

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.018

高效液相色谱法测定止咳平喘合剂中4种成分含量

朱正华,王 喆,张 馨

(云南省曲靖市食品药品检验检测中心,云南 曲靖 655000)

摘要:目的 建立测定止咳平喘合剂中阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 ODS Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-5%醋酸(20:80, V/V),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃,检测波长为 283 nm 和 323 nm。结果 阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷在各自相应质量浓度范围内与峰面积线性关系良好,平均回收率分别为 99.44%, 101.25%, 100.88%, 99.63%, RSD 分别为 0.52%, 0.67%, 0.70%, 0.69% (n=6)。结论 该方法准确、简便,结果稳定,可用于止咳平喘合剂中阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷的含量测定。

关键词:止咳平喘合剂;阿魏酸;芸香柚皮苷;柚皮苷;橙皮苷;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(2020)19-0064-04

Content Determination of Four Components in Zhike Pingchuan Mixture by HPLC

ZHU Zhenghua, WANG Zhe, ZHANG Xin

(Qujing City Food and Drug Inspection Test Center, Qujing, Yunnan, China 655000)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of ferulic acid, narirutin, naringin and hesperidin in Zhike Pingchuan Mixture. **Methods** The determination was performed on ODS Hypersil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm) with mobile phase consisted of methanol-5% glacial acetic acid(20:80, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 35℃, and the detection wavelength was set at 283 nm and 323 nm. **Results** The linear relationships of ferulic acid, narirutin, naringin and hesperidin within their corresponding concentration ranges were good, the average recoveries were 99.44%, 101.25%, 100.88%, 99.63%, and the RSDs were 0.52%, 0.67%, 0.70%, 0.69% (n=6). **Conclusion** This method is accurate, simple, fast and stable, which can be used for the determination of ferulic acid, narirutin, naringin and hesperidin in Zhike Pingchuan Mixture.

Key words: Zhike Pingchuan Mixture; ferulic acid; narirutin; naringin; hesperidin; high performance liquid chromatography; content determination

止咳平喘合剂是云南省曲靖市中医医院研制的院内制剂,由苦杏仁、陈皮、前胡、法半夏、化橘红、重楼、炙瓜蒌皮等组方,具有祛痰降气、止咳平喘的功效,用于治疗感冒咳嗽、咽干痰稠、喘促胸闷、久咳不止^[1]。方中主药为陈皮、化橘红、当归,其中,陈皮、化橘红来源于同芸香科不同种,均含有丰富的挥发油及黄酮类化合物,陈皮主要含有橙皮苷、新橙皮苷,化橘红主要含柚皮苷、新橙皮苷及少量橙皮苷,且结构非常相似。陈皮和化橘红的挥发油有刺激性祛痰作用,辛散温通,气香而燥,既能行肺气之壅滞,又能燥湿浊而化痰,故常用于治疗痰湿

阻肺、咳嗽痰多、胸膈满闷、头目眩晕等证;当归可活血通络祛瘀^[2-7]。诸药合用,宣降得宜,祛邪而不伤正,扶正而不留邪,温而不燥,润而不膩,令肺气调畅,咳嗽自止。本研究中参照文献[8-13],以阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷为定量控制指标,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法进行含量测定,可为止咳平喘合剂的质量标准研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

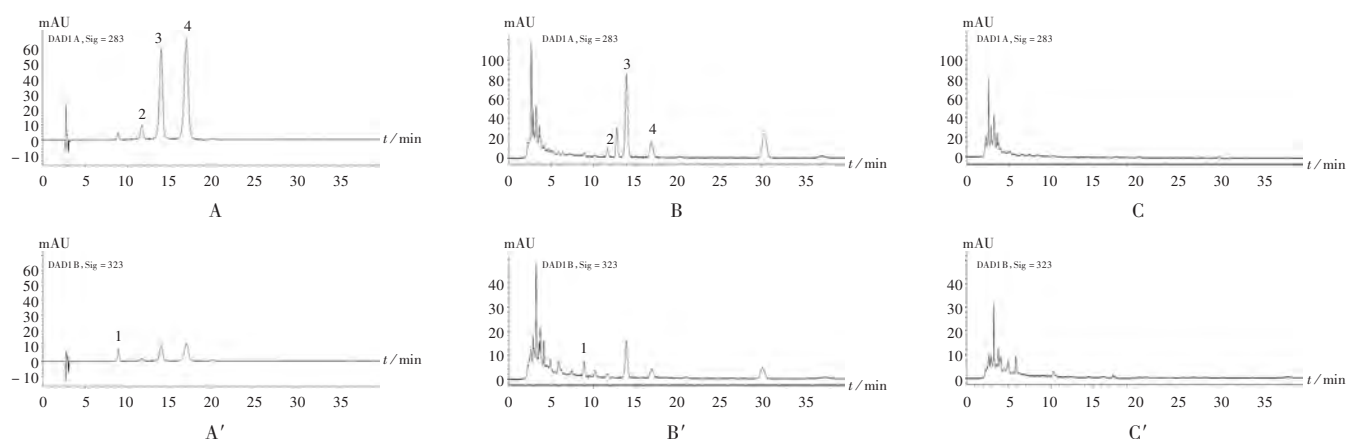
第一作者:朱正华,男,大学本科,主管药师,研究方向为药物分析,(电话)0874-8994091(电子信箱)63149022@qq.com。

- [8] 王玉龙,袁步娟,赵海欣,等. HPLC 法测定延丹胶囊中原儿茶醛、芍药苷和橙皮苷的含量[J]. 解放军医药杂志,2015,27(12):104-108.
- [9] 师永清,康淑荷,王爱军. HPLC 法同时测定黄连双清丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、盐酸小檗碱和大黄素的含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(9):1612-1616.
- [10] 袁凤刚,郝艳玲,陈永刚,等. HPLC 同时测定双丹胶囊中7种主要成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(1):32-35.
- [11] 黄 澜,陈惠玲,李玲玲. HPLC 同时测定正天丸中芍药苷、阿魏酸、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J].

中国中药杂志,2013,38(13):2114-2117.

- [12] 谢青春,吕竹芬,陈燕忠,等. 补肺活血胶囊中芍药苷的含量测定[J]. 中药材,2012,35(8):1335-1336.
- [13] 李娉婷,陈子娇,贾 薇,等. 中药胶囊剂中芍药苷含量测定方法优化[J]. 时珍国医国药,2014,25(10):2357-2359.
- [14] 程 猷,盛芳芳,傅若秋,等. 益精灵口服液质量控制标准提高研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(1):221.
- [15] 王林丽,孟德胜,彭亦新. 痛风利湿口服液质量标准研究[J]. 中国药业,2012,21(15):49-50.

(收稿日期:2020-04-09)



1. 阿魏酸 2. 芸香柚皮苷 3. 柚皮苷 4. 橙皮苷
A, A'. 混合对照品溶液 B, B'. 供试品溶液 C, C'. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

司),包括 G1311A 系列四元泵、G1315D DAD 检测器、G1316A 柱温箱、G1329A 自动进样器、二极管(分辨率为 0.74 nm,波长精度为 1 nm);KQ-300UDB 型双频数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 120~300 W,频率为 45/80 kHz);Mettler MS205DU 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为 0.1 mg 和 0.01 mg);Purelab FLEX 3 型一体式超纯水仪(英国 ELGA 公司,制水符合实验室一级水要求)。

1.2 试药

阿魏酸对照品(批号为 110733-201614,含量为 99.0%),芸香柚皮苷对照品(ChromaDex,批号为 00014230-803,含量为 100.0%),柚皮苷对照品(批号为 110722-201613,含量为 94.3%),橙皮苷对照品(批号为 110721-201818,含量为 96.2%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,德国默克公司,批号为 1046707 936);冰醋酸(分析纯,四川西陇科学有限公司,批号为 190610,含量不低于 99.5%);水为超纯水;止咳平喘合剂(云南省曲靖市中医医院制剂室提供,批号分别为 181003,181108,181206)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ODS Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-5%醋酸(20:80, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;检测波长:283,323 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取阿魏酸对照品 12.40 mg,芸香柚皮苷对照品 17.20 mg,柚皮苷对照品 17.03 mg,橙皮苷对照品 13.68 mg,精密称定,分别置 4 个 10 mL 容量瓶中,加甲醇使溶解,定容,摇匀,分别精密量取 0.1, 0.5, 3.0, 5.0 mL 置同一 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容,

摇匀,即得混合对照品溶液(阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷质量浓度分别为 4.910, 34.400, 192.700, 263.200 μg/mL)。

供试品溶液:精密量取样品(批号为 181003) 10 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率为 300 W,频率为 40 kHz)5 min,加甲醇溶解,定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按止咳平喘合剂的处方工艺,称取除陈皮、化橘红、当归以外的其他药材,按处方制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性考察:取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL,按拟订色谱条件进样,记录色谱图。阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷的保留时间依次为 8.9, 11.7, 14.0, 17.0 min,理论板数依次为 9 211, 6 238, 6 507, 6 167。4 种成分均分离完全,阴性对照品溶液在与混合对照品溶液相应峰处未见色谱峰出现,表明制剂中其他药物及辅料对测定无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液 0, 1.25, 2.5, 5, 10 mL,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得。按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度(C)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表 1。

表1 4种成分线性关系考察结果

成分	线性回归方程	r	线性范围(μg/mL)
A	$A = 48.0641983C - 0.6804821$	0.99920	0.6138~4.910
B	$A = 13.3538805C - 4.1990618$	0.99965	4.3000~34.400
C	$A = 17.1321126C - 5.3998734$	0.99996	24.0900~192.700
D	$A = 17.4026410C + 6.7383301$	0.99991	32.9000~263.200

注:A为阿魏酸,B为芸香柚皮苷,C为柚皮苷,D为橙皮苷。下表同。

精密密度试验:精密吸取混合对照品溶液,连续进样5次。结果阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.34%, 1.10%, 0.45%, 0.29% ($n=5$), 表明仪器精密密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 181003)样品 5 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷含量的 *RSD* 分别为 0.36%, 0.85%, 0.82%, 0.40% ($n=5$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验:依法制备供试品溶液,分别于配制后 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 h 时进样测定,记录峰面积。结果阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.86%, 0.82%, 0.71%, 0.62% ($n=7$), 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

加样回收试验:分别量取已知含量的样品(批号为 181003)5.0 mL,共 6 份,分别加入单标对照品溶液(阿魏酸 49.104 $\mu\text{g/mL}$,芸香柚皮苷 275.20 $\mu\text{g/mL}$,橙皮苷 658.00 $\mu\text{g/mL}$)各 1 mL,拟订单标溶液柚皮苷(1606.0 $\mu\text{g/mL}$)1.5 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样,并计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

成分	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	<i>RSD</i> (%)
A	37.650	49.104	86.807	100.11	99.44	0.52
	37.650	49.104	86.363	99.20		
	37.650	49.104	86.135	98.74		
	37.650	49.104	86.325	99.13		
	37.650	49.104	86.726	99.94		
	37.650	49.104	86.531	99.55		
B	272.35	275.20	550.875	101.21	101.25	0.67
	272.35	275.20	551.289	101.36		
	272.35	275.20	552.356	101.75		
	272.35	275.20	548.563	100.37		
	272.35	275.20	549.292	100.63		
	272.35	275.20	553.536	102.18		
C	2493.45	2409.0	4916.825	100.60	100.88	0.70
	2493.45	2409.0	4923.227	100.86		
	2493.45	2409.0	4955.536	102.20		
	2493.45	2409.0	4922.892	100.85		
	2493.45	2409.0	4918.025	100.65		
	2493.45	2409.0	4904.568	100.09		
D	626.00	658.00	1288.006	100.61	99.63	0.69
	626.00	658.00	1281.112	99.56		
	626.00	658.00	1275.995	98.78		
	626.00	658.00	1280.135	99.41		
	626.00	658.00	1285.735	100.26		
	626.00	658.00	1278.482	99.16		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,各 3 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别进样,记录峰面积,以外标法计算各成分含量,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果($n=3$)

批号	A		B		C		D	
	含量 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>RSD</i> (%)	含量 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>RSD</i> (%)	含量 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>RSD</i> (%)	含量 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>RSD</i> (%)
181003	7.53	0.95	54.47	0.79	498.69	0.42	125.20	0.31
181108	7.46	0.92	54.31	0.82	498.21	0.35	125.03	0.35
181206	7.42	0.93	54.52	0.87	498.30	0.37	124.96	0.32

3 讨论

检测波长选择:曾采用单波长 283 nm 检测,但供试品溶液中阿魏酸含量偏低,色谱峰偏小,故采用双波长检测,于阿魏酸最大吸收波长(323 nm)峰面积增大,利于检出,且精密密度好。

流动相选择:曾采用乙腈、甲醇分别和 0.1% 磷酸、5% 醋酸配比,最后确定流动相为甲醇-5% 醋酸(20:80, V/V),其基线平稳,主成分峰形及分离效果较好。

样品提取:先后考察了甲醇超声提取、50% 甲醇超声提取及加水振摇混匀。发现 3 种提取方式对于主成分含量均无显著影响,考虑到样品制备与对照品溶液制备溶剂应尽可能相同,故选择甲醇为溶剂进行超声提取。

取样量确定:样品处理过程中,4 种成分的含量极差稍大,经反复试验,最后确定取样量为 10 mL,稀释至 50 mL。

在测定过程中,样品的分离度较好,阴性样品无干扰。该方法简便、快捷、准确,可控制该处方中多味药材的质量。

参考文献:

- [1] 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,2015:74-75,133-134,191.
- [2] 宋玉鹏,陈海芳,谭舒舒,等. 不同陈皮来源药材中橙皮苷、川陈皮素、橘皮素和辛弗林的含量比较[J]. 时珍国医国药, 2017,28(9):2061-2064.
- [3] 邓超澄. 陈皮不同炮制品化学成分分析[J]. 广西中医学院学报,2000,17(4):60-61.
- [4] 陈有根,黄敏,徐向红. 不同贮存期的陈皮化学成分比较研究(I)[J]. 中国药业,1998,7(9):33-34.
- [5] 郑小吉,詹晓如,王小平. 陈皮研究进展[J]. 中国现代中药, 2007,9(10):30-33.
- [6] 吴梓春,刘肖林. 中药当归有效成分分离及含量测定[J]. 北方药学,2015,12(8):15-16.
- [7] 申安. 高效液相色谱法测定不同产地当归中阿魏酸的含量[J]. 中医学报,2015,16(3):121-122.
- [8] 吴姣,孙广庭,陈迪安,等. 当归胶囊中三种有效成分含量