

HPLC 同时测定清肺抑火丸中 3 个苷类成分

陈峻*, 徐华, 陈小轩

(河南省罗山县人民医院, 河南 罗山 464200)

[摘要] 目的: 建立清肺抑火丸中 3 个苷类成分的含量标准。方法: 采用 HPLC, 同时以 2 个检测波长对清肺抑火丸中的黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷进行定量分析。Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇(A)-1% 甲酸溶液(B)-乙腈(C)梯度洗脱, 检测波长 238, 278 nm。结果: 黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷分别在 0.165 ~ 1.650, 0.106 ~ 1.060, 0.035 ~ 0.350 μg ($r > 0.999 7$) 线性关系良好, 平均回收率 > 96.75%, RSD < 2.05%。结论: 该方法同时进行黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷的定量分析, 可作为清肺抑火丸的质量控制标准。

[关键词] 清肺抑火丸; 黄芩苷; 京尼平苷; 京尼平龙胆二糖苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0134-03

[doi] 10.11653/syfy2013130134

Simultaneous Determination of Three Chemical Constituents in Qingfei Yihuo Pills by HPLC

CHEN Jun*, XU Hua, CHEN Xiao-xuan

(People's Hospital of Henan Luoshan, Luoshan 464200, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of three constituents in Qingfei Yihuo Pills. **Method:** Baicalin, geniposide and genipin-1-*O*-β-gentiobioside were determined simultaneously by HPLC on a agilent Zorbax SB-C₁₈ column with the methanol (A) -1.0% formic acid anhydrous (B) -acetonitrile (C) in gradient elution as the mobile phrase. The detection wavelength was set at 238, 440 nm and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. **Result:** The standard curves for baicalin, geniposide and genipin-1-*O*-β-gentiobioside were linear within the range of 0.165-1.650, 0.106-1.060, 0.035-0.350 μg ($r > 0.999 7$), and the average recoveries were over 96.75% (RSD < 2.05%). **Conclusion:** The method is simple and accurate and could be used for quality control of Qingfei Yihuo Pills.

[Key words] Qingfei Yihuo Pills; Baicalin; geniposide; genipin-1-*O*-β-gentiobioside; content determination

清肺抑火丸为治疗咳嗽类复方中药, 来源于《寿世保元》, 现收载于《中国药典》2010 年版一部^[1], 由黄芩、栀子、知母、浙贝母、黄柏、苦参、桔梗、前胡、天花粉、大黄等 10 味中药组成, 方中黄芩、栀子、黄柏、苦参可清泄三焦之热, 用于肺胃实热的咳嗽, 与知母、浙贝母、苦参、天花粉等药同用, 清热养阴力盛, 对于痰热互结、伤及肺阴的咳嗽有良好的治疗作用; 清肺抑火丸所治之咽喉肿痛, 证属肺胃实热, 常

伴有口干、便秘等热邪伤阴之见症, 治疗上清肺泻火与通便泄热相结合, 通过泻热而养阴, 重在清热^[2]; 佐以前胡辛苦微寒, 清肺下气, 又能疏散风热以宣降肺气, 桔梗开宣肺气, 扬声利咽, 大黄泻腑火, 通热结, 引肺火从大肠而去。现代药理研究表明黄芩、大黄、苦参等具有抗菌、抗炎作用; 桔梗有祛痰、镇咳作用; 大黄能提高毛细血管致密性, 促进血凝, 具有止血作用。诸药合用, 具有清肺止咳、化痰通便的作用, 用于肺热咳嗽、痰黄黏稠、口干咽痛、大便干燥等症^[1]。

清肺抑火丸的质量标准中除了黄芩苷、栀子苷、盐酸小檗碱、苦参碱和大黄对照药材的薄层检识外, 仅规定了黄芩苷的含量标准, 不能全面有效控制清

[收稿日期] 20130128(014)

[通讯作者] * 陈峻, 主管药师, 从事医院药理学工作, Tel: 0376-2196330

肺抑火丸产品的质量。黄芩、栀子为该方中主要组方药物,以京尼平苷为代表的多种环烯醚萜苷类成分为栀子的主要有效成分,其中京尼平龙胆二糖苷的含量仅次于京尼平苷^[3-4]。文献已报道了^[5-10]分别以栀子苷、前胡甲素、盐酸小檗碱、大黄蒽醌苷元等成分为指标的含量测定方法,目前还未见京尼平龙胆二糖苷在中药成方剂中的含量研究报道。本文在清肺抑火丸质量标准的基础上,采用 HPLC,建立了以 2 个检测波长同时测定黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷的质控方法,为控制清肺抑火丸的质量标准提供依据,同时为建立京尼平龙胆二糖苷在其他含栀子成方制剂中的质量标准奠定基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 series,包括四元泵(QuataPump),自动进样器(ALS),DAD 检测器,在线脱气机(Degasser)和柱温箱。水为重蒸馏水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

对照品黄芩苷(批号 110715-201016)、京尼平苷(批号 110749-200512)购于中国食品药品检定研究院,京尼平龙胆二糖苷(四川省维克奇生物科技有限公司),纯度均 > 98%。清肺抑火丸,保定中药制药有限公司(批号 120101,120103,120105,6 g/袋)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-1%甲酸溶液(B)-乙腈(C)梯度洗脱(0 min, 15% A-85% B; 20 min, 47% A-53% B; 36 ~ 50 min, 27% A-53% B-20% C)。检测波长 238 nm, 278 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C。

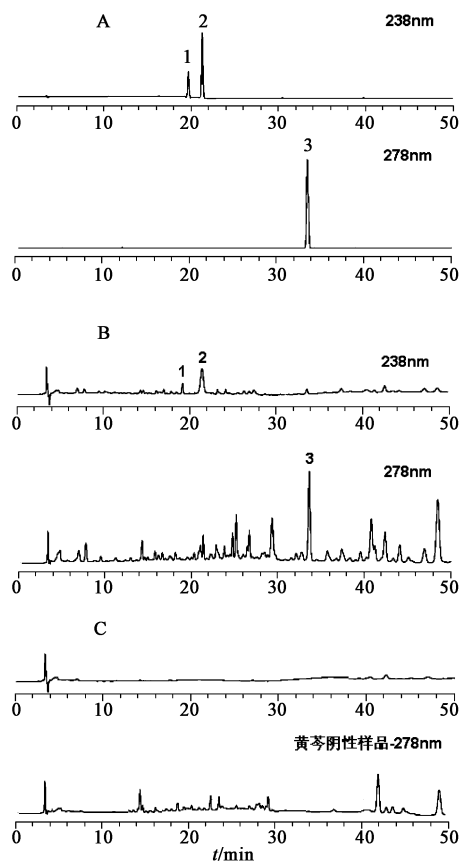
2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷对照品各适量,分别加 50% 甲醇制成 0.165, 0.106, 0.035 g · L⁻¹ 的溶液,过微孔滤膜(0.45 μm),备用。

2.3 样品溶液的制备 取本品适量,研细,过 40 目筛,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,过微孔滤膜(0.45 μm),即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例制备不含黄芩、栀子的样品,按供试品溶液的制备方法分别制备成黄芩、栀子的阴性对照溶液。

2.5 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,

按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。结果在该色谱条件下,清肺抑火丸中黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷等 3 个对照品在各自检测波长下,分别与其他组分均能达到基线分离,阴性样品在对照品相应位置处无吸收峰(图 1)。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照;

1. 京尼平龙胆二糖苷; 2. 京尼平苷; 3. 黄芩苷

图 1 清肺抑火丸 HPLC 色谱

2.6 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液,按色谱分析条件分别进样 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,并计算回归方程,黄芩苷 $Y = 518.26X - 22.077$ ($r = 0.9999$); 京尼平苷 $Y = 387.612X - 26.451$ ($r = 0.9997$); 京尼平龙胆二糖苷 $Y = 37.622X - 2.421$ ($r = 0.9999$); 表明黄芩苷在 0.165 ~ 1.650 μg、京尼平苷在 0.106 ~ 1.06 μg、京尼平龙胆二糖苷在 0.035 ~ 0.350 μg 线性关系良好。

2.7 精密度和稳定性试验 精密吸取同一样品溶液 10 μL,重复进样 6 次,依法测定分析,结果黄芩苷等 3 个对照品峰面积的 RSD 均 < 1.0%。另精密吸取同一样品溶液于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h, 分别进样 10 μL, 结果黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.08%, 0.95%, 1.23%, 说明样

品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性和加样回收试验 取同一批号清肺抑火丸样品适量,研细,按上述方法制备成样品溶液,依法测定并计算含量,结果各对照品 6 次测定值的 RSD 均 < 2.00%。

取已知含量同一批号清肺抑火丸适量,研细,精密称定,共 10 份,分别精密加入黄芩苷等 3 个对照品各适量,依法测定,结果 3 个对照品 5 次测定的平均回收率均分别为 97.66%,98.36%,96.75%,RSD 分别为 1.86%,1.56%,2.05% (表 1)。

表 1 清肺抑火丸中 3 种成分加样回收试验

对照品	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
黄芩苷	1.372 5	1.300 0	2.667 7	99.63	97.66	1.86
	1.384 1	1.300 0	2.674 6	99.27		
	1.391 3	1.300 0	2.643 6	96.33		
	1.358 2	1.300 0	2.650 9	99.44		
	1.378 1	1.300 0	2.617 3	95.33		
	1.378 6	1.300 0	2.626 1	95.96		
京尼平苷	0.214 2	0.202 5	0.408 5	95.94	98.36	1.56
	0.216 0	0.202 5	0.417 1	99.29		
	0.217 2	0.202 5	0.419 1	99.73		
	0.212 0	0.202 5	0.407 5	96.55		
	0.215 1	0.202 5	0.415 3	98.87		
京尼平龙胆二糖苷	0.089 7	0.085 0	0.170 6	95.20	96.75	2.05
	0.090 4	0.085 0	0.175 0	99.49		
	0.090 9	0.085 0	0.175 6	99.65		
	0.088 7	0.085 0	0.169 7	95.25		
	0.090 0	0.085 0	0.171 4	95.72		
	0.090 1	0.085 0	0.171 0	95.21		

2.9 样品测定 取不同批号的清肺抑火丸,依法制备成样品溶液,分别精密吸取对照品溶液和样品溶液各 10 μ L,依照上述色谱条件测定峰面积,按外标法定量计算,结果见表 2。

表 2 清肺抑火丸中 3 种成分含量测定 ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	黄芩苷	京尼平苷	京尼平龙胆二糖苷	总量
20120806	5.51	0.86	0.36	6.73
20120808	5.35	0.83	0.41	6.59
20120810	5.38	0.78	0.35	6.51
平均	5.41	0.82	0.37	6.61

3 讨论

清肺抑火丸用于治疗肺热炽盛引起的咳嗽,咽痛,衄血等病症,为临床常用的复方中药。本文建立

了同时测定黄芩苷、京尼平苷以及京尼平龙胆二糖苷的含量测定方法,其中京尼平龙胆二糖苷为首次检测分析。样品制备经甲醇、乙醇、50% 甲醇等提取溶剂,超声、回流提取、冷浸等提取方法的对比研究,确定以 50% 甲醇超声提取 30 min 最佳。色谱分离条件选择了甲醇-水、乙腈-甲酸水等梯度洗脱的方法,结果以甲醇-1.0% 甲酸水-乙腈梯度洗脱,样品分离较佳。黄芩苷的最大吸收波长为 278 nm,京尼平苷以及京尼平龙胆二糖苷的最大吸收为 238 nm,故选择了 2 个检测波长。经方法学考察,结果表明该方法灵敏可靠、重复性好,可用于清肺抑火丸的含量测定。

经检测分析,3 批样品中黄芩苷、京尼平苷、京尼平龙胆二糖苷平均含量为 5.41,0.82,0.37 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,3 种成分总量达 6.61 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。本文对黄芩苷等 3 个成分同时检测,为提升清肺抑火丸的质量标准提供了实验依据;对京尼平龙胆二糖苷的定量研究为其他含梔子类中药成方制剂,建立多成分定量的质量控制方法提供了有益的参考。

[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:中国中医药科技出版社,2010:1116.
- [2] 陈锐. 清肺抑火丸临床应用解析[J]. 中国社区医师, 2012,28(12):14.
- [3] 张村,肖永庆,李丽,等. 梔子不同饮片环烯醚萜苷类成分比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10):1138.
- [4] 张村,肖永庆,李丽,等. 梔子果实不同部位中环烯醚萜苷类成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2009,34(15):1949.
- [5] 马先陆. 高效液相色谱法测定清肺抑火丸中梔子苷的含量[J]. 医药导报,2009,28(6):124.
- [6] 黄瑞红,杨慧文. RP-HPLC 法测定清肺抑火丸中白花前胡甲素的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(27):2556.
- [7] 叶秀金,宋粉云. HPLC 测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):90.
- [8] 叶秀金,宋粉云. HPLC 法测定清肺抑火丸中大黄的四种成分的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2010, (6):646.
- [9] 叶秀金,宋粉云. HPLC 法测定清肺抑火丸中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(12):1127.
- [10] 陈玉林,赖坤桦,邓增潮. HPLC-ELSD 法测定清肺抑火丸中贝母素甲、贝母素乙的含量[J]. 中国医药指南, 2012,10(19):115.

[责任编辑 顾雪竹]