

HPLC 法同时测定杜仲平压片中 6 种成分

何艳¹, 胡小祥²

(1. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423000)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定杜仲平压片(杜仲叶)中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁的含有量。方法 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 238、324、354 nm。结果 6 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9998$), 平均加样回收率 98.07%~100.34%, RSD 1.03%~1.96%。结论 该方法准确可靠, 重复性好, 可用于杜仲平压片的质量控制。

关键词: 杜仲平压片; 京尼平苷酸; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 芦丁; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0041-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.010

Simultaneous determination of six constituents in Compressed Duzhong Flat Tablets by HPLC

HE Yan¹, HU Xiao-xiang²

(1. College of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China; 2. Chenzhou Municipal Center for Food and Drug Control, Chenzhou 423000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of geniposidic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid and rutin in Compressed Duzhong Flat Tablets (*Eucommiae Folium*). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 35 °C thermostatic Thermo Hypersil Gold C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 238, 324, 354 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9998$), whose average recoveries were 98.07%–100.34% with the RSDs of 1.03%–1.96%. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Compressed Duzhong Flat Tablets.

KEY WORDS: Compressed Duzhong Flat Tablets; geniposidic acid; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; rutin; HPLC

杜仲平压片是由杜仲叶经水煎、浓缩所得浸膏加工制成的片剂, 功效降血压、强筋健骨, 适用于高血压、腰膝酸痛、筋骨痿软等症, 临床用于治疗高血压和骨质疏松。杜仲叶有效物质主要包括绿原酸、咖啡酸等苯丙素类成分^[1-2], 京尼平苷酸、京尼平苷等环烯醚萜类成分^[3], 以及芦丁、槲皮素等黄酮类成分^[4], 其中绿原酸具有利胆、抗菌、

抗病毒、降压等多种药理作用^[5-6]; 咖啡酸对心脏和血管组织增生有明显抑制作用, 可降低血浆中内皮素水平, 对内皮素-1 引起的血压上升具有明显拮抗作用, 从而降低血压^[7]; 京尼平苷酸能增殖造骨细胞, 抗骨质疏松, 降低血压^[8]; 芦丁具有广泛的生物活性, 如降血压、降血脂、抗氧化、舒张血管等^[9-10]。

收稿日期: 2019-06-19

基金项目: 湖南省“十三五”药学应用特色学科基金(湘教通[2018]469)

作者简介: 何艳(1985—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为中药制剂与质量标准。Tel: (0735) 2116268, E-mail: hxx3318@126.com

然而, 现行国家标准仅对杜仲平压片中绿原酸进行定性鉴别和定量测定^[11-12], 尚未涉及其他活性成分, 并且相关文献报道也较少^[13]。因此, 本实验采用 HPLC 法同时测定杜仲平压片中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁的含有量, 以期为进一步完善该制剂质量控制方法提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配置 G1311B 四元泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D DAD 检测器 (美国 Agilent Technologies 公司); XSE-205 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-300DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水处理系统 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂与药物 绿原酸 (批号 110753-201716, 质量分数 99.3%)、京尼平苷酸 (批号 111828-201604, 质量分数 97.4%)、咖啡酸 (批号 110885-201716, 质量分数 99.7%)、芦丁 (批号 100080-201811, 质量分数 92.4%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 新绿原酸 (批号 18031001, 质量分数 99.67%)、隐绿原酸 (批号 18032403, 质量分数 99.07%) 对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司。杜仲平压片 (批号 171510, 西安阿房宫药业股份有限公司; 批号 20171101、20170603、20180102, 贵州三仁堂药业有限公司)。乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司); 磷酸、甲醇为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 5%~10% A; 15~20 min, 10%~16% A; 20~30 min, 16% A; 30~35 min, 16%~30% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 238 nm (0~10 min)、324 nm (10~25 min)、354 nm (25~35 min); 进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

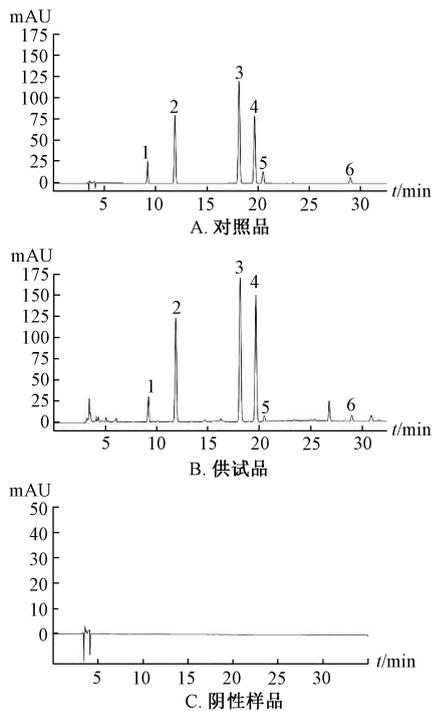
2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品京尼平苷酸 9.59 mg、新绿原酸 10.34 mg、绿原酸 15.28 mg、隐绿原酸 10.56 mg、咖啡酸 6.04 mg、芦丁 5.49 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 3、5、6、7、1、

2 mL, 置于同一 25 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得 (含京尼平苷酸 22.42 μg/mL、新绿原酸 41.22 μg/mL、绿原酸 72.83 μg/mL、隐绿原酸 58.58 μg/mL、咖啡酸 4.817 μg/mL、芦丁 8.116 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液 取片剂适量, 除去薄膜衣或糖衣, 研细, 取粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 50 mL 50% 甲醇, 称定质量, 超声 (300 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按片剂处方工艺制得只含辅料的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。

2.3 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由此可知, 各成分分离效果理想 (分离度均大于 1.5), 阴性无干扰, 表明该方法专属性良好。



1. 京尼平苷酸 2. 新绿原酸 3. 绿原酸 4. 隐绿原酸 5. 咖啡酸
6. 芦丁
1. geniposidic acid 2. neochlorogenic acid 3. chlorogenic acid
4. cryptochlorogenic acid 5. caffeic acid 6. rutin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1、2、4、6、10、14 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积

为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
京尼平苷酸	$Y=14.46X+0.8814$	0.9999	2.242~31.39
新绿原酸	$Y=31.35X+1.323$	0.9999	4.122~57.71
绿原酸	$Y=30.26X+1.593$	0.9998	7.283~101.9
隐绿原酸	$Y=24.48X+0.9849$	0.9998	5.858~82.01
咖啡酸	$Y=55.16X+0.0023$	0.9999	0.4817~6.744
芦丁	$Y=15.42X+0.1918$	0.9999	0.8116~11.36

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL , 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁峰面积 RSD 分别为 0.14%、0.21%、0.23%、0.20%、0.25%、0.29%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 171510), 于 0、4、8、12、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定, 测得京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁峰面积 RSD 分别为 1.42%、0.29%、0.30%、0.36%、0.70%、1.57%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批 (批号 171510) 片剂

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

批号	京尼平苷酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	芦丁
171510	1.584	4.108	6.372	6.493	0.1238	0.5087
20171101	1.705	3.753	8.086	5.435	0.1889	0.6924
20170603	2.170	4.199	9.232	6.258	0.2003	0.7841
20180603	1.235	3.207	6.269	4.692	0.1459	0.4712

3 讨论

3.1 检测波长筛选 本实验采用 DAD 检测器在 200~400 nm 范围内进行全波长扫描, 并采集光谱图。结果, 京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁分别在 238、326、326、326、324、354 nm 处有最大吸收, 综合考虑各成分在供试品色谱图中的响应值, 最终选择 238 nm 作为京尼平苷酸检测波长, 324 nm 作为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸检测波长, 354 nm 作为芦丁检测波长。

3.2 色谱条件筛选 本实验考察了 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×

6 mm, 5 μm) 发现 Thermo Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱分离效果最好, 色谱峰对称性理想。再考察了流动相乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.5% 磷酸^[14-15], 发现乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.5% 磷酸洗脱时各成分均达到较好的分离, 而且两者效果基本一致, 综合考虑成本和安全因素, 选择乙腈-0.1% 磷酸作为流动相。

2.8 加样回收率试验 取含有量已知的同一批 (批号 171510) 片剂, 除去薄膜衣或糖衣, 研细, 精密称取粉末约 0.25 g, 共 6 份, 置于锥形瓶中, 精密加入 50 mL 含京尼平苷酸 (8.756 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、新绿原酸 (20.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、绿原酸 (30.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、隐绿原酸 (33.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、咖啡酸 (0.6829 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、芦丁 (2.490 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 50% 甲醇, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁平均加样回收率分别为 99.51%、100.10%、100.34%、99.26%、99.01%、98.07%, RSD 分别为 1.85%、1.19%、1.26%、1.96%、1.30%、1.03%。

2.9 样品含有量测定 取 4 批片剂, 每批 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定, 计算含有量, 结果见表 2。

3.3 提取方法筛选 本实验比较了提取溶剂乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇、甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇, 发现 50% 甲醇提取时各成分提取率最高, 色谱峰峰形最好, 故选择其作为提取溶剂。再考察了超声时间 20、30、40、50 min, 发现超声 30 min 时各成分提取基本完全, 故确定其作为提取时间。

3.4 含有量分析 表 3 显示, 4 批杜仲平压片中

各成分含有量差异较大,以京尼平苷酸最明显,其原因可能是不同批次原料药的差异所致,故生产厂家应对此加以关注。

参考文献:

[1] 成军,白焱晶,赵玉英,等.杜仲叶苯丙素类成分的研究[J].中国中药杂志,2002,27(1):38-40.
[2] 张忠立,左月明,李于益,等.杜仲叶苯丙素类化学成分研究[J].中药材,2014,37(3):421-423.
[3] 左月明,张忠立,王彦彦,等.杜仲叶环烯醚萜类化学成分研究[J].中药材,2014,37(2):252-254.
[4] 成军,赵玉英,崔育新,等.杜仲叶黄酮类化合物的研究[J].中国中药杂志,2000,25(5):284-286.
[5] 李旭,刘停,陈时建,等.杜仲叶绿原酸提取工艺优化及对自发性高血压大鼠的降压作用[J].食品科学,2013,34(14):30-34.
[6] 赵昱,赵军,李湘萍,等.咖啡酰奎尼酸类化合物研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(11):869-874.
[7] 王峰,刘敏,杨连春,等.咖啡酸阿魏酸对高血压大鼠的降压作用[J].解放军药学报,1999,15(5):1-4.

[8] Deyama T, Nishibe S, Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and *Siberian ginseng* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1057-1070.
[9] 刘静,濮智颖,李爱玲,等.杜仲叶黄酮降血脂及抗氧化作用的研究[J].安徽农业科学,2010,38(11):5631-5632.
[10] Nishida S, Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 339(1-2): 129-133.
[11] WS₃-B-2143-96-1. 杜仲平压片质量标准[S].
[12] WS-10224(ZD-0244)-2002-2012Z. 杜仲平压片质量标准[S].
[13] 马凤仙,赫锦锦,李钦. RP-HPLC测定杜仲平压片中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量[J]. 中成药,2008,30(1):86-89.
[14] 童黄锦,杨海军,曾庆琪,等. HPLC法同时测定炒牛蒡子饮片7个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2018,38(5):771-775.
[15] 林雀跃,罗永强,张荣林,等. HPLC法同时测定壮药玉叶金花中9个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2018,38(5):765-770.

炒车前子质量标准的研究

赫一鸣, 刘鑫, 王玥玥, 曹雪, 贡济宇*, 蔡广知*
(长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

摘要: 目的 建立炒车前子 *Plantaginis Semen Tostum* 的质量标准。方法 TLC法进行定性鉴别,药典法测定水分、总灰分、酸不溶性灰分含有量及膨胀度, HPLC法测定京尼平苷酸、毛蕊花糖苷含有量。结果 TLC斑点清晰,阴性无干扰。水分、总灰分、酸不溶性灰分平均含有量分别为0.026 6%、4.3%、0.43%,平均膨胀度为4.9。京尼平苷酸、毛蕊花糖苷分别在0.793 75~25.400 μg ($r=0.999\ 3$)、0.812 5~26.00 μg ($r=0.999\ 5$)范围内线性关系良好,平均加样回收率分别为99.5%、99.8%,RSD分别为1.2%、2.5%。结论 暂定炒车前子水分、总灰分、酸不溶性灰分含有量分别不超过0.032%、5.2%、0.52%,膨胀度及京尼平苷酸、毛蕊花糖苷含有量分别不少于3.9、0.90%、0.55%。

关键词: 炒车前子;京尼平苷酸;毛蕊花糖苷;TLC;药典法;HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0044-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.011

Quality evaluation for *Plantaginis Semen Tostum*

HE Yi-ming, LIU Xin, WANG Yue-yue, CAO Xue, GONG Ji-yu*, CAI Guang-zhi*

收稿日期: 2019-05-29

基金项目: 吉林省特色药材炮制规范项目(PZ-2016-14)

作者简介: 赫一鸣(1994—),女,硕士生,从事中药分析学研究。Tel: 13069247420, E-mail: 1372221031@qq.com

*通信作者: 贡济宇(1960—),女,博士,教授,博士生导师,从事中药分析学及药物分析学、中药活性成分分析研究。Tel: 13944826815, E-mail: gongjiyu@126.com

蔡广知(1977—),男,副教授,硕士生导师,从事中药资源开发、中药活性物质分析研究。Tel: 19990570373, E-mail: 80188429@qq.com