

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.14.011

高效液相色谱法同时测定咽炎合剂中绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷及重楼皂苷含量

沈红祥¹, 徐加兵^{2△}

(1. 江苏省扬州市中医院, 江苏 扬州 225002; 2. 江苏省泰州市药品检验所, 江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立同时测定咽炎合剂中绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ及重楼皂苷Ⅰ含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% 醋酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 检测波长为 330 nm (0~10 min, 之后为 210 nm), 流速为 1 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果 绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ及重楼皂苷Ⅰ质量浓度线性范围分别为 6.462 5~258.500 0 mg/L、1.745~69.800 mg/L、2.515~100.600 mg/L、3.180~127.200 mg/L、2.635~105.400 mg/L 和 2.727 5~109.100 0 mg/L, 且精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2% (n=6); 平均回收率为 98.94%~101.26%, RSD 为 0.71%~1.47% (n=6); 咽炎合剂中上述 6 种成分的含量分别为 2.108, 0.319, 0.418, 1.355, 0.826, 1.854 mg/g。结论 该方法准确可靠, 重复性好, 可用于咽炎合剂的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 咽炎合剂; 绿原酸; 葫芦素 B; 哈巴俄苷; 重楼皂苷Ⅶ; 重楼皂苷Ⅱ; 重楼皂苷Ⅰ; 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)14-0032-03

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Cucurbit B, Harbahuoside, Parissaponin in Yanyan Mixture by HPLC

SHEN Hongxiang¹, XU Jiabing²

(1. Yangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou, Jiangsu, China 225002; 2. Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, cucurbit B, harbahuoside, parissaponin VII, parissaponin II and parissaponin I in Yanyan Mixture. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.05% acetic acid-acetonitrile(gradient elution), the detection wavelength was 330 nm(0-10 min) and 210 nm after 10 min, the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 35 °C and the sample size was 10 μL. **Results** The chlorogenic acid, cucurbit B, harbahuoside, parissaponin VII, parissaponin II and parissaponin I showed good linear relationship in the ranges of 6.462 5-258.500 0 mg/L, 1.745-69.800 mg/L, 2.515-100.600 mg/L, 3.180-127.200 mg/L, 2.635-105.400 mg/L, 2.727 5-109.100 0 mg/L. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2% (n=6), the average recovery was in the range of 98.94%-101.26%, RSD was in the range of 0.71%-1.47% (n=6). The contents of the above six components in Yanyan Mixture were 2.108, 0.319, 0.418, 1.355, 0.826, 1.854 mg/g. **Conclusion** The method is accurate, reliable and reproducible, which can be used for the quality control of Yanyan Mixture.

Key words: HPLC; Yanyan Mixture; chlorogenic acid; cucurbit B; harbahuoside; parissaponin VII; parissaponin II; parissaponin I; content determination

咽炎合剂为扬州市中医院常用中药制剂(批准文号为苏药制字 Z04001168), 由金银花、桔梗、重楼、天花粉、玄参、乌梅、生甘草 7 味中药组方, 具有清热解毒、化痰利咽功效, 用于治疗急慢性咽喉炎。本研究中参考文献[1-6], 采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定咽炎合剂中绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ及重楼皂苷Ⅰ的含量, 为全面评价和控制咽炎合剂的质量提供试验依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Xplorer 型微量移液器(德国艾本德公司); GTS 型智能超声清洗机(广东固特超声股份有限公司); XSE

型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

试剂: 绿原酸对照品(批号为 111871-201706, 含量为 96.8%), 葫芦素 B 对照品(批号为 111945-201301, 含量为 96.8%), 哈巴俄苷对照品(批号为 111730-201709, 含量为 95.9%), 重楼皂苷Ⅶ(批号为 111593-201604, 含量为 94.0%), 重楼皂苷Ⅱ(批号为 111591-201604, 含量为 91.4%), 重楼皂苷Ⅰ(批号为 111590-201604, 含量为 93.6%), 均购自中国食品药品检定研究院; 咽炎合剂(扬州市中医院自制, 批号分别为 20171006, 20171015, 20171028, 规格为每瓶 250 mL); 乙腈、冰醋酸为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。

第一作者: 沈红祥, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为制剂质量控制, (电子信箱)shx2017@foxmail.com。

△通信作者: 徐加兵, 男, 硕士研究生, 中药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)xujiabing2@sina.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:0.05% 醋酸溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min 时 15% B → 30% B, 10 ~ 20 min 时 30% B → 42% B, 20 ~ 34 min 时 42% B → 51% B, 34 ~ 46 min 时 51% B → 60% B, 46 ~ 60 min 时 60% B → 80% B); 检测波长:330 nm(0 ~ 10 min), 之后为 210 nm; 流速:1 mL/min; 柱温:35 °C; 进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

称取绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II 及重楼皂苷 I 对照品各适量, 精密称定, 置容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制成各成分质量浓度分别为 258.5, 69.8, 100.6, 127.2, 105.4, 109.1 mg/L 的混合对照品溶液。精密量取供试品 5 mL, 水浴蒸干, 加甲醇溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按处方比例和样品制备工艺制成不含金银花、天花粉、玄参及重楼 4 味药材的阴性对照品, 按供试品溶液配制方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下 3 种溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 得色谱图(见图 1)。可见, 阴性对照品溶液色谱在绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II 及重楼皂苷 I 出峰处无干扰, 表明专属性较好。

线性关系考察:分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.00 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 摇匀。配制成分别含绿原酸 6.462 5, 12.925 0, 25.850 0, 64.625 0, 129.250 0, 258.500 0 mg/L, 葫芦素 B 1.745, 3.490, 6.980, 17.450, 34.900, 69.800 mg/L, 哈巴俄苷 2.515, 5.030, 10.060, 25.150, 50.300, 100.600 mg/L, 重楼皂苷 VII 3.18, 6.36, 12.72, 31.8, 63.6, 127.2 mg/L, 重楼皂苷 II 2.635, 5.270, 10.540, 26.350, 52.700, 105.400 mg/L 和重楼皂苷 I 2.727 5, 5.455 0, 10.910 0, 27.275 0, 54.550 0, 109.100 0 mg/L 的系列混合对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积(A)

为纵坐标、对照品溶液质量浓度(C)为横坐标进行线性回归。回归方程及线性范围见表 1。

表 1 回归方程及线性范围(n=6)

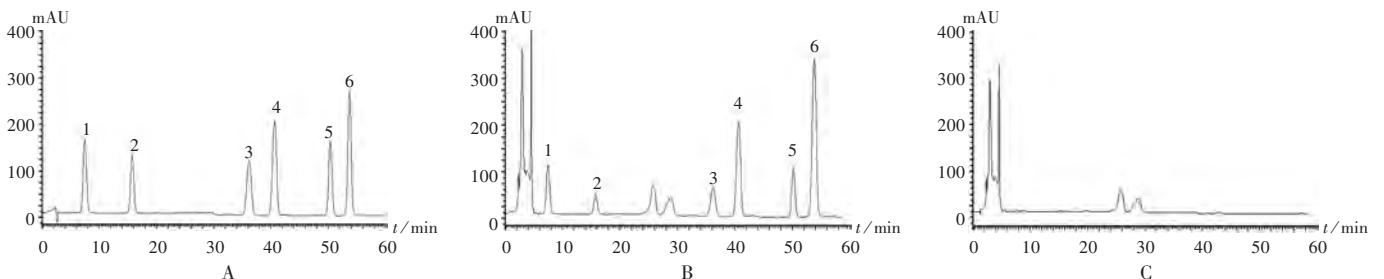
待测成分	回归方程	r	线性范围(mg/L)
绿原酸	A = 32.489 C - 14.821	0.999 9	6.462 5 ~ 258.500 0
葫芦素 B	A = 44.474 C - 17.262	0.999 8	1.745 ~ 69.800
哈巴俄苷	A = 46.653 C - 34.352	0.999 7	2.515 ~ 100.600
重楼皂苷 VII	A = 42.390 C - 25.337	0.999 9	3.180 ~ 127.200
重楼皂苷 II	A = 46.864 C + 1.7507	0.999 8	2.635 ~ 105.400
重楼皂苷 I	A = 58.179 C + 16.941	0.999 7	2.727 5 ~ 109.100 0

精密度试验:精密吸取含绿原酸 25.85 mg/L、葫芦素 B 6.98 mg/L、哈巴俄苷 10.06 mg/L、重楼皂苷 VII 12.72 mg/L、重楼皂苷 II 10.54 mg/L、重楼皂苷 I 10.91 mg/L 的混合对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果的 RSD 分别为 1.24%, 0.96%, 1.08%, 0.90%, 1.23%, 0.89% (n=6), 表明仪器精密度良好。

重复性试验:精密量取样品(批号为 20171028) 6 份, 每份 5 mL, 依法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 计算样品含量。结果绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 含量分别为 2.101, 0.316, 0.415, 1.359, 0.819, 1.856 g/L, RSD 分别为 1.28%, 1.17%, 1.32%, 1.05%, 1.43%, 1.26% (n=6), 表明方法重复性好。

稳定性试验:精密吸取同一样品(批号为 20171028)供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 室温下分别于 0, 2, 4, 8, 15, 24 h 时进样, 记录峰面积, 结果绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄苷、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 峰面积的 RSD 分别为 1.38%, 1.17%, 1.42%, 1.36%, 0.68%, 1.33% (n=6), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品(批号为 20171028) 1 mL, 共 6 份, 水浴蒸干, 加甲醇溶解, 置 100 mL 容量瓶中, 加入 2.2 项下混合对照品溶液 5 mL, 加甲醇定容。经 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液 10 μL 进样测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果见表 2。



1. 绿原酸 2. 葫芦素 B 3. 哈巴俄苷 4. 重楼皂苷 VII 5. 重楼皂苷 II 6. 重楼皂苷 I

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

表2 加样回收试验结果($n=6$)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
绿原酸	2.101	1.2925	3.4177	101.87	100.41	1.47
	2.101	1.2925	3.3987	100.40		
	2.101	1.2925	3.3706	98.23		
	2.101	1.2925	3.4037	100.79		
	2.101	1.2925	3.4191	101.98		
	2.101	1.2925	3.3833	99.21		
葫芦素 B	0.316	0.349	0.6610	98.85	99.54	0.71
	0.316	0.349	0.6636	99.60		
	0.316	0.349	0.6618	99.08		
	0.316	0.349	0.6670	100.57		
	0.316	0.349	0.6657	100.20		
	0.316	0.349	0.6614	98.97		
哈巴俄昔	0.415	0.503	0.9267	101.73	101.26	1.15
	0.415	0.503	0.9167	99.74		
	0.415	0.503	0.9275	101.89		
	0.415	0.503	0.9307	102.52		
	0.415	0.503	0.9173	99.86		
	0.415	0.503	0.9272	101.83		
重楼皂苷 VII	1.359	0.636	1.9859	98.57	99.34	0.95
	1.359	0.636	1.9888	99.03		
	1.359	0.636	1.9843	98.32		
	1.359	0.636	1.9977	100.42		
	1.359	0.636	1.9895	99.14		
	1.359	0.636	1.9987	100.58		
重楼皂苷 II	0.819	0.527	1.3322	97.38	98.94	1.32
	0.819	0.527	1.3357	98.05		
	0.819	0.527	1.3467	100.13		
	0.819	0.527	1.3505	100.85		
	0.819	0.527	1.3379	98.46		
	0.819	0.527	1.3395	98.77		
重楼皂苷 I	1.856	0.5455	2.3980	99.36	99.71	1.27
	1.856	0.5455	2.4050	100.64		
	1.856	0.5455	2.3882	97.56		
	1.856	0.5455	2.4043	100.51		
	1.856	0.5455	2.4067	100.95		
	1.856	0.5455	2.3974	99.25		

2.4 样品含量测定

分别精密量取3批样品各5 mL,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄昔、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 平均含量分别为 2.108, 0.319, 0.418, 1.355, 0.826, 1.854 mg/g, RSD 分别为 0.74, 0.63, 0.72, 0.54, 1.19, 0.60。

3 讨论

咽炎合剂组方中,金银花主要含有绿原酸等有机酸类,有清热解毒、疏散风热、凉血止痢、降血降火、消咽利膈之功效^{[7][8][22]};天花粉主要含有葫芦素 B,功效为清热

泻火、生津止渴、排脓消肿^[9];玄参有清热凉血、滋阴降火、解毒散结功效,哈巴俄昔为玄参及其制剂质量控制的指标性成分^{[8][117]};重楼可清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,常用于疔疮痈肿、咽喉肿痛、蛇虫咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐,有效成分主要为皂苷类,常以重楼皂苷作为重楼及其制剂的指标类成分^{[8][260]}。故本试验中选绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄昔、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 为指标进行含量测定。

预试验中,对各待测成分进行了全波长扫描,根据所得光谱,综合各成分的最大吸收波长,确定绿原酸检测波长为 330 nm,葫芦素 B、哈巴俄昔、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 的检测波长为 210 nm,并经试验证明基线对各峰无干扰、分离效果良好,特异性强。采用色谱工作站的定时波长功能改变检测波长,提高了检测的灵敏度和准确性,具有灵敏准确、方便快速的特点。

选择流动相组成及比例时,分别对甲醇-水体系及乙腈-水体系下的色谱系统性能进行了考察。结果发现,乙腈-水体系梯度洗脱时的基线平稳性、峰形及分离度均显著优于甲醇-水体系,且可较好地分离6种成分,同时加入0.05%醋酸溶液使得峰形更优。

综上所述,本研究中建立的 HPLC 法可同时测定咽炎合剂中绿原酸、葫芦素 B、哈巴俄昔、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 II、重楼皂苷 I 的含量,且该方法快速、准确、重复性高,可用于咽炎合剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 段 杨,刘应华,宋愿智. 高效液相色谱法测定小儿咽扁颗粒中绿原酸含量[J]. 中国药业,2014,23(3):38-39.
- [2] 余晟岚,徐 果. 反相高效液相色谱法测定金嗓子口服液中绿原酸含量[J]. 中国药业,2017,26(10):65-66.
- [3] 孙 文,巢志茂,王 淳,等. HPLC-UV 对栝楼各部位中葫芦素 B 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):86-88.
- [4] 封海霞. 高效液相色谱法测定玄参百贝散中哈巴俄昔含量[J]. 中国药业,2017,26(20):41-43.
- [5] 罗廷顺,胡建勇,李 杨,等. HPLC 法测定重楼种植药材中4种重楼皂苷的含量[J]. 中国药师,2016,19(1):5-7.
- [6] 王仕宝,蔡艳妮,贾慧梅,等. HPLC 法测定不同来源重楼药材中7种甙体皂苷的含量[J]. 西北药学杂志,2017,32(2):133-138.
- [7] 宋亚玲,王红梅,倪付勇,等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药,2015,46(4):490-495.
- [8] 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.
- [9] 温春秀,刘金娜,张 迪,等. 不同居群栝楼各药用部位质量综合评价研究[J]. 中草药,2015,46(16):2460-2466.

(收稿日期:2018-12-02)