

HPLC 同时测定清热定眩合剂中 3 种成分的含量

许红玮, 刘轲, 张怀亮*

(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定清热定眩合剂中黄芩苷、新橙皮苷及丹酚酸 B 含量的方法。方法: 采用 Waters Sunfire™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸(21:79), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 280 nm。结果: 黄芩苷、新橙皮苷及丹酚酸 B 的线性范围分别为 0.08 ~ 0.79 ($r = 0.999 9$), 0.07 ~ 0.75 ($r = 0.999 9$), 0.04 ~ 0.19 μg ($r = 0.999 8$); 平均回收率分别为 96.5%, 96.9%, 97.4%。结论: 建立的 HPLC 方法简便, 结果准确、可靠、重复性好, 可用于清热定眩合剂的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 清热定眩合剂; 黄芩苷; 新橙皮苷; 丹酚酸 B

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0072-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070072

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150211.1509.011.html>

[网络出版时间] 2015-02-11 15:09

Simultaneous Determination of Three Components in Qingre Dingxuan Mixture by HPLC XU Hong-wei, LIU Ke, ZHANG Huai-liang* (First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of baicalin; neohesperidin; salvianolic acid B in Qingre Dingxuan Mixture. **Method:** The chromatographic method was carried out on an Waters Sunfire™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection was set at the wavelength of 280 nm. The column temperature was at 30 °C. **Result:** The linear ranges of baicalin; neohesperidin; salvianolic acid B were 0.08-0.79 μg ($r = 0.999 9$), 0.07-0.75 μg ($r = 0.999 9$), 0.04-0.19 μg ($r = 0.999 8$) respectively. The average recoveries were 96.5%, 96.9%, 97.4% respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible.

[Key words] HPLC; Qingre Dingxuan mixture; baicalin; neohesperidin; salvianolic acid B

清热定眩合剂系我院知名脑病专家张怀亮教授根据多年的临床经验(汤剂)探索出的治疗肝风挟痰上扰清窍所致急性眩晕发作的经验方,是由黄芩、酒丹参、陈皮、法半夏、钩藤等 13 味组成的中药复方制剂。方中主药黄芩^[1]清热燥湿、泻火解毒;主要含黄酮类化合物,如黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等,其中黄芩苷为主要有效成分,已经报道黄芩苷有抑菌、清热、降压、镇静、利尿、利胆、抗炎、抗变态反应、解毒等作用^[2]。王冬梅等^[3]通过 HPLC 法测定了黄芩中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 3 种主要成分在芩

连片中的含量。郝乘仪等^[4]通过 HPLC 法测定黄芩苷等 5 中主要成分在芩菊上清片中的含量。陈皮^[5]理气健脾、调中、燥湿、化痰,其主要有效成分为橙皮苷和新橙皮苷^[6]。丹参为临床常用活血清热中药,主要含有脂溶性成分丹参酮 II_A 等、水溶性成分丹参酚酸 B 等,主要表现为对心血管系统的影响,水溶性成分丹参酚酸 B 抗动脉粥样硬化作用显著^[7]。刘莉等^[8]测定了其有效成分丹酚酸 B 在优选散瘀镇痛颗粒水提工艺中的含量。王绍青等^[9]通过 HPLC 法同时测定尿塞通胶囊中丹酚酸 B 含量。诸

[收稿日期] 20140919(007)

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(082102310080)

[第一作者] 许红玮, 硕士, 副主任药师, 从事药学研究, Tel:0371-66233639, E-mail:xuhow@126.com

[通讯作者] *张怀亮, 教授, 主任医师, 硕导, 从事脑血管疾病研究, Tel:0371-66211622, E-mail:hnlktem@126.com

药合用,共奏清热化痰,熄风清热定眩之功,临床疗效显著。

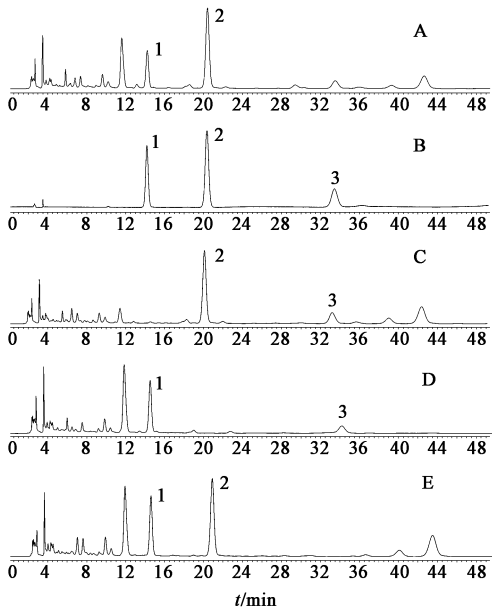
1 材料

1.1 仪器 e2695型高效液相色谱仪(包括2998 PDA检测器,Empower色谱工作站,美国Waters),CP225D型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Hk250型科导台式超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),LXJ-II B型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂制造)。

1.2 试药 黄芩苷(批号110715-200514)、新橙皮苷(批号111857-201102)、丹酚酸B(批号111562-201212)对照品购自中国食品药品检定研究院,甲醇、乙腈为色谱纯,其他均为分析纯,水为纯化水。清热定眩合剂(自制,批号20140105,20140106,20140107)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 Waters Sunfire™ C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸(21:79),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长280 nm。在此条件下,样品中新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸B与相邻组分均能够达到完全分离。理论塔板数均不低于2 000。见图1。



A. 供试品; B. 混合对照品; C. 新橙皮苷阴性; D. 黄芩苷阴性; E. 丹酚酸B阴性; 1. 新橙皮苷; 2. 黄芩苷; 3. 丹酚酸B

图1 清热定眩合剂 HPLC

Fig.1 HPLC chromatogram of Qingre Dingxuan mixture

2.2 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷、新橙皮苷和丹酚酸B 9.84, 9.35, 4.85 mg, 分别置25 mL的量瓶中,加甲醇定容,制成质量浓度分别为0.393 6,

0.374, 0.194 g·L⁻¹的对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液制备 将清热定眩合剂样品(批号140320)离心(2 000 r·min⁻¹)20 min,分别精密吸取10 mL置25 mL量瓶中,加入甲醇,定容,放置2 h后,滤过,取续滤液,0.45 μm微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 阴性干扰试验 取方中去除黄芩、陈皮、丹参的各药味,按处方比例及制备工艺分别制得空白样品,分别取空白样品按2.3项下方法操作,制备阴性对照溶液。精密吸取10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,结果表明阴性液无干扰。见图1。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察 分别精密吸取新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸B对照品溶液各2, 4, 8, 12, 16, 20 μL; 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL和2, 4, 6, 8, 10 μL; 注入高效液相色谱仪测定。以进样量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,分别进行线性回归。结果新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸B的回归方程分别为 $Y = 2 \times 10^9 X - 1.19 \times 10^5$ ($r = 0.999 8$), $Y = 3 \times 10^9 X - 2.57 \times 10^5$ ($r = 0.999 8$), $Y = 1 \times 10^9 X - 1.63 \times 10^4$ ($r = 0.999 8$)。结果新橙皮苷在0.748 ~ 7.48 μg,黄芩苷在0.787 2 ~ 7.872 μg,丹酚酸B在0.388 ~ 3.88 μg进样量与色谱峰面积线性关系良好。

2.5.2 精密度考察 精密吸取新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸B 3种对照品溶液10 μL,重复进样6次,分别记录新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸B的色谱峰面积,计算RSD分别为0.2%, 0.1%, 1.4%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性考察 将供试品溶液分别在制备后0, 2, 4, 7, 14, 19, 20, 25 h,精密吸取10 μL注入高效液相色谱仪测定,结果新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸B色谱峰面积的RSD分别为1.2%, 0.3%, 0.4%。表明25 h内测定,样品稳定性良好。

2.5.4 重复性考察 精密吸取清热定眩合剂样品6份,按供试品溶液制备方法操作,测定。结果新橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸B的平均质量分数为1.331, 1.433, 0.776 g·L⁻¹, RSD分别为0.6%, 0.4%, 0.4%,表明方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率考察 精密吸取清热定眩合剂样品18份,每份2 mL,置10 mL量瓶中,分别精密加入新橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸B对照品溶液(0.374, 0.393 6, 0.194 g·L⁻¹) 3 mL各6份,加甲醇定容,备用。精密吸取供试品溶液10 μL进行测定,计算回收率,结果表明柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的回收

率均在 95.0% ~ 105.0%, RSD 亦符合相关规定。结果见表 1。

表 1 清热定眩合剂中 3 种成分的加样回收率试验

Table 1 Results of recovery rate of three components in Qingre Dingxuan mixture

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
新橙皮苷	1.134 0	1.122	2.220 2	96.81	96.8	1.2
	1.134 0	1.122	2.206 2	95.56		
	1.134 0	1.122	2.242 8	98.82		
	1.134 0	1.122	2.218 5	96.66		
	1.134 0	1.122	2.225 6	97.29		
黄芩苷	1.134 0	1.122	2.209 2	95.83	96.2	0.9
	1.187 2	1.180 8	2.308 0	94.92		
	1.187 2	1.180 8	2.323 0	96.15		
	1.187 2	1.180 8	2.335 0	97.17		
	1.187 2	1.180 8	2.333 0	97.04		
丹酚酸 B	1.187 2	1.180 8	2.335 0	97.21	97.6	1.3
	1.187 2	1.180 8	2.326 0	96.44		
	1.543 5	0.582	2.097 5	95.18		
	1.543 5	0.582	2.115 3	98.23		
	1.543 5	0.582	2.114 8	98.17		
1.543 5	0.582	2.114 0	98.02			
1.543 5	0.582	2.110 0	97.33			
1.543 5	0.582	2.118 2	98.74			

2.6 样品含量测定 精密吸取 3 批清热定眩合剂(批号 20140105, 20140106, 20140107), 按试验中所建立的方法测定新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸 B 的含量, 结果见表 2。

表 2 清热定眩合剂样品中 3 种成分含量测定 (n=3)

Table 2 Determination results of the contents of Qingre Dingxuan mixture (n=3)

批号	新橙皮苷	黄芩苷	丹酚酸 B
20140105	1.241	1.384	0.734
20140105	1.237	1.382	0.734
20140106	1.285	1.401	0.767
20140106	1.280	1.409	0.763
20140107	1.283	1.364	0.759
20140107	1.279	1.357	0.757
平均值	1.267	1.382	0.752

3 结果与讨论

对甲醇-水, 乙腈-水不同比例组成^[10-15]的流动相系统进行了考察, 结果流动相为乙腈-0.1% 磷酸水(21:79)时, 新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸 B 色谱峰与相邻组分均有较好的分离, 并且阴性对照无干扰。即在该色谱条件下, 能够准确测定 3 个组分的含量。由于新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸 B 在 280 nm 附近均有最大吸收, 因此, 本实验的检测波长仍选为 280 nm。试验中以新橙皮苷、黄芩苷和丹酚酸 B 为指

标, 建立含量测定方法, 经方法学验证, 表明该方法重复性好、精密度高、样品稳定性好, 回收率符合要求, 因此可以用于本制剂的质量控制。

本试验采用 HPLC 等度洗脱, 同时测定清热定眩合剂中 3 种活性成分的含量, 方法简便, 结果准确可靠, 可为更加全面控制清热定眩合剂质量提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 张瑜, 武斌, 许建卫. 黄芩药理作用的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(6): 1091-1093.
- [2] 宁宏. 黄芩黄酮类化学成分药理研究新进展[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(15): 142-143.
- [3] 王冬梅, 高靛, 张洪霞, 等. HPLC 法同时测定芩连片中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(12): 955-958.
- [4] 郝乘仪, 郭淑英, 冯波. HPLC 同时测定芎菊上清片中 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 19(24): 74-77.
- [5] 清·顾观光. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1969: 22-23.
- [6] 李晓芳, 张健康, 王慧鸾, 等. 陈皮的研究进展[J]. 江西中医药, 2014, 45(3): 76-78.
- [7] 李巧玉, 刘杨, 包华音. 近 5 年丹参化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16(2): 145-146.
- [8] 刘小莉, 姚仲青, 秦昆明, 等. 正交实验结合 HPLC 指纹图谱优选散瘀镇痛颗粒水提工艺[J]. 中成药, 2013, 35(3): 495-499.
- [9] 王绍青, 金星, 张清波, 等. HPLC 同时测定尿塞通胶囊中丹参素钠、橙皮苷及丹酚酸 B 含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6): 83-85.
- [10] 王健, 孙瑜, 陈双璐, 等. HPLC 法同时测定小儿抗病毒颗粒中黄芩苷和橙皮苷的含量[J]. 天津药学, 2013, 25(5): 12-15.
- [11] 杜宏伟, 水文波, 梁建强, 等. 高效液相色谱法测定槐角丸中新橙皮苷含量[J]. 陕西中医, 2013, 34(2): 229-230.
- [12] 雷丁超, 鄂秀辉, 张兰兰. HPLC 法同时测定唐敏灵丸中 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 70-73.
- [13] 田成旺, 张铁军. HPLC 法测定丹芩颗粒中黄芩苷和丹酚酸 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10): 1738-1740.
- [14] 张乐, 张强, 刘娟, 等. 参七消痞颗粒中野黄芩苷和丹酚酸 B 含量测定方法研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(18): 550-553.
- [15] 刘弘, 张玲昂, 王俊杰, 等. HPLC 法测定心得宁口服液中丹酚酸 B 的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1936-1937.

[责任编辑 顾雪竹]