

# 高效液相色谱-三波长检测-梯度洗脱法 同时测定橘红化痰丸中3种苷类成分

梁咏倩, 余积聪, 宋粉云\*

(广东药科大学药科学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:建立高效液相色谱-三波长检测-梯度洗脱法同时测定橘红化痰丸中3种苷类成分含量的方法。方法:采用 Diamonsil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 检测波长分别 210 nm(苦杏仁苷), 276 nm(甘草苷)和 283 nm(柚皮苷)。结果:苦杏仁苷在 25.0~175.0 mg·L<sup>-1</sup>具有良好的线性关系( $r=0.9991$ ), 苦杏仁苷平均回收率为 101.5%, RSD 1.9%; 甘草苷在 2.0~50.0 mg·L<sup>-1</sup>具有良好的线性关系( $r=0.9995$ ), 甘草苷平均回收率为 100.8%, RSD 1.5%; 柚皮苷在 6.3~126.0 mg·L<sup>-1</sup>具有良好的线性关系( $r=0.9992$ ), 柚皮苷平均回收率为 101.7%, RSD 1.6%。结论:该法操作简单, 重复性好, 测定结果准确, 可用于更好地控制该制剂的质量。

**[关键词]** 橘红化痰丸; 苦杏仁苷; 甘草苷; 柚皮苷; 高效液相色谱法; 三波长检测; 梯度洗脱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0080-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016100080

## Simultaneous Determination of Three Kinds of Glycosides Components in Juhong Huatan Wan by HPLC with Gradient Elution and Three Wavelength Detection

LIANG Yong-qian, YU Ji-cong, SONG Fen-yun\*

(College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** A high performance liquid chromatographic method with gradient elution and three wavelength detection was developed for the simultaneous determination of amygdalin, liquiritin and naringin in Juhong Huatan Wan. **Method:** The separation was performed on a Diamonsil-C<sub>18</sub> column with methanol and 0.1% phosphoric acid as the mobile phase of gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelengths were set at 210, 276, 283 nm. **Result:** The linear range of amygdalin was 25.0-175.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.9991$ ). The average recovery for amygdalin was 101.5%, precision of the method was 1.9% (RSD). The linear range of liquiritin was 2.0-50.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.9995$ ). The average recovery for liquiritin was 100.8%, precision of the method was 1.5% (RSD). The linear range of naringin was 6.3-126.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.9992$ ). The average recovery for naringin was 101.7%, precision of the method was 1.6% (RSD). **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible. It is a good method for the quality control of the preparation.

**[Key words]** Juhong Huatan Wan; amygdalin; liquiritin; naringin; HPLC; three wavelength detection; gradient elution

橘红化痰丸是由化橘红、锦灯笼、川贝母、炒苦杏仁等8味药材制成的中药成方制剂,具有敛肺化

**[收稿日期]** 20150327(002)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(5002841)

**[第一作者]** 梁咏倩,在读硕士,从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究, E-mail: yqlueng@163.com

**[通讯作者]** \*宋粉云,教授,从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究, Tel: 020-39352136, E-mail: fuhaiwu@163.com

痰、止咳平喘之功效。临床用于肺气不敛,痰浊内阻,咳嗽,咯痰,喘促,胸膈满闷等的治疗。《中国药典》2010 年版中规定橘红化痰丸采用 HPLC 法测定吗啡的含量<sup>[1]</sup>。化橘红为方中君药,黄酮类成分是化橘红的主要有效成分之一,其中柚皮苷占总黄酮含量的 70% 以上;苦杏仁是方中止咳化痰的主药,苦杏仁苷是苦杏仁中的有效成分;甘草为方中主药,甘草苷为甘草的指标性成分。柚皮苷,苦杏仁苷与甘草苷的含量测定亦以 HPLC 法为主<sup>[2-9]</sup>。也有 HPLC 法测定该制剂中吗啡含量的报道<sup>[10]</sup>,但柚皮苷、苦杏仁苷、甘草苷 3 种成分同时测定未见报道。为进一步评价该制剂的质量,本文建立了橘红化痰丸中苦杏仁苷、甘草苷与柚皮苷含量测定的反相高效液相色谱法,具有分离效果好、灵敏、准确等优点,可用于该产品的质量控制。

### 1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪(1100 系列双元泵,1100 可变波长检测器,1100 化学工作站,美国安捷伦公司),DL-360A 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司,频率 35 kHz,功率 250 W),CP114 型 1/1 万电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司)。

苦杏仁苷(批号 110820-201004,纯度 93.6%),甘草苷(批号 111610-201106,纯度 93.7%),柚皮苷对照品(批号 110722-201312,纯度 94.7%),中国食品药品检定研究院。橘红化痰丸(天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂,批号 4360030,4360024,4360027,规格 9 g/丸)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为双蒸水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 溶液制备

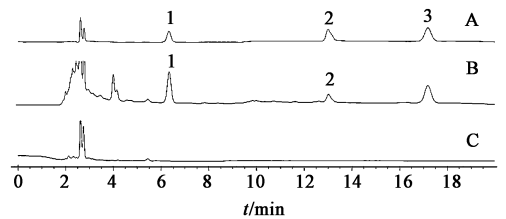
**2.1.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取苦杏仁苷、甘草苷和柚皮苷对照品 26.7,10.7,22.2 mg,置 50 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成苦杏仁苷、甘草苷和柚皮苷质量浓度为 500,200,420 mg·L<sup>-1</sup>的对照品贮备液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取本品大蜜丸,剪碎,取约 0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 1 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,续滤液 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

**2.1.3 阴性样品溶液的制备** 取处方组成中除化橘红,苦杏仁及甘草外的其余成分制成不含化橘红、苦杏仁及甘草的阴性样品,按 2.1.2 项下的制备方

法处理得阴性样品溶液。

**2.2 色谱条件及系统适应性试验** Diamonsil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水(B)溶液梯度洗脱(0~6 min, 33% A; 6~16 min, 33%~43% A; 16~18 min, 43%~33% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长(0~8.00 min, 210 nm; 8.00~15.00 min, 276 nm; 15~18 min, 283 nm),柱温 30 °C。分别取混合对照品溶液(甘草苷,柚皮苷,苦杏仁苷质量浓度分别为 20.0, 50.4, 100.0 mg·L<sup>-1</sup>),供试品溶液和阴性样品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,理论塔板数以苦杏仁苷峰计算不低于 6 000,苦杏仁苷峰的拖尾因子为 0.99,保留时间约为 6.3 min;甘草苷峰的拖尾因子为 0.85,保留时间约为 13 min;柚皮苷峰的拖尾因子为 0.97,保留时间约为 17.1 min。3 种成分峰与其他组分峰的分离度均 > 1.5;阴性样品不干扰样品测定。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性; 1. 苦杏仁苷; 2. 甘草苷; 3. 柚皮苷  
图 1 橘红化痰丸的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Juhong Huatan Wan

#### 2.3 方法学考察

**2.3.1 标准曲线制备** 分别吸取 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 的甘草苷对照品贮备液, 0.15, 0.35, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 mL 的柚皮苷对照品贮备液, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL 的苦杏仁苷对照品贮备液, 加 70% 甲醇稀释成不同质量浓度的混合对照品溶液共 7 份, 其中甘草苷质量浓度分别为 2.0, 6.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 mg·L<sup>-1</sup>, 柚皮苷质量浓度分别为 6.3, 14.7, 25.2, 50.4, 75.6, 100.8, 126.0 mg·L<sup>-1</sup>, 苦杏仁苷质量浓度分别为 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 125.0, 150.0, 175.0 mg·L<sup>-1</sup>。依次进样 10 μL, 每个浓度测定 3 次以上。以峰面积(A)对对照品溶液系列浓度(C)进行回归, 得甘草苷回归方程  $A = 16.19C + 0.03$  ( $r = 0.9995$ )。表明甘草苷在 2.0~50.0 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积线性关系良好; 柚皮苷回归方程为  $A = 15.93C - 3.60$  ( $r = 0.9992$ )。表明柚皮苷在 6.3~126.0 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积线性关系良好; 苦杏仁苷回

归方程为  $A = 8.93C + 3.21$  ( $r = 0.9995$ )。表明苦杏仁苷在  $25.0 \sim 175.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与峰面积线性关系良好。

**2.3.2 精密度试验** 取甘草苷, 柚皮苷, 苦杏仁苷质量浓度分别为  $20.0, 50.4, 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液  $10 \mu\text{L}$  连续测定 5 次, 甘草苷, 柚皮苷, 苦杏仁苷峰面积 RSD 分别为  $1.8\%, 1.6\%, 2.0\%$ , 表明仪器重复性良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取供试品溶液 (批号 4360030) 在  $0, 2, 4, 6, 8, 12 \text{ h}$  分别进样  $10 \mu\text{L}$ , 记录峰面积, 结果甘草苷, 柚皮苷, 苦杏仁苷峰面积的 RSD 分别为  $1.8\%, 0.9\%, 0.6\%$ 。表明供试品溶液在  $12 \text{ h}$  内稳定。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批号 (4360030) 样品 6 份, 按 **2.1.2** 项下方法提取、测定, 结果甘草苷平均质量分数为  $0.850 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD  $1.5\%$ , 柚皮苷平均质量分数为  $2.308 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD  $1.6\%$ , 苦杏仁苷平均质量分数为  $4.187 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD  $1.9\%$ 。表明分析方法重复性良好。

**2.3.5 加样回收试验** 精密称取同一批号样品 (4360030) 共 6 份, 加入相应量的甘草苷对照品, 柚皮苷对照品和苦杏仁苷对照品, 照 **2.1.2** 项下方法处理并测定, 计算回收率, 结果见表 1。甘草苷平均回收率为  $100.8\%$ , RSD  $1.4\%$ , 柚皮苷平均回收率为  $101.7\%$ , RSD  $1.2\%$ , 苦杏仁苷平均回收率为  $101.5\%$ , RSD  $1.1\%$ 。结果表明本方法准确可靠。

表 1 橘红化痰丸中 3 种苷类成分的回收率试验

Table 1 Results of three kinds of glycosides components in Juhong Huatan Wan recovery experiments

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
甘草苷	0.300 0	0.255	0.240	0.498	101.2	100.8	1.4
	0.294 6	0.250	0.240	0.498	103.3		
	0.304 2	0.259	0.240	0.498	99.6		
	0.314 7	0.267	0.240	0.508	100.4		
	0.295 8	0.251	0.240	0.491	100.0		
	0.301 5	0.256	0.240	0.497	100.4		
柚皮苷	0.300 0	0.692	0.630	1.339	102.7	101.7	1.2
	0.294 6	0.680	0.630	1.315	100.8		
	0.304 2	0.702	0.630	1.352	103.2		
	0.314 7	0.726	0.630	1.369	102.1		
	0.295 8	0.683	0.630	1.313	100.0		
	0.301 5	0.696	0.630	1.335	101.4		
苦杏仁苷	0.300 0	1.256	1.350	2.613	100.5	101.5	1.1
	0.294 6	1.233	1.350	2.585	100.1		
	0.304 2	1.274	1.350	2.649	101.9		
	0.314 7	1.318	1.350	2.700	102.4		
	0.295 8	1.239	1.350	2.608	101.4		
	0.301 5	1.262	1.350	2.648	102.7		

**2.4 样品测定** 取橘红化痰丸样品 3 批, 照 **2.1.2** 项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取混合对照品溶液 (甘草苷, 柚皮苷, 苦杏仁苷质量浓度分别为  $20.0, 50.4, 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与供试品溶液各  $10 \mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 测定, 计算样品中甘草苷、柚皮苷和苦杏仁苷的含量, 结果见表 2。

3 讨论

**3.1 提取条件的选择** 考察了不同体积分数甲醇

表 2 橘红化痰丸中 3 种成分的含量测定 ( $n \geq 3$ )

Table 2 Results of Juhong Huatan Wan determination ( $n \geq 3$ )

批号	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	甘草苷	柚皮苷	苦杏仁苷
4360030	0.850	2.308	4.187
4360027	0.894	2.417	4.321
4360024	0.793	2.201	4.179

的提取方法, 发现使用 70% 甲醇为溶剂的提取效果

较好。然后在以70%甲醇为溶剂,提取时间为1 h的条件下,考察了超声提取,加热回流2种方法,结果显示2种提取方法没有明显差异,本着简便安全的原则选择超声提取法;考察了本条件下的不同超声时间,实验结果表明,超声1 h后可以认为各成分已经提取完全。探究得到提取方法为70%甲醇超声1 h。

**3.2 流动相的选择** 尝试了多种不同比例的甲醇-0.1%磷酸流动相后,发现甲醇比例较小时甲醇-0.1%磷酸(30:70)苦杏仁苷分离效果好,但柚皮苷保留时间过长(>40 min);反之将甲醇比例调高甲醇-0.1%磷酸(38:62)柚皮苷保留时间合适(20.6 min),但苦杏仁苷分离度达不到要求。采用梯度洗脱法,经反复试验调整得到流动相洗脱程序为0~6 min 甲醇-0.1%磷酸水溶液(33:67),6~16 min 甲醇-0.1%磷酸水溶液(43:57),16~18 min 甲醇-0.1%磷酸水溶液(33:67)。在此色谱条件下各成分分离度和保留时间均符合要求。

**3.3 检测波长的选择** 将苦杏仁苷对照品、甘草苷对照品和柚皮苷对照品配制成一定浓度的溶液,在200~450 nm波长进行紫外扫描,发现苦杏仁苷仅在波长为210 nm有吸收峰,而甘草苷与柚皮苷的强吸收峰分别在276,283 nm波长处。根据试验结果,选择在3个波长处检测,即各成分的最大吸收波长处检测,0~8 min使用210 nm波长测定苦杏仁苷,8~15 min使用276 nm波长测定甘草苷,在15~18 min使用283 nm波长测定柚皮苷。

本试验建立高效液相色谱方法可以同时分析3个苷类化合物,重复性好,操作简单,结果准确,可以

作为控制橘红化痰丸质量的方法。

[参考文献]

- [1] 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,2010:879-880.
- [2] 刘晓涵,陈永刚,林励,等. 化橘红中柚皮苷和野漆树苷含量同时测定方法的建立[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(6):640-642.
- [3] 张金莲,何敏,谢一辉,等. 高效液相色谱法测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):68-70.
- [4] 江波,石典花,袁振海,等. HPLC测定枳壳饮片中柚皮苷的含量[J]. 中国现代中药,2007,9(3):12-14.
- [5] 杨书斌,刘青,孙立立,等. HPLC测定苦杏仁饮片中苦杏仁苷的含量[J]. 中成药,2006,28(10):1452-1454.
- [6] 杨玲玲,常军民,姚军. HPLC测定天山花楸中的苦杏仁苷[J]. 华西药学杂志,2007,22(5):589-590.
- [7] 邹小娟,谢和兵,钱芳,等. HPLC法测定苦杏仁中苦杏仁苷含量的方法研究[J]. 中国药事,2009,23(1):33-36.
- [8] 犹卫,王敏,马天俊. HPLC法测定复方甘草合剂中甘草苷的含量[J]. 资源开发与市场,2005,21(6):491-492.
- [9] 张崇禧,杨春花,蔡恩博,等. HPLC分析甘草中甘草酸和甘草苷含量[J]. 资源开发与市场,2010,26(8):673-675.
- [10] 戴敬,冯丽,孙明,等. HPLC法测定橘红化痰丸中吗啡的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(10):1757-1759.

[责任编辑 顾雪竹]