0.159 6	0.301 3	97.92	
	0.253 5	0.143 1	0.159 6	0.301 9	99.42	
	0.251 1	0.141 8	0.159 6	0.298 7	98.12	
	0.255 2	0.144 1	0.159 6	0.301 0	98.14	
黄芩苷	0.253 7	12.33	11.98	24.39	100.63	98.96
	0.254 1	12.35	11.98	24.03	97.56	1.2
	0.256 3	12.46	11.98	24.31	98.97	
	0.253 5	12.32	11.98	24.22	99.33	
	0.251 1	12.21	11.98	24.15	99.71	
	0.255 2	12.41	11.98	24.08	97.54	

2.9 样品含有量测定 取 3 批样品, 按“2.2.2”项下方

法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,结果见表3。

表3 含有量测定结果(mg/g)

批号	龙胆苦苷	栀子苷	芒果苷	黄芩苷
20141002	0.811 2	4.871	0.564 6	48.61
20141221	0.810 3	4.889	0.561 3	48.66
20141226	0.808 8	4.860	0.563 5	48.72

2.10 检测限与定量限 取“2.2.1”项下对照品贮备液,逐级稀释后进样,以色谱峰峰高为基线噪音3倍,计算龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷的检测限分别为1.460、0.440、1.064、2.396 ng;以色谱峰峰高为基线噪音10倍,计算定量限分别为4.380、1.320、3.192、7.188 ng。

3 讨论

3.1 流动相的选择 龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷和黄芩苷的检测流动相大多用甲醇-磷酸溶液^[1-2]或甲醇-水^[3-5],也有用乙腈-磷酸^[6-8]溶液、乙腈-冰醋酸^[9]或乙腈-磷酸盐溶液^[11-12]。用乙腈时,栀子苷和芒果苷分离度较差,而龙胆苦苷和栀子苷为环烯醚萜苷,其结构类似,也较难分离;流动相中甲醇比例超过30%时,龙胆苦苷和栀子苷保留时间较短,分离度差,而黄芩苷保留时间过长,不利于分析。故本实验采用梯度洗脱方式^[9-10],使4种成分均有合适的保留时间和较高的分离度。

3.2 检测波长的选择 将3种对照品贮备液用70%甲醇稀释后,进行紫外图谱扫描,发现龙胆苦苷在254、272 nm波长处有最大吸收,栀子苷在239 nm波长处有最大吸收,芒果苷在241、258、318、368 nm波长处有最大吸收,黄芩苷在246、278、318 nm波长处有最大吸收。综合考虑,本实验选择254 nm作为检测波长,各成分均有较高响应,在上述实验条件下定量准确,回收率较高。

3.3 提取方法的选择 本实验考察了超声提取^[1,3]、索氏提取^[4]、回流提取等方式,并研究了回流时间和超声时间。结果,3种提取方法差异较小,超声时间小于20 min时测定结果偏低,而在30 min以上较稳定。因此,选择超声30 min作为提取方法。

3.4 提取溶剂的选择 用纯甲醇和不同比例的甲醇溶液作为提取溶剂进行实验,发现甲醇比例超过50%时,提取效果无明显差异;纯甲醇由于溶剂效应,在进样量超过30 μL时,龙胆苦苷、栀子苷和芒果苷峰型变差。最终确定,以70%甲醇为提取溶剂。

3.5 耐用性 用依利特 Sinochrom ODS-BP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (250 mm ×

4.6 mm, 5 μm) 色谱柱在两台高效液相色谱仪(岛津 LC-20AT 和 Agilent1260) 上进行耐用性试验考察,发现两个厂家的液相色谱仪和两种色谱柱均可满足实验要求,耐用性良好。

3.6 注意事项 黄芩苷在70%甲醇中溶解度较差,故可先加入适量甲醇超声使其溶解,再用水稀释至刻度。

参考文献:

- [1] 胡春丽,杨丽,王冬梅,等. HPLC法同时测定当归龙荟片中龙胆苦苷和栀子苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(3): 204-207.
- [2] 张幸福,骆桂法,王燕. HPLC同时测定抱茎獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 61-64.
- [3] 李晓燕,许红辉,张彦芬,等. 龙荟胶囊中龙胆苦苷和栀子苷同时测定研究[J]. 中成药, 2008, 30(6): 861-864.
- [4] 吴立宏,叶燕,李兴尚,等. 反相高效液相色谱法测定道地产区秦艽药材中龙胆苦苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 184-187.
- [5] 王金鹏,王砚,任华忠,等. HPLC测定复方茵陈糖浆中龙胆苦苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 71-73.
- [6] 罗霄,代琪,谭鹏,等. 龙胆泻肝胶囊中龙胆苦苷与栀子苷的含量测定[J]. 医药导报, 2013, 32(8): 1099-1100.
- [7] 谢海青,陈斌,王彦,等. 龙荟丸中栀子苷、龙胆苦苷、芦荟苷和黄芩苷的多波长 HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(1): 48-50.
- [8] 温金莲,周清,宋粉云. RP-HPLC测定栀子金花丸中芒果苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 65-67.
- [9] 王凌,徐玲玲. HPLC法同时测定银翘解毒合剂中栀子苷与黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(3): 375-376.
- [10] 李翔,刘饭阳,马建丽,等. HPLC法同时测定清热解毒软胶囊中绿原酸栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 解放军药学学报, 2013, 29(3): 239-241.
- [11] 韩凤梅,李宇,李路军,等. 高效液相色谱法测定安宫牛黄丸中栀子苷、黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1406-1408.
- [12] 谢东,路玫. 反相高效液相色谱法同时测定双黄消炎片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 782-784.