

HPLC-DAD 同时测定心通口服液中 4 种成分

孙媛^{1*}, 李继美², 左石²

(1. 南京医科大学附属淮安第一医院, 江苏 淮安 223300;

2. 淮安市第二人民医院, 江苏 淮安 223303; 3. 淮安市第三人民医院, 江苏 淮安 223304)

[摘要] 目的: 建立同时测定心通口服液中葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷及淫羊藿苷含量的方法。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 λ₁ = 250 nm(检测葛根素), λ₂ = 260 nm(检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷), λ₃ = 283 nm(检测柚皮苷), λ₄ = 270 nm(检测淫羊藿苷)。结果: 葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷及淫羊藿苷的线性范围分别为 0.441 ~ 11.0, 0.031 2 ~ 0.780, 0.186 ~ 4.66, 0.134 ~ 3.47 μg, 平均加样回收率分别为 98.53%, 98.03%, 98.64%, 99.16%。结论: 方法操作简便, 快速, 重复性好, 可作为该产品质量控制的方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 心通口服液; 葛根素; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 柚皮苷; 淫羊藿苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0133-04

[doi] 10.11653/syfy2013110133

Simultaneous Determination of Four Components in Xintong Oral Liquid by HPLC-DAD

SUN Yuan^{1*}, LI Ji-mei², ZUO Shi³

(1. Huaian First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Huaian 223300, China;

2. Huaian Second People's Hospital Pharmacy Department, Huaian 223303, China;

3. Huaian Third People's Hospital Pharmacy Department, Huaian 223304, China)

[收稿日期] 20121226(670)

[通讯作者] * 孙媛, 主管药师, 从事临床药学服务, Tel: 13852306633, E-mail: sunyuan6622@163.com

从 3 批次柴银口服液中葛根素含量的测定结果, 可以看出不同批次的葛根素含量较为一致, 将其作为柴银口服液质量控制与评价的指标之一, 具有较强的专属性, 能够有效保证柴银口服液的一致性和稳定性。

[参考文献]

- [1] 蔡清宇, 唐慧慧, 康琛, 等. HPLC 测定柴银口服液中连翘苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 94.
- [2] 唐慧慧, 蔡清宇. 高效液相色谱法测定柴银口服液中绿原酸含量[J]. 解放军药学学报, 2011, 27(5): 442.
- [3] 马桂华, 王瑞成, 徐桂花. HPLC 测定柴银口服液中黄芩苷含量[J]. 山东医药工业, 2001, 20(5): 9.
- [4] 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: 312.

- [5] 黄樱华, 黄月纯, 王祝彬, 等. 葛根骨康宁颗粒中葛根素的含量测定研究[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 186.
- [6] 牛晓静, 施钧瀚. HPLC 同时测定安渴胶囊中马钱苷和葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 90.
- [7] 范云飞, 梁爱君, 贾永慧, 等. 冠舒滴丸中葛根素的含量测定[J]. 解放军药学学报, 2012, 28(2): 159.
- [8] 李雪晴, 文爱东. HPLC 测定康尔肤胶囊中葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 137.
- [9] 温金莲, 郭丽冰, 周清, 等. 保济丸中葛根素的含量测定及灭菌方法评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 1.
- [10] 蔡绍东, 吴小红. HPLC 法同时测定三多丸中葛根素和芒柄花素含量[J]. 中药材, 2011, 34(8): 1298.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To establish a method for simultaneously determining puerarin, calycosin-7-*O*-*D*-glycoside, naringin and icariin in Xintong oral liquid by HPLC-DAD. **Method:** HPLC was performed on Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and water at a flow rate of 1 mL · min⁻¹. The column temperature was set at 30 °C. **Result:** Quantitative analysis of HPLC showed that the linear ranges of puerarin, calycosin-7-*O*-*D*-glycoside, naringin and icariin were 0.441-11.0, 0.031 2-0.780, 0.186-4.66, 0.134-3.47 μg respectively. The average recovery was 98.53%, 98.03%, 98.64% and 99.16%. **Conclusion:** The method set up is easy and rapid, therefore available for the quality control of Xintong oral liquid. **[Key words]** HPLC; Xintong oral liquid; puerarin; calycosin-7-*O*-*D*-glycoside; naringin; icariin

心通口服液由黄芪、党参、麦冬、何首乌、淫羊藿、葛根、当归、丹参、皂角刺、海藻、昆布、牡蛎、枳实等 13 味中药经提取加工而成,具有益气活血,化痰通络等功效,用于气阴两虚、痰瘀痹阻所致的胸痹以及冠心病等的治疗^[1]。心通口服液为《中国药典》一部收录的中成药,含量测定项下仅以葛根素作为质控指标,对于含 13 味中药的复方制剂,略显不足,为更快速全面的评价其质量,本实验建立了同时测定心通口服液中上述 4 种成分的方法。

1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括 G1312A 型二元梯度泵、G1322A 型在线脱气机、G1329A 型自动进样器、G1316A 型柱温箱、G1315B 型 DAD 检测器、Chemstation 色谱工作站,Sartorius BS110S 分析天平,超声清洗器(北京医疗设备二厂)。

心通口服液(鲁南厚普制药有限公司,批号分别为 10042040,10042041,10042042);对照品葛根素(批号 110752-200511)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201001)、柚皮苷(批号 110722-200610)、淫羊藿苷(批号 110737-200415)均购自中国药品生物制品检定所(供含量测定用),乙腈为色谱纯(SIGAM),甲醇为分析纯(天津四友精细化学品有限公司),水为重蒸水(自制);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2-6] Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 相为乙腈,B 相为水,梯度洗脱(0 ~ 10 min, 87% B; 10 ~ 11 min, 87% ~ 80% B; 11 ~ 20 min, 80% B; 20 ~ 21 min, 80% ~ 70% B; 21 ~ 30 min, 70% B),检测波长 0 ~ 10 min, 250 nm(葛根素),10 ~ 15 min, 260 nm(毛蕊异黄酮葡萄糖苷),15 ~ 20 min, 283 nm(柚皮苷),20 ~ 30 min, 270 nm(淫羊藿苷),流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取葛根素、毛蕊异

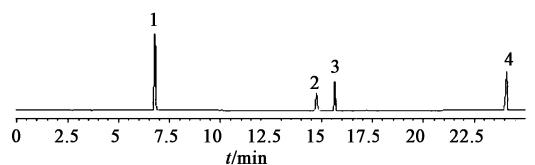
黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷对照品适量,加甲醇溶解制成每 1 mL 分别含葛根素 441 μg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 31.2 μg、柚皮苷 186 μg、淫羊藿苷 134 μg 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备^[7] 精密量取心通口服液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,静置,取上清液过 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 按照本制剂处方比例,分别制备不含葛根、黄芪、枳实、淫羊藿的阴性制剂,按照 2.3 项下方法制备阴性供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 1 ~ 6。理论板数按葛根素色谱峰计不低于 3 000,与相邻峰的分度度均 > 1.5,阴性供试品溶液在相应对照品出峰位置上无干扰。



1. 葛根素; 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷;
3. 柚皮苷; 4. 淫羊藿苷(图 2 ~ 5 同)

图 1 混合对照品 HPLC 色谱

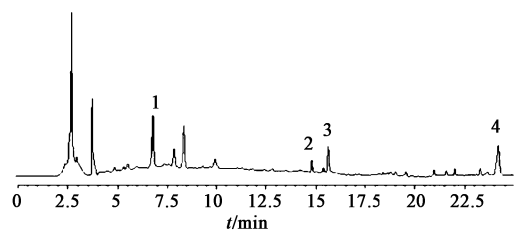


图 2 供试品 HPLC 色谱

2.5.2 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液,分别进样 1, 5, 10, 15, 20 和 25 μL,进行测定。以峰面积(Y)对进样量(μg)进行线性回归,得葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷

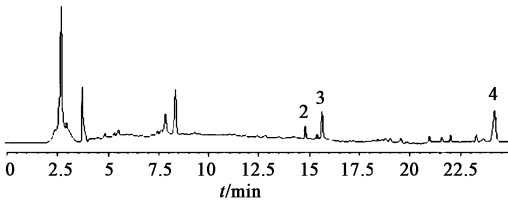


图3 葛根素阴性 HPLC 色谱

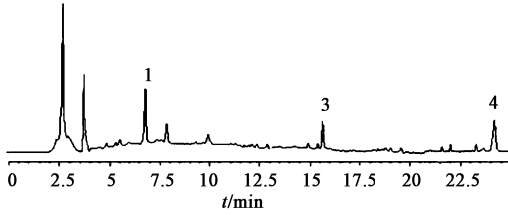


图4 毛蕊异黄酮葡萄糖苷阴性 HPLC 色谱

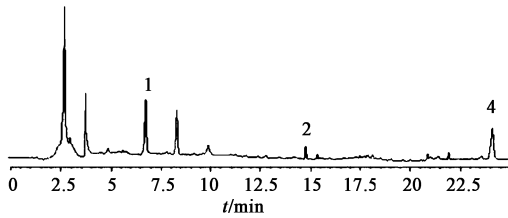


图5 柚皮苷阴性 HPLC 色谱

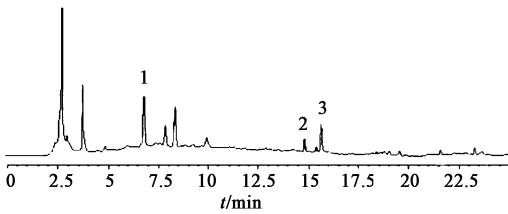


图6 淫羊藿苷阴性 HPLC 色谱

的回归方程分别为 $Y = 5.14 \times 10^6 X + 2.43 \times 10^4$ ($r = 0.9994$), $Y = 3.12 \times 10^6 X + 2.73 \times 10^4$ ($r = 0.9994$), $Y = 3.52 \times 10^6 X + 2.04 \times 10^4$ ($r = 0.9993$), $Y = 2.94 \times 10^6 X + 2.04 \times 10^4$ ($r = 0.9996$)。葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷分别在 0.441 ~ 11.0, 0.031 2 ~ 0.780, 0.186 ~ 4.66, 0.134 ~ 3.47 μg 线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件重复测定 5 次,记录峰面积,计算葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷峰面积的 RSD,结果分别为 1.0%, 1.6%, 1.2%, 1.4%, 结果表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批心通口服液(批号 10042042),按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行 5 份,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷含量的 RSD,结果分别为 1.9%, 2.3%, 2.1%, 2.1%, 表明该方法重复性较好。

2.5.5 稳定性试验 精密吸取上述供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别在供试品溶液制备后 0, 2, 4, 8, 12 h 进样,测定峰面积。计算葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷的峰面积的 RSD,结果分别为 0.92%, 1.1%, 1.3%, 1.2%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定,可满足含量测定要求。

2.5.6 加样回收率试验 取已知含量的心通口服液(批号 10042042),精密量取 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,按样品含量-对照品量大致 1:1 的比例分别精密加入混合对照品溶液(葛根素 0.415 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.030 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柚皮苷 0.184 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、淫羊藿苷 0.135 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)5 mL,用甲醇定容至刻度,其余按 2.3 项下方法制得供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 4 种成分加样回收率试验

成分	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
葛根素	2.205	2.076	4.259	98.94	96.53	0.97
	2.205	2.076	4.255	98.75		
	2.205	2.076	4.261	99.04		
	2.205	2.076	4.213	96.72		
	2.205	2.076	4.246	98.31		
	2.205	2.076	4.269	99.42		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.155	0.152	0.301	96.05	96.03	1.59
	0.155	0.152	0.303	97.37		
	0.155	0.152	0.307	100.00		
	0.155	0.152	0.306	99.34		
	0.155	0.152	0.302	96.71		
	0.155	0.152	0.305	98.68		
柚皮苷	0.93	0.921	1.835	98.26	98.64	1.72
	0.93	0.921	1.865	101.52		
	0.93	0.921	1.818	96.42		
	0.93	0.921	1.835	98.26		
	0.93	0.921	1.833	98.05		
	0.93	0.921	1.845	99.35		
淫羊藿苷	0.67	0.677	1.361	102.07	99.16	2.30
	0.67	0.677	1.329	97.34		
	0.67	0.677	1.324	96.60		
	0.67	0.677	1.333	97.93		
	0.67	0.677	1.343	99.41		
	0.67	0.677	1.358	101.62		

2.6 含量测定 取 3 个批号的样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱峰面积,按外标法计算各成分的含量,结果见表 2。

表 2 心通口服液中 4 种成分样品测定 (n=3) g·L⁻¹

批号	葛根素	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	柚皮苷	淫羊藿苷
10042040	4.4	0.32	1.8	1.3
10042041	4.6	0.35	2.0	1.4
10042042	4.4	0.31	1.9	1.3

3 讨论

方中主药之一黄芪可测成分有黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷,黄芪甲苷只在紫外末端有吸收,不适合用 UV 检测,常规用 ELSD 检测^[8],而毛蕊异黄酮葡萄糖苷在紫外区有最大吸收,因此选择测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷控制制剂中黄芪的含量。另外,测定了葛根素、柚皮苷和淫羊藿苷分别控制葛根、枳实和淫羊藿的含量。4 种成分的同时测定能更全面的控制中心通口服液的质量,所建立的方法简便,快速,重复性好。

葛根素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷的紫外最大吸收波长分别为 250^[9], 260^[10], 283^[11], 270 nm^[12],为保证检测的准确性和灵敏度,本实验采用 DAD 检测器,从而实现了在各成分的最大吸收波长处进行检测^[13]。若实验条件有限,也可在 265 nm 单一波长处检测各成分。

对比了乙腈-水和乙腈-酸水流动相系统对 4 种成分分离效果的影响,结果发现 2 种流动相系统下色谱峰的形状和分离度相差不大,考虑到酸性条件会缩短色谱柱的使用寿命,最终选择水-乙腈系统为流动相。

[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,2010:608.

[2] 阳巧凤,彭六保,李健和,等. HPLC-DAD同时测定肾复舒颗粒中大黄酚、甘草苷和柚皮苷的含量[J]. 中国药学杂志,2011,46(16):1283.

[3] 韩丽萍,陈行愉,邓伟民. HPLC法同时测定补肾壮骨颗粒中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J]. 中成药,2011,33(1):184.

[4] 姚雪莲,裴彩云,王宗权. 不同产地、不同采收期黄芪药材及饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素含量测定[J]. 药物分析杂志,2012,32(5):797.

[5] 温金莲,郭丽冰,周清,等. 保济丸中葛根素的含量测定及灭菌方法评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):1.

[6] 李春来,李伟东,吴育,等. HPLC同时测定白虎汤中4种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):78.

[7] 涂文升,黄其春. HPLC测定心通口服液中柚皮苷的含量[J]. 中国药师,2009,12(12):1840.

[8] 唐斌,杨扬,尚北城,等. 黄芪制剂中黄芪甲苷测定方法概述[J]. 西南国防医药,2004,14(2):175.

[9] 闫春风,徐晓伟,李君,等. HPLC测定柴芩软胶囊中葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):98.

[10] 陈平,莫炫永. 高效液相色谱法测定翁沥通胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量[J]. 中国药业,2012,21(15):41.

[11] 冯乾坤,贾天宝,王沛,等. HPLC测定壮骨缓释微丸中的柚皮苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):92.

[12] 李晓龙,刘虹宇,曹佩雪,等. HPLC同时测定21种淫羊藿中朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):931.

[13] 尚晓娜,宋平顺,李士博,等. 板蓝根中3种核苷成分的多波长 HPLC测定及主成分分析[J]. 中成药,2012,34(9):1752.

[责任编辑 顾雪竹]