

HPLC 测定增液承气口服液中哈巴昔和哈巴俄昔含量

魏庆华¹, 王勤^{2*}

- (1. 甘肃省张掖医学高等专科学校, 甘肃 张掖 734000;
2. 甘肃省张掖市食品药品检验所, 甘肃 张掖 734000)

[摘要] 目的: 建立增液承气口服液中哈巴昔和哈巴俄昔的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Eclipse XDB C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.03% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 哈巴昔和哈巴俄昔进样量分别在 0.257 ~ 1.284 μg ($r = 0.999\ 8$), 0.092 ~ 0.460 μg ($r = 1.000\ 0$) 时, 与峰面积值具有良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 98.74% (RSD 0.58%), 97.15% (RSD 1.02%)。结论: 样品处理简便、结果准确、重复性好, 可用于增液承气口服液内在质量的控制方法。

[关键词] 高效液相色谱; 增液承气口服液; 哈巴昔; 哈巴俄昔

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0081-03

Determination of Harpagide and Harpagoside in Zengye Chengqi Koufuye by HPLC

WEI Qing-hua¹, WANG Qin^{2*}

- (1. Zhangye Medical College, Zhangye 734000, China;
2. Zhangye Institute for Food and Drug Control, Zhangye 734000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a high performance liquid chromatographic method for the determination of harpagide and harpagoside in Zengye Chengqi Koufuye. **Method:** High performance liquid chromatography was performed on an Eclipse XDB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.03% phosphoric acid with a gradient elution program as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, 210 nm as the detection wavelength, the temperature of column was at 30 °C. **Result:** harpagide and harpagoside showed good relationship at the range of 0.257-1.284 μg ($r = 0.999\ 8$, for harpagide), 0.092-0.460 μg ($r = 1.000\ 0$, for harpagoside), the average recoveries ($n = 5$) were: 98.74% (RSD 0.58%), 97.15% (RSD 1.02%). **Conclusion:** The results showed that the method is simple, accurate stable, and repeatable and it is suitable for quality control of Zengye Chengqi Koufuye.

[Key words] high performance liquid chromatography; Zengye Chengqi Koufuye; harpagide; harpagoside;

增液承气口服液为增液承气汤的基础上创制而成, 由玄参、地黄、麦冬、大黄 4 味中药材组成。增液承气汤出自清代医家吴鞠通《温病条辨·中焦篇》^[1], 具有甘凉濡润、滋阴增液、软坚降泄、通腑泄

热之功效, 用于治疗温病阳明腑实兼阴液亏损之症^[2], 自清代以来一直沿用至今。临床上主要用于治疗中老年习惯性便秘^[3]、阴虚肠燥便秘证^[4]、慢性呼吸衰竭^[5]、慢性支气管炎急性发作^[6]、流行性出血热少尿期^[7]等症, 疗效确切。玄参为方中君药, 具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的作用, 与增液承气汤功效一致^[8]。为便于患者服用和携带方便, 作者将其研制开发为增液承气口服液, 并用 HPLC 对君药玄参中的主要活性成分哈巴昔和哈巴俄昔进行测定, 从而达到控制其内在质量的目的。

[收稿日期] 20110417(001)

[第一作者] 魏庆华, 本科, 副教授, 从事生药学及天然药物有效成分研究, Tel: 13209366916

[通讯作者] * 王勤, 硕士, 主任药师, 从事药品质量标准及天然药物提取分离, Tel: 13209360206, E-mail: wangqin690529@yahoo.com.cn

1 材料

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元泵, G1315A DAD 检测器, G1316A 柱温箱, Agilent1100 化学工作站(美国 Agilent 公司); Metler-D2025 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), AS3120A 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试药 哈巴昔对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110729-200603), 哈巴俄昔对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110730-200605, 置五氧化二磷干燥器中干燥 12 h 以上使用), 乙腈(色谱纯, 山东禹王实业有限责任公司), 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯, 增液承气口服液样品(甘肃省张掖市人民医院, 批号 20100302, 20100701, 20100902, 20100903, 20101101)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Eclipse XDB C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 以 0.03% 磷酸溶液为流动相 B, 按表 1 中的规定进行梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 理论板数按哈巴俄昔与哈巴昔峰计算均应不低于 5 000; 外标法定量。

表 1 流动相梯度洗脱程序

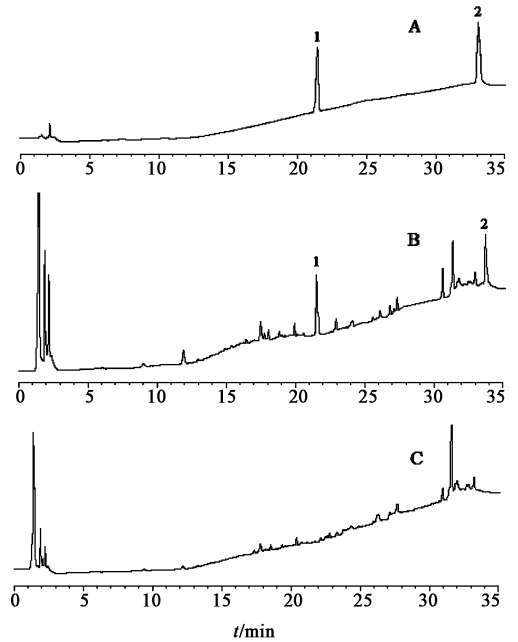
t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	3~10	97~90
10~20	10~33	90~67
20~25	33~50	67~50
25~30	50~80	50~20
30~35	80	20
35~37	80~3	20~97

2.2 对照品溶液的制备^[8] 分别精密称取哈巴昔对照品 6.42 mg、哈巴俄昔对照品 2.30 mg 于 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别制成每 1 mL 含哈巴昔 64.2 μg, 哈巴俄昔 23.0 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 2 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 用 50% 甲醇溶解, 并转移至 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按处方制备工艺制成缺玄参的阴性供试品, 按供试品溶液的制备方法项下方法制得阴性对照溶液。

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。结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上有相同保留时间(哈巴俄昔 33.06 min、哈巴昔 21.51 min)的色谱峰, 阴性试验无干扰, 证明本方法可行, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 哈巴俄昔; 2. 哈巴昔

图 1 增液承气口服液 HPLC 色谱图

2.6 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0 μL, 按上述色谱条件, 分别进样, 测定。以对照品进样量(μg)为横坐标, 以峰面积积分为纵坐标进行线性回归, 得哈巴昔回归方程 $Y = 1\ 869.53X - 95.10 (r = 0.999\ 8)$; 哈巴俄昔回归方程 $Y = 1\ 161.30X - 0.25 (r = 1.000\ 0)$; 结果表明哈巴昔、哈巴俄昔对照品进样量分别在 0.257 ~ 1.284, 0.092 ~ 0.460 μg 时, 与峰面积值具有良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 在确定的色谱条件下连续进样 6 次, 哈巴昔、哈巴俄昔对照品峰面积的 RSD 分别为 0.71%, 0.84%, 表明本方法精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一样品(批号 20100902) 6 份, 按 2.11 项下方法测定, 结果哈巴昔、哈巴俄昔的平均质量浓度分别为 2.34, 0.29 g · L⁻¹, RSD 分别为 0.63%, 0.90%, 说明本方法的重复性良好。

2.9 稳定性试验 取上述样品在 4, 8, 12, 24 h 分别测定, 结果 24 h 内哈巴昔、哈巴俄昔的平均质量浓度为 2.34, 0.29 g · L⁻¹, RSD 分别为 0.95%,

0.57%,说明被测样品在 24 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收试验 精密量取已知含量的样品(批号 20100902)各 1 mL,共 6 份,编号 1~6,每 2 份为 1 组。每组各加入一定量的对照品溶液,按照供试品溶液制备方法制备样品溶液,并按上述色谱条件进行测定,分别计算哈巴昔和哈巴俄昔的加样回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 增液承气口服液中加样回收率试验($n=10$)

成分	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
哈巴昔	2.34	0.96	3.28	99.39	98.74	0.58
	2.34	0.96	3.27	99.09		
	2.34	1.28	3.57	98.62		
	2.34	1.28	3.58	98.90		
	2.34	1.61	3.86	97.72		
	2.34	1.61	3.90	98.73		
哈巴俄昔	0.29	0.23	0.50	96.15	97.15	1.02
	0.29	0.23	0.51	98.08		
	0.29	0.35	0.62	96.88		
	0.29	0.35	0.63	98.44		
	0.29	0.46	0.72	96.00		
	0.29	0.46	0.73	97.33		

2.11 样品测定 取不同批号的 5 批样品,照 2.3 项下制备供试品溶液,按照上述色谱条件,分别取配制的对照品溶液、供试品溶液,精密吸取 10 μ L 进样,以峰面积按外标法计算,结果见表 3。

表 3 增液承气口服液中 3 种成分的含量测定($n=3$) $g \cdot L^{-1}$

No.	批号	哈巴昔	哈巴俄昔
1	20100302	2.15	0.28
2	20100701	2.22	0.36
3	20100902	2.34	0.29
4	20100903	2.30	0.37
5	20101101	2.19	0.23

3 讨论

系统性试验时,为同时兼顾哈巴昔和哈巴俄昔的吸收灵敏度,以哈巴昔的最大吸收 210 nm 为检测波长。

在确定色谱分离条件时,对甲醇、乙腈、不同浓度的醋酸溶液等流动相进行多次选择比较,并参考《中国药典》^[8]及文献[9-11]确定本文的检测条件,哈巴昔和哈巴俄昔能够达到基线分离,峰形好,保留时间相对适中,分离度较好,柱压明显降低,其他成分无干扰。

测定结果表明,5 批增液承气口服液中哈巴昔和哈巴俄昔含量差异较大,这可能和原料的质量和提取工艺有关。根据《中国药典》单味药玄参的含量限度,按干燥品计算,含哈巴昔($C_{15}H_{24}O_{10}$)和哈巴俄昔($C_{24}H_{30}O_{11}$)的总量不得少于 0.45%,结合本制剂中玄参药材所加量 $0.5 g \cdot mL^{-1}$ 和提取工艺,建议本品哈巴昔和哈巴俄昔总量的含量限度为:本品每 1 mL 含玄参以哈巴昔($C_{15}H_{24}O_{10}$)和哈巴俄昔($C_{24}H_{30}O_{11}$)的总量计,不得少于 2.2 mg。

本文建立的含量测定方法专属性强,检测可排除其他非测定物质的干扰,测定结果准确,相关性好,可作为该制剂的质量控制手段。

[参考文献]

- [1] 杨进. 温病条辨[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:201.
- [2] 杨端芬. 增液承气汤治疗小儿病毒性肺炎 88 例[J]. 四川中医,2001,19(3):60.
- [3] 牛桂珍. 增液承气汤加减治疗中老年习惯性便秘的疗效观察[J]. 中国老年学杂志,2006,26(10):1432.
- [4] 沈雁鹏. 增液承气汤治疗阴虚肠燥便秘证 46 例[J]. 中国民间疗法,2003,11(7):40.
- [5] 肖阳娥,黄晓川. 增液承气汤加减救治 40 例慢性呼吸衰竭临床观察[J]. 新中医,1997,29(3):18.
- [6] 简小兵. 增液承气汤治疗慢性支气管炎急性发作 32 例[J]. 山东中医杂志,2003,22(5):65.
- [7] 韩英惠,杨运池. 增液承气汤治疗流行性出血热少尿期 40 例[J]. 中国民间疗法,2002,10(5):37.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2010:108.
- [9] 李亚荣,赵明会. 高效液相色谱法测定咽炎片中哈巴俄昔的含量[J]. 中国中医药杂志,2007,5(10):18.
- [10] 宋粉云,张俊芳,钟兆健等. RP-HPLC 法测定菌毒清颗粒中哈巴俄昔的含量[J]. 中国药房,2007,18(24):1874.
- [11] 王震,王岳钧,袁淑斐等. RP-HPLC 法测定增液颗粒中哈巴俄昔的含量[J]. 上海中医药杂志,2007,41(4):72.

[责任编辑 蔡仲德]