

# HPLC-ELSD 测定咽炎颗粒中齐墩果酸与常春藤皂苷元

郭宇姝<sup>1</sup>, 窦冕<sup>2</sup>, 张沂<sup>1</sup>, 刘江云<sup>2</sup>, 郝丽莉<sup>2\*</sup>

(1. 海军总医院药剂科, 北京 100048; 2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

**[摘要]** 目的: 建立测定咽炎颗粒中齐墩果酸与常春藤皂苷元的高效液相色谱-蒸发光散射含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Cosmosil PAQ-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇(A)-水(B) 流动相梯度洗脱, 蒸发光散射检测, 流速 0.9 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 齐墩果酸的线性范围为 1.321 ~ 5.285 μg (r = 0.999 3), 平均加样回收率为 98.5%; 常春藤皂苷元的线性范围为 0.473 6 ~ 1.894 μg (r = 0.999 2), 平均加样回收率为 100.2%。结论: 该方法操作简便, 结果准确可靠, 可作为咽炎颗粒中齐墩果酸与常春藤皂苷元的含量测定方法。

**[关键词]** 咽炎颗粒; 齐墩果酸; 常春藤皂苷元; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 02-0051-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014020051

## Determination of Oleanolic Acid and Hederagenin in Yanyan Granule by HPLC-ELSD

GUO Yu-shu<sup>1</sup>, DOU Mian<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, LIU Jiang-yun<sup>2</sup>, HAO Li-li<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Navy General Hospital, Beijing 100048, China;  
2. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**[收稿日期]** 20130626(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81274190)

**[第一作者]** 郭宇姝, 副主任药师, 从事药物分析研究, Tel: 010-66958206, E-mail: guoyusu@sina.com

**[通讯作者]** \* 郝丽莉, 研究员, 从事中医药基础与临床研究, Tel: 0512-65884301, E-mail: haolili@suda.edu.cn

- [9] 欧阳华学, 黎源倩, 肖全伟. HPLC 法测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素[J]. 中草药, 2007, 38(5):774.
- [10] 李凡, 裘雅渔, 钱文春, 等. 桑叶中总生物碱和 1-脱氧野尻霉素的含量考察[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3):176.
- [11] 夏学军, 汪仁芸, 刘玉玲. 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定桑枝总生物碱的含量[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23):2044.
- [12] Chalunton Vichasilp, Kiyotaka Nakagawa, Phumon Sookwong, et al. Development of high 1-deoxyojirimycin (DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction[J]. LWT-Food Sci Technol, 2012(45):226.
- [13] Naoki Asano, Emiko Tomioka, Haruhisa Kizu, et al. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis* [J]. Carbohydr Res, 1994, 253:235.
- [14] Naoki Asano, Toru Yamashita, Kayo Yasuda, et al. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.) [J]. J Agric Food Chem, 2001(49):4208.
- [15] Kim Ji-Yeon, Mua Yu, Jin Xiangdan, et al. Efficient and stereoselective syntheses of DAB-1 and D-fagomine via chiral 1, 3-oxazine [J]. Tetrahedron, 2011(67):9426.
- [16] Hajime Yokoyama, Hiromi Ejiri, Masahiro Miyazawa, et al. Asymmetric synthesis of fagomine [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2007(18):852.
- [17] Atsushi Kato, Naoki Asano, Haruhisa Kizu, et al. calystegine alkaloids from *duboisia leichhardtii* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(2):425.

[责任编辑 顾雪竹]

**[ Abstract ] Objective:** To establish a method for the determination of both oleanolic acid and hederagenin in Yanyan granule by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD). **Method:** A HPLC-ELSD system was applied, using a Cosmosil PAQ-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column; mobile phase consisted of methanol (A) -water (B) under gradient elution; the flow rate was 0.9 mL · min<sup>-1</sup>. **Result:** As for oleanolic acid and hederagenin, the linear range was between 1.321-5.285 μg (*r* = 0.999 3) and 0.473 6-1.894 μg (*r* = 0.999 2), with average recovery rate to be 98.5% and 100.2%, respectively. **Conclusion:** The method developed is simple, rapid with reliable results, which could be applied for the determination of oleanolic acid and hederagenin in Yanyan granule.

**[ Key words ]** Yanyan granule; oleanolic acid; hederagenin; high performance liquid chromatography; evaporative light scattering detection

咽炎颗粒是由玄参、北豆根、野菊花、甘草、威灵仙等8味药材组成,具有养阴清热、润肺止咳的功效,用于治疗阴虚肺热、津液不升引起的咳嗽少痰、久嗽音哑、口干舌燥、咽喉肿痛、乳蛾喉痹等证<sup>[1]</sup>,临床疗效确切。该制剂已建立的质量分析方法包括主要药味玄参、北豆根和甘草的薄层鉴别,指标成分蒙花苷、甘草酸的含量测定等<sup>[1-2]</sup>。为进一步完善咽炎颗粒的质量标准,本文参考2010年版《中国药典》及相关文献<sup>[3-11]</sup>建立HPLC-ELSD测定咽炎颗粒中齐墩果酸和常春藤皂苷元含量的方法。

## 1 材料

Shimadzu LC-20A型高效液相色谱仪SPD-M20A二极管阵列检测器,ELSD-LT蒸发光散射检测器,CBM-20A系统控制器,CTO-20A柱温箱,新芝SB-5200DTDN型超声波清洗机,Sartorius CPA225D型电子分析天平。

齐墩果酸(批号JZ20130319A,纯度98%)、常春藤皂苷元对照品(批号JZ20130126A,纯度98%)均购自南京景竹生物科技有限公司,咽炎颗粒(无蔗糖浓缩剂,批号110427,111122,120715)及处方中各药材均由海军总医院提供。甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱Cosmosil PAQ-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温35℃,流动相甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~20 min, 80% A; 20~23 min, 80%~90% A; 23~40 min, 90% A),流速0.9 mL · min<sup>-1</sup>,进样量20 μL,设置蒸发光散射检测器的漂移管温度40℃,雾化气压力350 kPa,氮气流速2.5 L · min<sup>-1</sup>。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取对照品常春藤皂苷元11.84 mg,置25 mL量瓶中,甲醇定容;精密称取

齐墩果酸对照品33.02 mg,置25 mL量瓶中,甲醇定容。精密吸取上述常春藤皂苷元对照品溶液0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mL;齐墩果酸对照品溶液0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mL,置于10 mL量瓶中,甲醇定容,制成5个不同质量浓度的混合对照溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取装量差异项下的本品内容物,研细,精密称取4 g,加入甲醇50 mL,称定质量,超声溶解30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,过滤,取续滤液40 mL,减压浓缩至干,残渣加2 mol · L<sup>-1</sup>盐酸水溶液25 mL,加热回流2 h,加乙酸乙酯萃取3次,每次25 mL,合并乙酸乙酯萃取液,减压浓缩至干,用甲醇溶解转移并定容至10 mL。

**2.2.3 对照样品的制备** 按处方中各药味的比例,配制不含威灵仙药材的配方,按其工艺制成阴性样品,再按2.2.2供试品溶液制备方法制备,即得。同法制备威灵仙药材的对照样品。

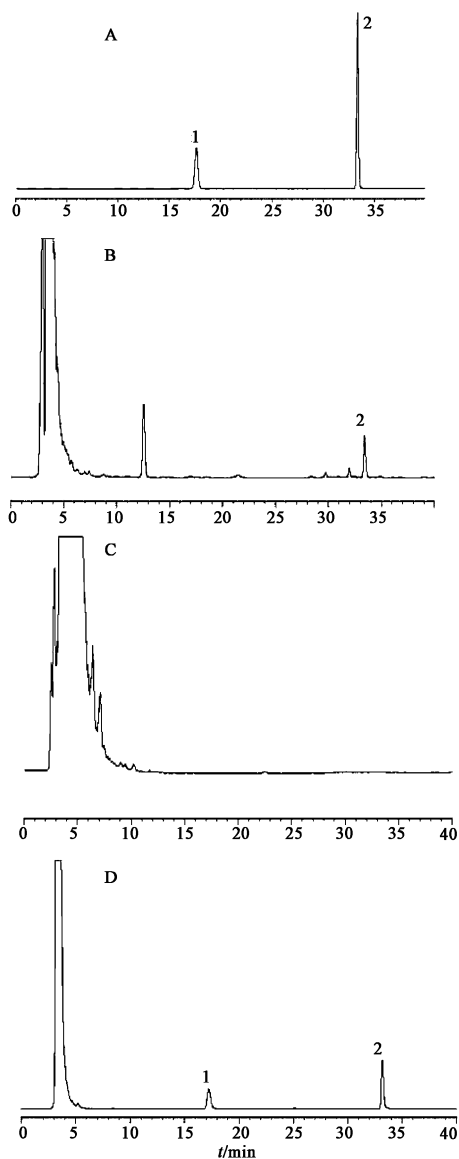
**2.2.4 其他样品溶液的制备和分析** 取装量差异项下的本品内容物,研细,精密称取4 g,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声溶解30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,过滤,取续滤液40 mL,减压浓缩至干,用甲醇溶解转移并定容至10 mL。HPLC分析同2.1项,流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~60 min, 40%~100% A),流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>,进样量20 μL。

参照咽炎颗粒制备工艺<sup>[12]</sup>,制备各单味药材样品溶液。分别取威灵仙、玄参、麦冬、桔梗、北豆根、野菊花、陈皮、甘草各单味药材粉末2 g,加10倍量水浸泡1 h后,分别加8倍于原药材的水煎煮2次,1 h/次,合并煎液,减压浓缩至干,残渣加10 mL水溶解。检测方法同上。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定

分析,在上述分析条件下,常春藤皂苷元及齐墩果酸与杂质溶液峰分离度良好,阴性样品无干扰,适用于供试品的测定,色谱图见图 1。



1. 常春藤皂苷元;2. 齐墩果酸;A. 混合对照品;  
B. 供试品;C. 阴性样品;D. 威灵仙药材

图 1 咽炎颗粒 HPLC-ELSD

**2.3.2 线性关系的考察** 分别精密吸取上述 5 个不同质量浓度的常春藤皂苷元和齐墩果酸混合对照品溶液,依次注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分对数值为纵坐标,进样量( $\mu\text{g}$ )对数值为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。常春藤皂苷元  $Y = 1.3083X + 4.8823$  ( $n = 5$ ,  $r = 0.9992$ ),线性范围  $0.4736 \sim 1.894 \mu\text{g}$ ;齐墩果酸  $Y = 1.5876X + 5.0514$  ( $n = 5$ ,  $r = 0.9993$ ),线性范围  $1.321 \sim 5.283 \mu\text{g}$ 。

**2.3.3 精密度试验** 分别精密吸取常春藤皂苷元

及齐墩果酸混合对照品溶液  $20 \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件连续进样 6 次,测量峰面积。结果峰面积的 RSD 分别为  $0.67\%$ ,  $0.52\%$ ,表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 分别精密吸取同一批号(110427)的供试品溶液,室温下放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按上述色谱条件测定分析,结果齐墩果酸峰面积积分值的 RSD ( $n = 6$ )  $0.83\%$ ,表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 取同一批次(110427)的样品,精密称取 6 份,按供试品溶液的制备方法处理,进样分析,测定齐墩果酸平均含量  $0.3214 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD  $0.87\%$ ,表明重复性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取已知含量的同一批(批号 110427)样品共 6 份,每份约 2 g,分别精确加入含  $0.1321 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  齐墩果酸以及  $0.04736 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  常春藤皂苷元的混合对照品溶液  $5 \text{ mL}$ ,按样品溶液的制备方法操作,测定其含量,并计算回收率,结果见表 1。

表 1 齐墩果酸及常春藤皂苷元的加样回收率 ( $n = 6$ )

名称	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
齐墩果酸	0.6415	0.6605	1.295	98.94	98.5	1.4
	0.6286	0.6605	1.291	100.3		
	0.6458	0.6605	1.304	99.65		
	0.6352	0.6605	1.283	98.08		
	0.6414	0.6605	1.278	96.38		
	0.6437	0.6605	1.289	97.70		
常春藤 皂苷元	-	0.2368	0.2408	101.7	100.2	1.9
	-	0.2368	0.2386	100.8		
	-	0.2368	0.2312	97.64		
	-	0.2368	0.2359	99.62		
	-	0.2368	0.2339	98.78		
	-	0.2368	0.2437	102.9		

**2.3.7 样品测定** 取本品 3 批,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,每个批号平行制备 2 份,精密吸取齐墩果酸、常春藤皂苷元混合对照品溶液和供试品溶液各  $20 \mu\text{L}$ ,依 2.1 项下色谱条件测定含量,结果 3 批样品含量 (RSD) 依次为  $0.3214 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  ( $0.91\%$ ),  $0.3189 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  ( $0.78\%$ ),  $0.3167 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  ( $0.94\%$ )。

### 3 讨论

**3.1 指标成分和分析方法的选择** 咽炎颗粒中除

了蒙花苷外,还有 3 个主要成分;经与各单味药材对照,归属为威灵仙中成分,但二者保留时间不完全一致,这可能与药材来源、制备工艺等因素有关<sup>[4,10]</sup>。因此参考 2010 年版《中国药典》及相关文献中威灵仙药材含量分析方法<sup>[3-11]</sup>,将样品完全酸水解后定量分析常春藤皂苷元和齐墩果酸总含量;同时考虑到本品中组分复杂、紫外末端吸收(205 nm)检测有干扰、难以达到基线分离,因而选用 ELSD 检测器进行分析。结果表明,阴性样品无干扰,方法可行,从而建立咽炎颗粒中该类成分定量分析方法。齐墩果酸和常春藤皂苷元在女贞子、木通、败酱等<sup>[13-15]</sup>多种药材中较为常见,本方法也可为其他药材中该类成分的分析提供参考。

**3.2 含量测定结果** 目前东北铁线莲为市场主流药材,文献报道该药材中齐墩果酸含量 >0.30%,但常春藤皂苷元含量极微,在 0.02% ~ 0.06%<sup>[4,10]</sup>。本实验咽炎颗粒样品中未检出常春藤皂苷元,而在威灵仙药材中检出 2 种成分,推测与该制剂采用的威灵仙药材种类有关。研究结果提示,为保证本制剂疗效的一致性,应在进一步研究基础上,选用固定品种的威灵仙等药材。

#### [参考文献]

[1] 张沂,凌云,蔡清宇,等. 浓缩型咽炎颗粒(无糖型)质量标准研究[J]. 中国药房,2009,20(6):438.  
[2] 鲍燕燕,凌云,梁爱君. 高效液相色谱法测定咽炎颗粒中甘草酸的含量[J]. 解放军药学报,2001,17(4):222.  
[3] 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,2010:234.  
[4] 毕丹,高明菊,徐畅,等.《中国药典》2010 年版威灵仙不同品种常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量探讨[J]. 中国药品标准,2012,13(1):19.

[5] 谢乐,马晓黎,刘丽芳,等. HPLC 测定不同产地威灵仙中齐墩果酸的含量[J]. 中成药,2009,31(1):100.  
[6] 金晨,翟兴英,李翔,等. 东北铁线莲中抗肿瘤活性成分的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):33.  
[7] 齐帅,胡华. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定威灵仙药材中齐墩果酸和常春藤皂苷元的含量[J]. 广东药学院学报,2010,26(1):67.  
[8] 钟保恒,郭敏,蓝晓玉. HPLC-ELSD 测定威灵仙中齐墩果酸的含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(6):494.  
[9] 关颖丽,杨荣艳,张海峰. HPLC 法测定棉团铁线莲中齐墩果酸的含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(2):768.  
[10] Sun Feng, Cai zheng, Yang De-po, et al. Determination of triterpenoid saponins in Radix Clematidis and related Clematis species by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese J Anal Chem,2010,38(9):1293.  
[11] 李丽莉,吴桂凡,白桂昌. HPLC 法测定消石片中常春藤皂苷元及齐墩果酸的含量[J]. 中国药师,2011,14(3):386.  
[12] 张沂,凌云,王强,无糖型咽炎颗粒成型工艺的研究[J]. 解放军药学报,2010,26(2):123.  
[13] 张丽,陈汀,曹雨诞,等. 女贞子不同炮制品及不同树龄中齐墩果酸和熊果酸含量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):46.  
[14] 刘一兵,罗晋萍,张静静. 蒸发光散射-高效液相色谱法测定三叶木通中齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):38.  
[15] 毛红梅,平欲晖,宗星星,等. HPLC 同时测定败酱草中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):89.

[责任编辑 顾雪竹]