

HPLC 测定养阴清肺颗粒中哈巴俄苷的含量

陈华国¹, 周欣^{1,2}, 赵超^{1,2*}, 龚小见^{1,2}

(1. 贵州师范大学天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001;

2. 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 建立养阴清肺颗粒中哈巴俄苷的测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, Hypersil ODS(4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈和 1% 醋酸水溶液, 线性梯度洗脱 (15 85 ~60 40) (0 ~25 min), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm, 柱温 25 。结果: 哈巴俄苷浓度在 0.61 ~12.21 μg 线性关系良好, $r=0.9999$, 平均回收率为 97.02%, RSD 为 0.6% ($n=9$)。结论: 该方法分离效果好, 简便准确, 可用于养阴清肺颗粒中哈巴俄苷的含量测定, 以控制其质量。

[关键词] 养阴清肺颗粒; 哈巴俄苷; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0044-03

Determination of Harpagoside in Granules of Yangyin Qinfei by RP-HPLC

CHEN Hua-guo^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2}, ZHAO Chao^{1,2*}, Gong Xiao-jian^{1,2}

1. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Key laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guiyang 550001, China

[Abstract] Objective: Objective To determine the content of harpagoside in granules of Yangyin Qinfei. **Method:** A Rp-HPLC method was established. The chromatographic column was Hypersil ODS(4.6 mm ×250 mm), and acetonitrile-water (containing 1% acetic acid) (15 85 ~60 40) (0 ~25 min) was used as mobile phase. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was at 278 nm, and the column temperature was 25 . **Result:** The average recovery of harpagoside was 97.02%, and RSD was 0.6% ($n=9$). **Conclusion:** The method established can be used to determine the content of Harpagoside in Granules of Yangyin Qinfei.

[Key words] Granules of Yangyin Qinfei; harpagoside; HPLC; content determination

养阴清肺颗粒收载于《中华人民共和国卫生部颁标准》, 编号 WS3-B-2393-9, 由地黄、麦冬、玄参、川贝母、白芍、牡丹皮、薄荷和甘草等 8 味药材组成, 临床应用广泛, 具有养阴清热、润肺止咳之功效, 用于阴虚肺热, 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。有关养阴清肺颗粒及其他制剂大多采用测定丹皮酚或芍药苷来控制质量, 如

李健等^[1-3]采用液相色谱法测定了养阴清肺颗粒中丹皮酚的含量, 马丽杰^[4-6]等采用液相色谱法测定了养阴清肺丸中芍药苷的含量。玄参在处方中的排序在白芍和牡丹皮之前, 按照传统中医药理论, 玄参在该处方中的重要性更大, 故我们采用液相色谱法测定养阴清肺颗粒中玄参的有效成分哈巴俄苷的含量, 为养阴清肺颗粒提供另一种质量控制方法。

1 仪器与试药

Aglient 1100 高效液相色谱仪(四元泵, DAD 检测器, 自动进样器), 十万分之一天平(梅特勒托利多); 色谱乙腈(天津市科密欧化学试剂开发中心); 水(重蒸水, 临用前制备); 盐酸、醋酸等(分析醇); 哈巴俄苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号

[收稿日期] 2009-12-08

[基金项目] 贵州省中小企业局平台建设项目 黔中小发[2008]76 号; 贵州省发展和改革委员会 黔发高技[2008]1600 号

[通讯作者] * 赵超, Tel: (0851) 6700414, E-mail: chanzhao@126.com

110389-200403); 养阴清肺颗粒(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Hypersil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈和 1% 醋酸水溶液, 线性梯度洗脱 (15 85 ~60 40) (0 ~25 min), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm, 柱温 25 。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取哈巴俄苷对照品适量, 加 30% 甲醇制成每 1 mL 含 10 μg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 浸泡 1 h 后, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 30% 的甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照品溶液的制备 按养阴清肺颗粒制备工艺, 取缺玄参药材的其余各药味, 制成阴性样品, 取该阴性样品按“2.3 项下”的方法制备阴性对照品溶液。

2.5 系统适应性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各 20 μL, 按“2.1”项下的色谱条件, 注入液相色谱仪, 结果显示供试品与对照品溶液均在相同保留时间内出现吸收峰, 哈巴俄苷峰保留时间为 10 min, 理论塔板数大于 5 000, 阴性对照样品溶液在哈巴俄苷峰相应位置处无吸收峰, 本测定无干扰, 见图 1。

2.6 线性关系考察 精密称取哈巴俄苷对照品适量, 置 100 mL 量瓶中, 以 30% 甲醇溶液配制成 103.5 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液, 在用 30% 甲醇溶液稀释成系列对照品溶液, 进样 20 μL, 测定峰面积, 并以对照品的进样量 X(μg) 为横坐标, 峰面积值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $Y = 2.69 \times$

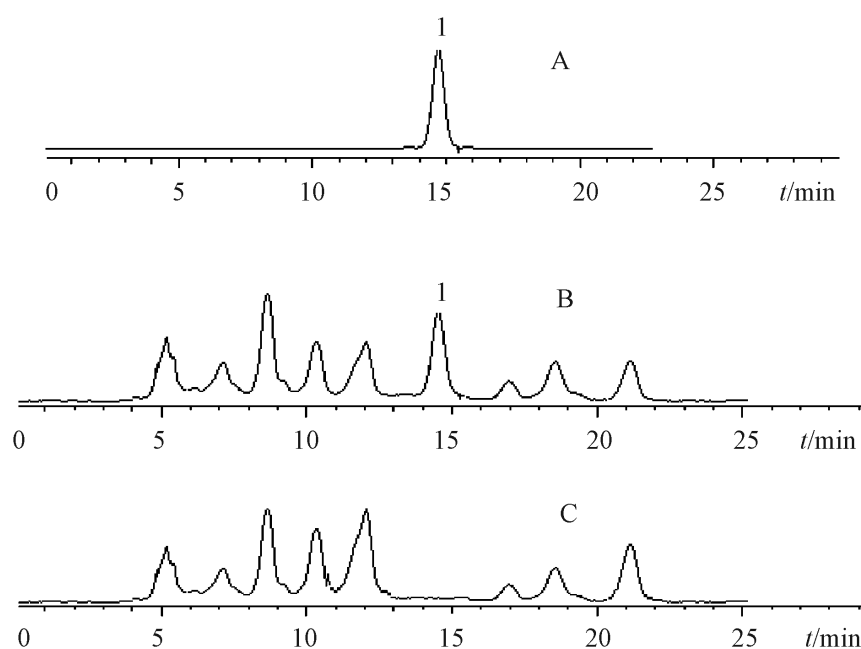


图 1 哈巴俄苷 HPLC 色谱图

A. 对照品; B. 样品; C. 阴性空白; 1. 哈巴俄苷

$10^3 X - 1.72 \times 10^2$, $r = 0.9999$, 结果表明, 哈巴俄苷在 0.61 ~12.21 μg 范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验 精密吸取上述哈巴俄苷对照品液 20 μL, 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算平均相对标准偏差, RSD 为 0.08%, 说明该方法具有良好的精密度。

2.8 稳定性试验 取同一批号样品, 按供试品溶液的制备方法操作, 分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 精密吸取 20 μL 进样, 测得哈巴俄苷峰面积的 RSD 为 1.8%。结果表明, 样品至少在 6 h 内稳定。

2.9 重复性试验 取同一批号样品 6 份, 分别制备供试液, 测得哈巴俄苷平均为 0.052%, RSD 为 1.6%。结果表明, 该试验重复性良好。

2.10 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的样品, 精密称定, 分别精密加入一定量的哈巴俄苷对照品, 按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 按上述测定方法进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 哈巴俄苷回收率试验 (n=9)

No.	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.5006	0.260	0.208	0.461	96.64	99.58	2.5
2	0.4977	0.259	0.208	0.457	95.19		
3	0.5013	0.261	0.208	0.473	101.92		
4	0.5021	0.261	0.260	0.522	100.38		
5	0.4923	0.256	0.260	0.525	103.46		
6	0.5001	0.260	0.260	0.518	99.23		
7	0.5062	0.263	0.312	0.579	101.28		
8	0.4937	0.257	0.312	0.568	99.68		
9	0.5058	0.263	0.312	0.570	98.40		

2.11 样品测定 取 3 批样品,按照上述含量测定方法测定,测定结果见表 2。

表 2 养阴清肺颗粒样品测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	含量 1	含量 2	平均含量
1	0.48	0.56	0.52
2	0.49	0.59	0.54
3	0.51	0.57	0.54

3 讨论

玄参为常用中药,具有凉血滋阴、泻火解毒之功效,用于热病伤阴、津伤便秘、目赤、咽痛等。玄参是养阴清肺颗粒中的重要药味之一,玄参中已分离出化学成分有 50 多种,主要含有环烯醚萜、苯丙素苷、有机酸及挥发油等^[7],我们采用液相色谱法测定环烯醚萜类成分中的哈巴俄苷,对养阴清肺颗粒的质量控制具有重要意义。

蔡少青^[8]等采用液相色谱法对中药玄参中的哈巴俄苷和肉桂酸进行了含量测定,我们在研究中发现,其流动相系统不适于养阴清肺颗粒中哈巴俄苷的分离。我们在此基础上进行了大量的摸索,最终选择流动相为乙腈和 1% 醋酸水溶液,线性梯度洗脱 (15 85 ~60 40) (0 ~25 min),在此流动相条件下哈巴俄苷峰能达到基线分离,与其他色谱峰的分度大于 1.5,故选定该流动相为本试验的流动相。

根据文献及用 SPD-M10A 二极管阵列检测器从 190 ~400 nm 进行光谱扫描,哈巴俄苷对照品在 278 nm 处有最大吸收,故选择 278 nm 为检测波长。

试验中,分别采用甲醇、30% 甲醇、50% 甲醇及

无水乙醇为提取溶剂,考察不同溶剂的提取效果,结果显示,30% 的甲醇作为提取溶剂,养阴清肺颗粒中哈巴俄苷的提取率最高,故选择 30% 的甲醇作为提取溶剂;30% 的甲醇为提取溶剂,对超声提取和回流提取进行了比较,结果回流提取与超声提取的提取效果相当,考虑到超声提取相对简便、省时,所以选择超声提取法。

[参考文献]

- [1] 李健,陈妍,徐金波.液相色谱法测定养阴清肺颗粒中丹皮酚的含量[J].天津中医药,2004,21(1):72.
- [2] 赵刚,李月霞,吴贵华.反相高效液相色谱法测定养阴清肺丸中丹皮酚的含量[J].天津药学,2005,17(5):14.
- [3] 林月英.高效液相色谱法测定养阴清肺糖浆中丹皮酚的含量[J].中华医学写作杂志,2004,11(14):1235.
- [4] 马丽杰,李兰城,王玉华.RP-HPLC 测定养阴清肺丸中芍药苷的含量[J].中国现代中药,2006,8(10):14,18.
- [5] 沈艺,陈妍,李镜友,等.HPLC 法测定养阴清肺膏中芍药苷的含量[J].中医药导报,2006,12(3):58.
- [6] 黄雄,黄嫒.中药玄参的研究进展[J].中医药导报,2007,13(10):103.
- [7] 蔡少青,谢丽华,王建华,等.中药玄参中哈巴俄苷和肉桂酸的高效液相色谱法测定[J].药物分析杂志,2000,20(3):191.

[责任编辑 顾雪竹]