

HPLC 双波长法同时测定净固片中 5 种活性成分的含量

曾琪^{1,2}, 谭道鹏², 陈艳萍¹, 曾伟珍², 严启新^{2*}, 曾令杰^{1*}

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 深圳海王药业有限公司, 广东 深圳 518057)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 双波长法同时测定净固片中芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素的方法。方法: 依利特 Kromasil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.2% 冰醋酸 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 12% ~ 15% B; 10 ~ 15 min, 15% ~ 17% B; 15 ~ 25 min, 17% B; 25 ~ 35 min, 17% ~ 20% B; 35 ~ 45 min, 20% ~ 22% B; 45 ~ 60 min, 22% ~ 40% B), 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 芦丁和槲皮素检测波长为 254 nm, 柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷检测波长为 283 nm。结果: 芦丁在 0.012 5 ~ 0.500 4 g·L⁻¹ ($r = 1.000\ 0$), 柚皮苷在 0.010 0 ~ 0.400 8 g·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$), 橙皮苷在 0.003 3 ~ 0.032 7 g·L⁻¹ ($r = 0.999\ 2$), 新橙皮苷在 0.011 3 ~ 0.225 6 g·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$), 槲皮素在 0.004 1 ~ 0.081 3 g·L⁻¹ ($r = 0.999\ 8$) 与峰面积具有良好的线性关系, 平均回收率均在 98% ~ 102%。结论: 该方法准确可靠, 可行性及重复性良好, 可作为净固片的质量控制方法。

[关键词] 高效液相色谱; 净固片; 芦丁; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0077-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180077

Simultaneous Determination of 5 Active Ingredients in Jinggu Tablets by HPLC Dual-wavelength Detection

ZENG Qi^{1,2}, TAN Dao-peng², CHEN Yan-ping¹, ZENG Wei-zhen², YAN Qi-xin^{2*}, ZENG Ling-jie^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Shenzhen Neptunus Pharmaceutical Co. Ltd, Shenzhen 518057, China)

[Abstract] **Objective:** The study was conducted to establish a HPLC method for simultaneously determination of rutin, naringin, hesperidin, neohesperidin and quercetin in Jinggu tablet. **Method:** The separation of compounds was performed on Elite Kromasil-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% acetic acid. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelengths were set at 254 nm for rutin and quercetin, 283 nm for naringin, hesperidin and neohesperidin. **Result:** The samples showed a good relationship in the ranges of 0.012 5-0.500 4 g·L⁻¹ for rutin, 0.010 0-0.400 8 g·L⁻¹ for naringin, 0.003 3-0.032 7 g·L⁻¹ for hesperidin, 0.011 3-0.225 6 g·L⁻¹ for neohesperidin and 0.004 1-0.081 3 g·L⁻¹ for quercetin. All of the average recoveries were between 98% and 102%. **Conclusion:** The method is accurate, reliable and reproducible and can be used for the quality control of Jinggu tablet.

[Key words] HPLC; Jinggu tablets; rutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; quercetin

处方源于金代四大名医之首张从正《儒门事亲》中的净固方^[1], 以槐花(炒)、枳壳为主药, 可治

疗“痔漏、下血痒痛”等。药理学研究表明, 净固片具有显著的抗炎、镇痛、止血、止痒、抗微血管渗透、

[收稿日期] 20140105(002)

[基金项目] 2008 年企业技术中心创新能力专项项目(发改办高技[2008]2012 号)

[第一作者] 曾琪, 硕士生, Tel:15013722746, E-mail:403509636@qq.com

[通讯作者] * 曾令杰, 博士, 教授, 从事中药质量标准研究, E-mail:598479380@qq.com;

* 严启新, 博士, 副研究员, 从事中药和天然药物开发, E-mail:yanqixin2005@126.com

抗肛门肿胀、促溃疡愈合和体外抑菌等作用。有文献报道 HPLC-MS 测定净固片中芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素成分^[2]。林宗涛等用 HPLC 测定了枳壳药材中 6 个黄酮类成分圣草次苷、新圣草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量^[5]，景佳麟等建立蜡染炒槐花中总黄酮、芦丁、槲皮素含量限度要求^[6]，莫少红等建立了化痔片（处方：槐米、枳壳、茜草、三七）的质量标准^[7]。由于净固片中 5 种活性成分都有各自的最大吸收波长，单一波长测定存在一定的误差，为了更好地评价净固片的质量，本文建立了高效液相色谱双波长法同时测定净固片中 5 种活性成分的含量。

1 仪器与试药

1100 系列高效液相色谱仪（美国安捷伦，包括低压四元梯度泵、二极管阵列检测器、自动进样器、在线脱气机、Agilent 化学工作站），AG135 型电子天平（梅特勒-托利多公司）；净固片（批号 20121201，20121202，20121203，20130801，20130802，20130803）为海王药业有限公司自制；芦丁（批号 100080-200707）、柚皮苷（批号 110722-200610）、橙皮苷（批号 110721-200512）、新橙皮苷（批号 111857-201102）、槲皮素（批号 100081-200907）对照品均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、冰醋酸为分析纯，乙腈为色谱纯，水为超纯水。

2 方法

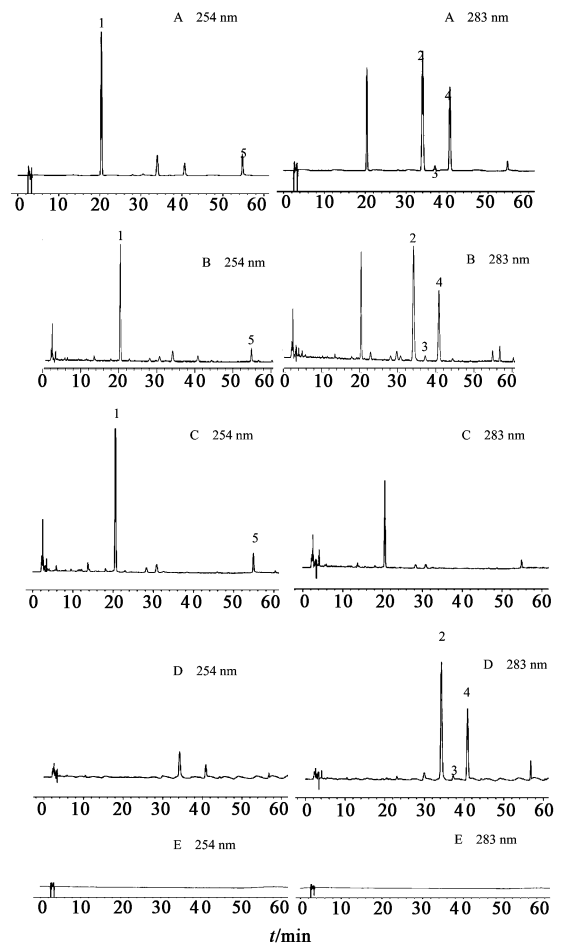
2.1 色谱条件 依利特 Kromasil-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm, 5 μm），流动相 0.2% 冰醋酸（A）-乙腈（B）梯度洗脱（0 ~ 10 min, 12% ~ 15% B；10 ~ 15 min, 15% ~ 17% B；15 ~ 25 min, 17% B；25 ~ 35 min, 17% ~ 20% B；35 ~ 45 min, 20% ~ 22% B；45 ~ 60 min, 22% ~ 40% B），检测波长 254, 283 nm，柱温 30 °C，流速 1.0 mL·min⁻¹，进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含芦丁 1.000 8 mg、柚皮苷 0.801 6 mg、橙皮苷 0.032 7 mg、新橙皮苷 0.451 2 mg、槲皮素 0.081 3 mg 的混合对照品储备液溶液，4 °C 冷藏备用。取混合对照品储备液 2 mL，置 10 mL 量瓶中，加纯甲醇稀释定容至刻度，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.3 供试品溶液的制备 取净固片 20 片，研磨成细粉，取约 64 mg 样品粉末，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加适量纯甲醇超声（功率 500 W，频率 40 kHz）处理 30 min，放冷，加甲醇定容至刻度，摇匀，过

0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.4 阴性供试品溶液的制备 按净固片的生产工艺分别制备不含枳壳和槐花的阴性制剂，并按照 2.3 项下方法制备阴性供试品溶液。



A. 对照品；B. 样品；C. 缺枳壳阴性样品；
D. 缺槐花阴性样品；E. 缺枳壳和槐花阴性样品；
1. 芦丁；2. 柚皮苷；3. 橙皮苷；4. 新橙皮苷；5. 槲皮素

图 1 净固片样品的 HPLC

3 结果

3.1 检测限和定量限 以信噪比为 3:1 确定芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素的检测限分别为 1.32 μg (RSD 1.06%)，1.12 μg (RSD 1.24%)，0.81 μg (RSD 1.13%)，1.21 μg (RSD 0.96%)，0.58 μg (RSD 1.44%)；以信噪比为 10:1 确定芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素的定量限分别为 4.03 μg (RSD 1.11%)，3.67 μg (RSD 1.29%)，2.69 μg (RSD 0.96%)，3.87 μg (RSD 1.15%)，1.94 μg (RSD 1.35%)。

3.2 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下不同体积混合对照品储备溶液，用甲醇配制成系列混合对照品溶液。以峰面积为纵坐标，对照品溶液的浓度为

横坐标,得到 5 种组分的回归方程,见表 1。

表 1 净固片中 5 种有效成分的回归方程和相关系数

组分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
芦丁	$Y = 16\ 893X - 7.109$	1.000 0	0.012 5 ~ 0.500 4
柚皮苷	$Y = 16\ 323X + 33.570$	0.999 9	0.010 0 ~ 0.400 8
橙皮苷	$Y = 14\ 329X + 15.300$	0.999 2	0.003 3 ~ 0.032 7
新橙皮苷	$Y = 18\ 063X + 29.720$	0.999 9	0.011 3 ~ 0.225 6
槲皮素	$Y = 32\ 511X - 74.440$	0.999 8	0.004 1 ~ 0.081 3

3.3 精密度试验

3.3.1 日内精密度 准确吸取供试品溶液 10 μL ,连续进样 5 次,测定芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素的峰面积,计算 RSD 分别为 1.21%, 1.19%, 2.93%, 1.38%, 0.21%。

3.3.2 日间精密度 上述供试品分别测定 3 d,每天测定 5 次,测定芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素的峰面积,计算 RSD 分别为 1.16%, 1.07%, 0.26%, 1.23%, 1.60%。

3.4 稳定性试验 取同一净固片样品粉末,精密称定,按 2.3 项下操作,在 2.1 项色谱条件下,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 测定,供试品溶液中芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素峰面积 RSD 分别为 1.10%, 0.89%, 4.27%, 1.17%, 2.05%, 表明供试品溶液在 72 h 内稳定性良好。

3.5 重复性试验 取同一净固片样品粉末 6 份,精密称定,按 2.3 项下操作,在 2.1 项色谱条件下进样测定,测定峰面积,测得 5 种有效成分含量的 RSD 分别是 1.99%, 0.94%, 1.86%, 1.23%, 1.36%。

3.6 加样回收率试验 取净固片(批号 20130801)样品粉末约 64 mg,精密称定,按照供试品中活性成分芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、槲皮素量 100% 比例分别精密加入对照品溶液适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进样分析,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 净固片中 5 种成分加样回收率试验($n = 6$)

组分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
芦丁	0.500 4	0.509 8	1.020 1	101.95	1.24
柚皮苷	0.402 1	0.387 6	0.788 2	99.61	1.50
橙皮苷	0.015 6	0.015 4	0.031 2	101.30	3.32
新橙皮苷	0.223 8	0.215 6	0.438 2	99.44	1.52
槲皮素	0.041 4	0.041 6	0.456 4	101.97	1.61

3.7 样品测定 按 2.3 项下的方法制备供试品溶

液,按 2.1 项下色谱条件进行含量测定,每批样品平行测定 3 次,记录峰面积,芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷及槲皮素的测定结果见表 3。

表 3 净固片样品中 5 种成分含量测定($n = 3$) mg/片

批号	芦丁	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	槲皮素
20130801	9.34	4.67	0.34	3.85	0.82
20130802	9.61	4.48	0.33	3.92	0.81
20130803	9.44	4.56	0.37	3.73	0.85
20121201	9.37	4.72	0.47	3.74	0.97
20121202	9.68	4.75	0.48	3.78	1.03
20121203	9.05	4.88	0.51	3.89	1.04

4 讨论

本实验采用 HPLC 双波长法同时测定净固片中芦丁、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷及槲皮素的含量,方法简便、重复性好,以期提高和完善净固片的质量标准。

经全波长扫描,芦丁、槲皮素在 254 nm 处都有较大的吸收,柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷在 283 nm 处有较大的吸收。在 254 nm 处检测时,芦丁、槲皮素基线分离无干扰,响应值高、峰形对称且尖锐;在 283 nm 处检测时,柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷色谱峰比较高。故为准确测定其含量,最终选择 254 nm 和 283 nm 两个波长进行检测。

处方中枳壳具有理气宽中,行滞消胀^[8]的作用,其中所含有的黄酮类成分柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷是抗炎镇痛和免疫调节作用的活性成分^[3];槐花具有凉血止血、清肝泻火^[8]的作用,其主要活性成分芦丁和槲皮素具有抗菌、抗病毒、抗炎、凝血、止血作用^[4],并且这 5 种活性成分在净固片中的含量较高,因此选择作为含量测定的指标成分。

本实验分别以纯水、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇分别将适量样品溶于量瓶中超声提取,结果表明以甲醇超声提取,芦丁以及柚皮苷的量明显增加,其他成分的量无明显变化。同时对提取时间进行了考察,分别超声提取 15, 30, 60 min,结果表明 30 min 与 60 min 提取结果基本一致,故最终以甲醇超声提取 30 min 为最佳提取方法。

[参考文献]

- [1] 张从正. 儒门事亲(卷十五:肠风下血)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:448.
- [2] 严启新,高媛,李勇,等. 六类新药净固片提取物的主要活性成分研究[J]. 中国药业,2012,21(15):13.

藏药桃儿七与小叶莲 HPLC 分析及其毒性差异研究

叶耀辉*, 马越兴, 张恩慧, 应亚宾, 王婷
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**比较桃儿七、小叶莲化学成分的异同,分析桃儿七、小叶莲的化学成分与毒性的关系,为建立鬼臼毒素类藏药的指纹图谱提供依据。**方法:**利用 HPLC 分析方法,分析桃儿七、小叶莲化学成分的差异,结合急性毒性实验方法测定桃儿七和小叶莲的 LD₅₀值,比较两药毒性差异,分析桃儿七、小叶莲鬼臼成分与毒性的关系,为桃儿七、小叶莲的质量标准提供依据。**结果:**标定了桃儿七与小叶莲的 14 个共有峰;桃儿七药材中鬼臼毒素、4'-去甲鬼臼毒素含量明显高于小叶莲,桃儿七、小叶莲 LD₅₀分别为 0.088 7, 0.909 8 g·mL⁻¹。**结论:**桃儿七、小叶莲化学成分基本相同,但化学成分含量差异较大。桃儿七鬼臼毒素含量更高,毒性更强,在制定药材质量标准时应严格控制鬼臼毒性成分的含量。

[关键词] 桃儿七; 小叶莲; 高效液相色谱; 毒性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0080-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180080

Study on Toxic Medicine Radix Podophylli and Fructus Podophylli by HPLC Fingerprint, Compare Their Toxicity

YE Yao-hui*, MA Yue-xing, ZHANG En-hui, YING Ya-bin, WANG Ting
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to compare the chemical constituents of Radix Podophylli and Fructus Podophylli, and analyze the relationship between chemical constituents and the toxicity, as well as to provide the basis for establishment of the fingerprint. **Method:** HPLC fingerprint was used to study the chemical composition of Radix Podophylli and Fructus Podophylli. The relationship between chemical composition and toxicity was analyzed through acute toxicity test. **Result:** There were 14 common chromatographic peaks for Radix Podophylli and Fructus Podophylli, the contents of Podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin in Radix Podophylli were higher than in Fructus Podophylli. Median lethal dose for Radix Podophylli and Fructus Podophylli was 0.088 7, 0.909 8 g·mL⁻¹, respectively. **Conclusion:** Radix Podophylli and Fructus Podophylli have the same

[收稿日期] 20131222(008)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20132BAB205080);江西省卫生计生厅项目(No.2012A035);江西中医学院课题项目(JZYC12B12)

[通讯作者] *叶耀辉, 硕士, 副教授, 从事中药学研究, Tel:0791-87118716, E-mail:55925368@qq.com

- [3] 舒尊鹏, 胡书法, 翟亚东, 等. 中药枳壳化学成分及药理作用研究[J]. 科技创新与应用, 2012(17):8.
- [4] 孙国禄, 赵强, 董晓宁, 等. 槐花化学成分及药理作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2009(6):24.
- [5] 林宗涛, 陈世忠, 王弘. HPLC 法测定枳壳中 6 个二氢黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2):201.
- [6] 景佳麟, 高慧敏, 李尧尧, 等. 关于完善《中国药典》2010 年版炒槐花质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):88.
- [7] 莫少红, 唐弟光, 陈晓军, 等. 化痔片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):150.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:229.

[责任编辑 顾雪竹]