

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.12.010

高效液相色谱法测定板山岗颗粒中(*R, S*)-告依春含量*

陈路¹, 吴无畏¹, 刘钰¹, 蓝晓步², 何晓惠³, 蓝鸣生^{1△}

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西南宁 530023; 2. 广西壮族自治区南宁市第一人民医院, 广西南宁 530012; 3. 广西中医药大学, 广西南宁 530001)

摘要:目的 建立测定板山岗颗粒中(*R, S*)-告依春含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(12:88, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 244 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 (*R, S*)-告依春进样量在 0.04~0.32 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 值均小于 2%; 平均加样回收率为 97.96%, RSD 为 1.63% (n=9)。结论 该方法操作简便、准确, 精密度、稳定性、重复性均良好, 可用于板山岗颗粒中(*R, S*)-告依春含量的测定。

关键词:板山岗颗粒; (*R, S*)-告依春; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)12-0034-03

Content Determination of (*R, S*)-Epigotritin in Banshangang Granules by HPLC

CHEN Lu¹, WU Wuwei¹, LIU Yu¹, LAN Xiaobu², HE Xiaohui³, LAN Mingsheng¹

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi, China 530023; 2. The First People's Hospital of Nanning, Nanning, Guangxi, China 530012; 3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530001)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of (*R, S*)-epigotritin in Banshangang Granules. Methods The chromatographic column was Kromasil 100-5 C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water(12:88, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 244 nm, the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μL. Results The (*R, S*)-epigotritin showed good linear relationship in the range of 0.04-0.32 μg. RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%, the average recovery rate was 97.96% and RSD was 1.63% (n=9).

Conclusion The method is simple and accurate, it has good precision, stability and repeatability, which can be used for the content determination of (*R, S*)-epigotritin in Banshangang Granules.

Key words: Banshangang Granules; (*R, S*)-epigotritin; HPLC; content determination

*基金项目: 广西壮族自治区南宁市科学研究与技术开发计划项目[20173158-6]。

第一作者: 陈路, 男, 壮族, 助理研究员, 研究方向为中药民族药产品开发, (电子信箱)150388451@qq.com。

△通信作者: 蓝鸣生, 男, 壮族, 主任药师, 研究方向为中药民族药产品开发, (电子信箱)lanmingsheng@126.com。

乙腈-0.4%醋酸为流动相时色谱图基线平稳, 峰形较好、干扰小、无拖尾现象, 最后确定乙腈-0.4%醋酸作为本试验的流动相系统。同时对乙腈-0.4%醋酸的不同比例(26:74, 23:77, 22:78)进行了考察, 结果发现, 随着乙腈比例的增大, 保留时间逐渐缩短, 色谱图峰形干扰大, 因此确定比例为 22:78, 保留时间在 8.8 min 左右较合适。试验中采用二极管阵列检测器对党参炔苷对照品进行光谱扫描, 结果在 242, 253, 267, 283 nm 波长处均有最大吸收, 通过比较供试品溶液党参炔苷的峰形发现, 在 267 nm 波长处色谱图峰形较好, 理论板数和对称因子符合要求。

综上所述, 本研究中建立的 HPLC 法操作简便、准确, 精密度、稳定性、重复性均良好, 可用于测定肝精补血素口服液中党参炔苷的含量。

参考文献:

- [1] WS₃-B-2530-97, 卫生部药品标准·中药成方制剂(第十三册)[S].
- [2] 袁卫梅, 吴生谦. 肝精补血素口服液的药效学研究[J]. 中国

药业, 2006, 15(17):29-30.

- [3] 张晓丹, 刘琳, 佟欣. 党参、黄芪对中枢神经系统作用的比较研究[J]. 中草药, 2003, 34(9):822-823.
- [4] 宋丹. 川党参活性成分与品质评价研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2008.
- [5] 朱恩圆, 贺庆, 王峥涛, 等. 党参化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(2):94-95.
- [6] 宋英, 周小初, 宋崎, 等. 党参中多糖的含量测定方法研究[J]. 中国药业, 2008, 17(23):9-10.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:281.
- [8] 汪胜, 王先教, 邓芳. 复方阿胶补血颗粒中不同来源党参的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2008, 17(10):32.
- [9] 黄健, 车晓平, 陈志峰, 等. 不同产地党参中党参炔苷的含量测定[J]. 北京中医药, 2011, 30(6):467-468.
- [10] 赵晓华, 刘养清, 王润生, 等. 党参不同部位中党参炔苷的 RP-HPLC 分析[J]. 中成药, 2007, 29(7):1046-1047.
- [11] 孙庆文, 黄敏, 何顺志. HPLC 测定 7 种党参类植物中的党参炔苷[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(3):290-292.

(收稿日期:2018-11-27)

中医治疗各类感染性疾病主要根据祛邪扶正的理论,并贯彻中医整体观和辨证论治思想^[1-2]。正是基于该思想,20世纪80年代,广西南宁市第一人民医院结合该自治区特有的各类中药民族药材,反复实践,自主研发出了中药制剂板山岗颗粒,其由板蓝根、山芝麻、白点秤(岗梅)3味药材组方,具有清热解毒、凉血等多种功效,临床主要用于治疗外感、咽喉炎、扁桃体炎、腮腺炎等感染性疾病。该中药制剂一经进入临床,就以其独特的临床疗效、显著的预防保健作用和相对较低的治疗费用,深受患者欢迎,在维护和增进健康方面有巨大优势。同时,由于制剂服用方便,中药成分毒性较小,不良反应较少,特别适用于儿童、老年人等特殊群体。为进一步控制该制剂质量,本研究中建立了测定板山岗颗粒中 (R, S) -告依春含量的方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

VARIAN 210 型高效液相色谱仪(美国 Varian 公司);BSA124S 型万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司);UV-1240 型紫外-可见光光度计(日本 Shimadzu 公司);SB-5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药

(R, S) -告依春对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 11753-201505,供含量测定用);板山岗颗粒(南宁市第一人民医院自制,批号分别为 181101, 181102, 181103,规格为每袋 12 g);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水(12:88, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:244 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

称取 (R, S) -告依春对照品 0.002 0 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,用水溶解并定容,制成质量浓度为 40 μ g/mL 的对照品贮备液;再精密吸取 4 mL,置 10 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀,制成质量浓度为 16 μ g/mL

的对照品溶液。称取样品 5 g,精密称定,置具塞三角锥形瓶中,精密加水 25 mL,称定质量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 30 min,放冷至室温,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,经微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。称取不含板蓝根的阴性样品 3 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密量取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。结果阴性对照品溶液在与对照品溶液相同保留时间处无干扰峰,表明专属性好。

线性关系考察:分别精密吸取对照品贮备液 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mL,置 10 mL 容量瓶中,用水定容,摇匀,经微孔滤膜滤过,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。以峰面积积分值(Y)为纵坐标、进样量(X, μ g)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 120.047X + 0.159$, $R^2 = 0.9996$ ($n = 8$)。结果表明, (R, S) -告依春进样量在 0.04 ~ 0.32 μ g 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:取 (R, S) -告依春对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图。结果的 RSD 为 0.79% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

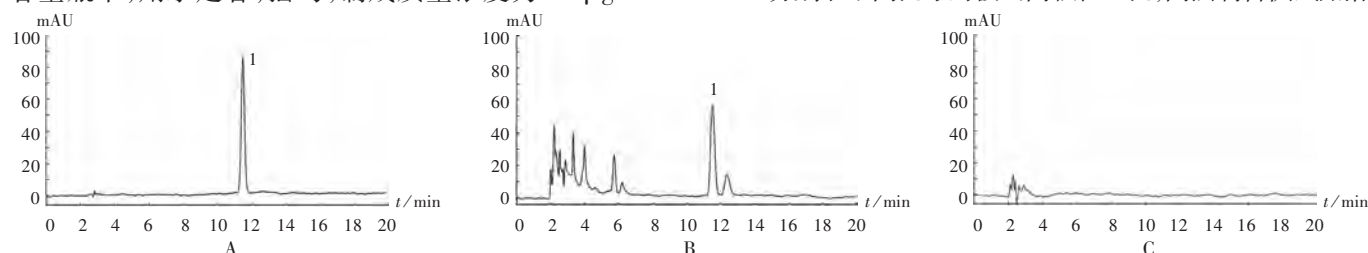
稳定性试验:精密称取样品(批号为 181101)5 g,同法制备供试品溶液,于室温放置 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果的 RSD 为 1.57% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置 24 h 基本稳定。

重复性试验:精密称取样品(批号为 181101)6 份,每份 5 g,同法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图并计算含量。结果, (R, S) -告依春平均含量为 0.065 1 mg/g, RSD 为 1.10% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品[批号为 181101,含 (R, S) -告依春 0.065 1 mg/g]适量,依法制备供试品溶液,分别精密加入对照品贮备液 2, 4, 6 mL,各 3 份,按拟订色谱条件进样测定。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

分别取不同批号的板山岗颗粒 3 批,同法制备供试品溶



1. (R, S) -告依春

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

表1 加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.163 9	0.080 0	0.244 1	100.25		
0.163 9	0.080 0	0.243 6	99.62		
0.162 8	0.080 0	0.239 6	96.00		
0.163 1	0.160 0	0.318 1	96.88		
0.162 9	0.160 0	0.318 9	97.50	97.96	1.63
0.162 8	0.160 0	0.316 1	95.81		
0.162 8	0.240 0	0.396 8	97.50		
0.163 2	0.240 0	0.401 4	99.25		
0.163 0	0.240 0	0.400 1	98.79		

液,按拟定色谱条件进样测定,记录色谱图并计算(R, S)-告依春的含量。结果批号为181101,181102,181103的样品的平均含量分别为0.065 1,0.065 4,0.066 2 mg/g。

3 讨论

3.1 质量评价指标选择

参考文献[3-5]及广西壮族自治区食品药品监督管理局发布的相关壮药质量标准,对样品中3味中药(板蓝根、山芝麻、岗梅)进行分析,以建立最佳质量评价标准。山芝麻含有葫芦素,岗梅含有去氢乌索酸等,但山芝麻和岗梅在2015年版《中国药典(一部)》及其他文献中均无含量测定标准方法,经研究,无法确定两味药材的有效成分或代表性成分的含量测定方法,故暂时不作为本处方的质量评价标准。参考文献[6-11],探索得到的板蓝根中(R, S)-告依春色谱图中无阴性干扰,同时板蓝根在处方中为君药,性寒味苦,有清热解毒、凉血利咽功效,可用于治疗瘟疫时毒、发热咽痛、温毒发斑、痄腮、烂喉丹痧、大头瘟疫、丹毒、痈肿等病症。其主要含(R, S)-告依春等多种成分,具有明显的抗流感病毒作用,且化学性质稳定,故以(R, S)-告依春作为板山岗颗粒的质量评价指标。

3.2 样品处理

样品的制备方法考察了甲醇超声溶解、50%甲醇超声溶解、水超声溶解、水回流提取等处理方法,对照品的制备方法探讨了甲醇溶解、50%甲醇溶解、水溶解等处理方法,结果表明,水超声溶解,其溶解度大,色谱图峰形较好,且该方法操作简易,又无阴性干扰^[12]。

3.3 流动相选择

参考2015年版《中国药典(一部)》板蓝根药材项下测定(R, S)-告依春的方法,曾选用甲醇-水(15:85, V/V)为流动相,发现(R, S)-告依春与样品中其他峰分离度小,且峰形不好。还采用不同比例的甲醇-水系统,比较样品的出峰时间、理论板数、分离度和峰形(对称性)^[13-14]。最终选择了甲醇-水(12:88, V/V),其保留时间合适,且分离度好、柱效高,理论板数按(R, S)-告依春计应不低于5 000。

3.4 色谱条件选择

曾采用Dikma Diamonsil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Kromasil 100-5 C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Agilent XDB C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)等进行样品溶液的测定。以Agilent XDB C_{18} 柱测得样品溶液色谱图中保留时间虽较好,但其峰形不好,因而不被采用;而Dikma Diamonsil C_{18} 柱测得样品溶液色谱图中峰形较差,故不予选择;Kromasil 100-5 C_{18} 柱测得样品溶液中的(R, S)-告依春色谱图中保留时间合适,且与前后杂质峰的分离度均大于1.5,峰形和分离度均良好,符合《中国药典》的规定。

3.5 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、准确,精密性、稳定性、重复性均良好,可用于板山岗颗粒中(R, S)-告依春含量的测定。

参考文献:

- [1] 彭胜权. 中医药治疗病毒性感染性疾病的优势和特色[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(5): 336-339.
- [2] 张淑文, 苗 彬. 从急性感染性疾病的临床诊治谈中西医结合[J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(3): 322-325.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 205-206.
- [4] 蒋才武, 杜 冲, 伍 敏, 等. 壮药山芝麻抗炎镇痛止血有效部位的研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(10): 1672-1674.
- [5] 祁银德, 任玉凤. 岭南地区习用中药岗梅研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(3): 29-32.
- [6] 梁 剑. HPLC测定板蓝根药材及其制剂中表告依春含量的方法分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(21): 102-103.
- [7] 朱文灯, 张 倩, 吴 翠, 等. HPLC法测定板蓝根颗粒中RS-告依春的含量[J]. 中国医药指南, 2015, 13(6): 51-52.
- [8] 肖春霞, 黄晓婧, 文永盛. HPLC法同时测定板蓝根颗粒中腺苷和(R, S)-告依春的含量[J]. 中国药物评价, 2017, 34(2): 81-85.
- [9] 石燕红, 谢志勇, 吴迎春, 等. RP-HPLC测定板蓝根制剂中 R, S -告依春[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 128-130.
- [10] 吴 静, 陈丽芬. 板蓝根颗粒浸膏中(R, S)-告依春的含量测定研究[J]. 大众科技, 2014, 16(8): 107-108.
- [11] 王宁莉, 周振旗, 贾万仓. 板蓝根饮片、板蓝根颗粒中(R, S)-告依春的含量测定[J]. 中国药业, 2018, 27(3): 30-32.
- [12] 巩 伟, 刘忠良, 赵庆华, 等. 高效液相色谱法测定板蓝根颗粒中(R, S)-告依春的含量[J]. 医药导报, 2015, 34(6): 791-795.
- [13] 姜雪敏, 杨立志. 高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中 R, S -告依春含量[J]. 中国药业, 2017, 26(5): 35-37.
- [14] 苏玲萍, 张 勇, 朱晓北. HPLC法测定板蓝根颗粒中(R, S)-告依春的含量[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(7): 87.

(收稿日期: 2018-10-17)