

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.21.017

反相高效液相色谱法同时测定鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷含量*

张丽娟¹, 蓝献泉^{2△}, 郑锦坤¹, 阙伟祺¹, 李庆德¹, 朱燕²

(1. 粤北人民医院, 广东 韶关 512026; 2. 广东省韶关市食品药品检验所, 广东 韶关 512028)

摘要:目的 建立同时测定鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷3种活性成分含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为ACE Excel C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为274 nm(0~20 min时龙胆苦苷)、334 nm(20~40 min时迷迭香酸和蒙花苷), 柱温为30℃, 进样量为10 μL。结果 龙胆苦苷、迷迭香酸、蒙花苷质量浓度分别在5.29~169.34 μg/mL($r=1.000\ 0$, $n=6$), 1.00~32.09 μg/mL($r=0.999\ 7$, $n=6$), 2.28~72.88 μg/mL($r=1.000\ 0$, $n=6$)范围内与峰面积线性关系良好, 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%, 平均回收率分别为100.18%, 98.63%, 99.34%, RSD分别为1.47%, 2.09%, 2.17%($n=9$)。结论 所建立的方法能有效控制其中的活性成分, 前处理简单, 重复性好, 准确度高, 可用于同时测定鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷的含量, 完善其质量标准。

关键词:反相高效液相色谱法; 鼻咽清颗粒; 龙胆苦苷; 迷迭香酸; 蒙花苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)21-0062-04

Simultaneous Determination of Gentiopicroside, Rosmarinic Acid and Buddleoside in Biyanqing Granules by RP-HPLC

ZHANG Lijuan¹, LAN Xianquan², ZHENG Jinkun¹, QUE Weiqi¹, LI Qingde¹, ZHU Yan²

(1. Yue Bei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong, China 512026; 2. Shaoguan Institute for Food and Drug Control, Shaoguan, Guangdong, China 512028)

Abstract: Objective To establish a reverse-phase liquid chromatography(RP-HPLC) method for simultaneously determination of gentiopicroside, rosmarinic acid and buddleoside in Biyanqing Granules. **Methods** The chromatographic column was ACE Excel C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 274 nm for gentiopicroside (0-20 min) and 334 nm for rosmarinic acid and buddleoside (20-40 min), the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The mass concentration of gentiopicroside, rosmarinic acid and buddleoside showed a good linear relationship with the peak area in the ranges of 5.29-169.34 μg/mL ($r=1.000\ 0$, $n=6$), 1.00-32.09 μg/mL ($r=0.999\ 7$, $n=6$), 2.28-72.88 μg/mL ($r=1.000\ 0$, $n=6$), respectively. The RSDs of precision, stability and

*基金项目: 广东省医院药学研究基金资助项目[2019A29]; 广东省韶关市卫生计生科研项目[Y19051]。

第一作者: 张丽娟, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电话)0751-6913031(电子信箱)958271825@qq.com。

△通信作者: 蓝献泉, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品检验, (电话)0751-8722385(电子信箱)179089973@qq.com。

收介质时, 经过透皮试验, 通过高效液相色谱法测定体外透皮试验各组接收液中盐酸芦氟沙星的含量, 计算透过率, 表明盐酸芦氟沙星膜具有良好的昆明种小鼠皮肤透过性。

参考文献

- [1] 徐建春, 卢启明, 付立杰, 等. 前列解毒胶囊联合芦氟沙星治疗慢性前列腺炎的随机双盲对照临床观察[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(2): 183-186.
- [2] 侯昌元, 李红玉. 盐酸米诺环素膜剂的制备与质量控制[J]. 中国药师, 2011, 14(6): 821-823.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 320.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 447.
- [5] 中央军委后勤保障部卫生局. 中国人民解放军医疗机构制剂规范[M]. 北京: 人民军医出版社, 2016: 238-234.

- [6] 甘春英, 王刚, 杜士明, 等. 氟比洛芬透皮贴剂的质量控制及体外透皮试验[J]. 中国药师, 2012, 15(6): 840-843.
- [7] 周密, 徐晓勇, 马凤森, 等. 雷公藤涂膜剂的制备及其体外透皮试验[J]. 中成药, 2015, 37(3): 536-529.
- [8] 吴莹, 肖学成. 醋酸曲安奈德益康唑乳膏体外透皮吸收的评价试验[J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(2): 36-40.
- [9] 贺亚静, 武学鑫, 周洁, 等. 复方利多卡因乳膏体外透皮研究[J]. 中国药业, 2015, 24(15): 19-21.
- [10] 金伟华, 蒲志强, 陈华, 等. 盐酸溴己新滴鼻剂的研制及含量测定与透皮性能评价[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(2): 166-169.
- [11] 于波涛, 范开华, 金伟华, 等. 氮酮用量对马尼地平乳膏离体透皮吸收影响的研究[J]. 西南国防医药, 2011, 21(3): 250-252.
- [12] 张志荣. 药剂学(第2版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2016: 236-239.

(收稿日期: 2020-12-03; 修回日期: 2021-06-18)

repeatability tests were less than 2.0%. The average recoveries of gentiopicroside, rosmarinic acid and buddleoside were 100.18%, 98.63%, 99.34% with RSDs of 1.47%, 2.09%, 2.17% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The established method can effectively control the active components, with simple pretreatment, good repeatability and high accuracy, which can be used for the simultaneous determination of gentiopicroside, rosmarinic acid and buddleoside in Biyanqing Granules and improve the quality standard.

Key words: RP-HPLC; Biyanqing Granules; gentiopicroside; rosmarinic acid; buddleoside; content determination

鼻咽清颗粒为粤北人民医院的特色制剂(粤药制字Z20071539),由重楼、夏枯草、野菊花、龙胆、两面针、蛇泡勒、太子参、苍耳子8味中药组方,用于治疗鼻咽部慢性炎症及鼻咽癌放射治疗后分泌物增多,可抑制鼻咽癌的生长,且具有放疗增敏作用^[1]。方中龙胆具有清热燥湿、泻肝胆火等功效,有效成分为龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、当药苷等环烯醚萜苷类化合物。龙胆苦苷具有良好的抗氧化应激、抗肝损伤、抗肿瘤等药理作用^[2-3],含量高,与龙胆药材药理作用一致,常作为评价龙胆药材质量的重要指标。夏枯草性寒,味辛、苦,归肝胆经,善清肝火、散郁结,主要活性成分迷迭香酸为典型的酚酸类物质,具有较强的抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤活性^[4-5]。野菊花清热解毒,主要活性成分蒙花苷具有抗炎、免疫、保肝、抗肿瘤、抗菌等多种药理作用^[6]。现行质量标准对夏枯草和两面针的薄层鉴别,未对组方成分进行含量测定,不利于质量控制。本研究中参考文献[7-13],采用反相高效液相色谱双波长法同时测定鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷3种活性成分的含量,并确定其含量限度,为进一步完善该制剂的标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);MSA225S-ICE-DU型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);AS10200ADT型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率为300 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

鼻咽清颗粒(粤北人民医院医院制剂,批号分别为20190325,20191227,20200520);龙胆苦苷对照品(批号为110770-201918,含量以97.1%计),迷迭香酸对照品(批号为111871-201706,含量以90.05%计),蒙花苷对照品(批号为111528-201509,含量以97.50%计),均购自中国食品药品检定研究院。龙胆(批号为20200524),两面针(批号为15042806),野菊花(批号为20200501),苍耳子(批号为20180603),均购自湖南安健中药饮片有限责任公司;重楼(樟树市庆仁中药饮片有限公司,批号为1406248);夏枯草(安徽鑫泰药业有限公司,批号为200701);蛇泡勒(广州至信中药饮片有限公司,批号为200401);太子参(江西致和堂中药饮片有限公司,批号为200701);甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:ACE Excel C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min时10% A,5~10 min时10% A→15% A,10~13 min时15% A,13~18 min时15% A→22% A,18~20 min时22% A,20~30 min时22% A→30% A,30~40 min时30% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:274 nm(0~20 min时龙胆苦苷),334 nm(20~40 min时迷迭香酸和蒙花苷);柱温:30℃;进样量:10 μL。各组分与相邻峰之间分离度均大于1.5,龙胆苦苷、迷迭香酸、蒙花苷的理论板数均不低于10 000。

2.2 溶液制备

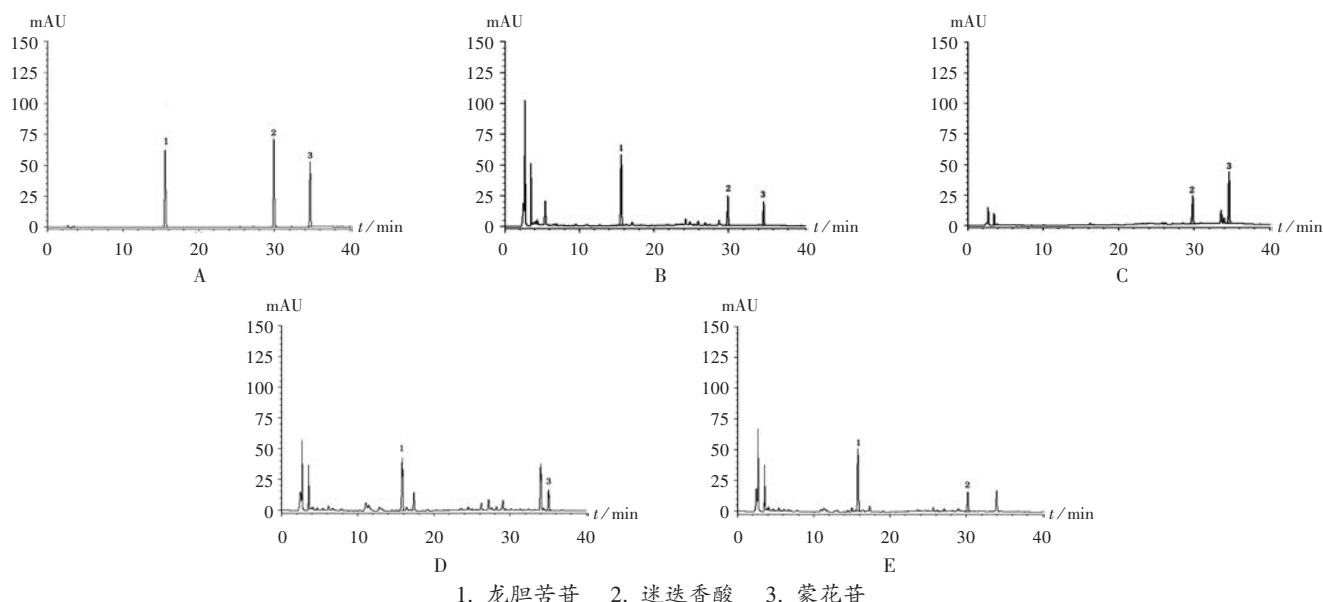
取龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷对照品各适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为0.529 2,0.100 3,0.227 8 mg/mL的混合对照品贮备液;分别精密量取上述对照品贮备液0.25,0.50,1.00,2.00,4.00,8.00 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得混合对照品溶液。取样品2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,室温超声处理30 min后取出,放冷,补足减失的质量,摇匀,滤过,即得供试品溶液。按处方比例及工艺分别制备不含龙胆、夏枯草和野菊花的阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样分析。结果龙胆、夏枯草和野菊花阴性对照品溶液均无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定6次,以对照品溶液质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。结果龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷的线性回归方程分别为 $Y_{\text{龙}}=14131X_{\text{龙}}+4349(r=1.0000, n=6)$, $Y_{\text{迷}}=83851X_{\text{迷}}-18242(r=0.9997, n=6)$, $Y_{\text{蒙}}=24770X_{\text{蒙}}-999(r=1.0000, n=6)$ 。结果表明,龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷质量浓度分别在5.29~169.34 μg/mL, 1.00~32.09 μg/mL, 2.28~72.88 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。结果龙胆



1. 龙胆苦苷 2. 迷迭香酸 3. 蒙花苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-E. 阴性对照品溶液(分别缺龙胆、夏枯草、野菊花)

图1 高效液相色谱图

1. gentiopicroside 2. rosmarinic acid 3. buddleioside

A. Mixed reference solution B. Test solution C-E. Negative reference solution(lacking Gentianae Radix Et Rhizoma, Prunellae, and Chrysanthemi Indici Flos)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test($n=9$)

取样量 (g)	样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1.012 9	0.218 8	0.042 6	0.088 4	0.132 3	0.025 1	0.057 0	0.355 2	0.067 7	0.145 8	103.10	100.00	100.70						
1.023 1	0.221 0	0.043 1	0.089 3	0.132 3	0.025 1	0.057 0	0.351 3	0.068 3	0.144 0	98.49	100.40	95.96						
1.003 7	0.216 8	0.042 3	0.087 6	0.132 3	0.025 1	0.057 0	0.348 9	0.067 1	0.143 5	99.85	98.80	98.07						
1.006 6	0.217 4	0.042 4	0.087 9	0.211 7	0.040 1	0.091 1	0.426 6	0.081 2	0.176 7	98.82	96.76	97.48						
1.021 2	0.220 6	0.043 0	0.089 2	0.211 7	0.040 1	0.091 1	0.433 2	0.084 0	0.179 0	100.43	102.24	98.57	100.18	98.63	99.34	1.47	2.09	2.17
1.025 7	0.221 6	0.043 2	0.089 5	0.211 7	0.040 1	0.091 1	0.436 5	0.081 6	0.180 8	101.51	95.76	100.22						
1.016 4	0.219 5	0.042 8	0.088 7	0.291 1	0.055 2	0.125 3	0.510 0	0.097 4	0.213 3	99.79	98.91	99.44						
1.010 2	0.218 2	0.042 5	0.088 2	0.291 1	0.055 2	0.125 3	0.506 1	0.095 9	0.217 8	98.90	96.74	103.43						
1.011 4	0.218 5	0.042 6	0.088 3	0.291 1	0.055 2	0.125 3	0.511 7	0.096 7	0.213 8	100.72	98.01	100.16						

注:A为龙胆苦苷,B为迷迭香酸,C为蒙花苷。

Note:A is gentiopicroside,B is rosmarinic acid,and C is buddleioside.

苦苷、迷迭香酸和蒙花苷的峰面积基本不变, RSD 分别为0.06%,0.22%,0.22% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20191227)样品2g,精密称定,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。结果龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷含量的 RSD 分别为0.87%,1.10%,1.43% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20191227)样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,16,24h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷峰面积的 RSD 分别

为0.25%,0.26%,0.39% ($n=7$),表明供试品溶液在常温下放置24h稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20191227)1g,精密称定,共9份,分别精密加入混合对照品贮备液0.25,0.40,0.55mL,各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下方法进样测定,并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20190325,20191227,20200520)样品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图,并计算样品含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab. 2 Content determination of gentiopicroside, rosmarinic acid and buddleioside in the samples(mg/g, n=3)

批号	龙胆苦苷	迷迭香酸	蒙花苷
20190325	0.344 0	0.032 1	0.057 7
20191227	0.216 0	0.042 1	0.087 3
20200520	0.292 0	0.036 0	0.050 4
$\bar{X}$	0.284 0	0.036 7	0.065 1

3 讨论

3.1 检测波长选择

中成药多为复方制剂,成分多且复杂,单一波长有时无法同时检测多种组分。故采用双波长切换法可极大地提高检测效率。分别配制含龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷质量浓度为20 μg/mL的对照品溶液和供试品溶液,用二极管阵列检测器于200~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描。结果显示,迷迭香酸、蒙花苷、龙胆苦苷分别在330,334,274 nm波长处有最大吸收,但龙胆苦苷于330 nm波长附近几乎无吸收。故选定274 nm(0~20 min)和334 nm(21~40 min)作为检测波长。

3.2 流动相选择

曾考察甲醇-水、乙腈-0.1%三氟乙酸、乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相系统,梯度洗脱。结果采用甲醇-水流动相系统时,迷迭香酸不出峰;采用乙腈-0.1%三氟乙酸和乙腈-0.1%磷酸水溶液系统时,3种目标组分的分离效果均良好,峰形尖锐且对称,定量结果准确。考虑三氟乙酸具有轻微的毒性,故采用乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相系统。

3.3 提取条件选择

分别考察以100%,75%,50%甲醇作为溶剂时对鼻咽清颗粒中3种成分的提取效果。结果表明,100%甲醇时蒙花苷提取效果明显优于另外2种溶剂,而龙胆苦苷和迷迭香酸则无明显差异,故选择甲醇作为提取溶剂。确定提取溶剂后,分别考察超声处理15,30,60 min和加热回流30,60,90 min的提取效果。结果表明,超声处理30 min和加热回流60 min对3种有效成分基本提取完全,数据无明显差异。考虑超声操作简易方便,故选定超声处理30 min。

3.4 含量限度确定

方中龙胆、夏枯草和野菊花均收载于2015年版《中国药典(一部)》^[14],含量测定指标成分分别为龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷,按照药典规定的含量测定方法对这3味药材进行检测,结果均大于药典规定的限值。根据公式[转移率(%)=成药中被测物质的含量/(药材被测物质的含量×处方量)×100%]分别计算转移率,结果龙胆苦苷、迷迭香酸、蒙花苷的转移率分别为

32.16%~51.16%,33.43%~43.85%,26.25%~45.47%。考虑药材质量及工艺提取率,暂将限度定为2015年版《中国药典(一部)》规定药材含量的限值×处方量×平均转移率,最终将鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷含量的限度定为0.200,0.024,0.043 mg/g。为了确保限值制订的合理性,以后将继续扩大样本量研究。

3.5 方法学评价

本研究中建立了同时测定样品中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷含量的双波长反相高效液相色谱法,能有效定量控制其中的活性成分,且该方法前处理简单,重复性好,准确度高,可用于鼻咽清颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 范彩霞,陈志喜,范世平,等.鼻咽清颗粒对鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的放疗增敏作用及机制研究[J].药物评价研究,2017,40(12):1688-1694.
- [2] 姜丽丽,任朋英,王语哲,等.龙胆药理作用研究进展[J].科学技术创新,2019(36):43-44.
- [3] 曾文雪,宋小玲,张尧,等.龙胆苦苷药理学活性及药动学研究进展[J].江西中医药,2014,45(3):69-71.
- [4] 马伟,刘西岭,邵国泉,等.夏枯草的化学成分研究进展[J].赤峰学院学报,2018,34(12):31-32.
- [5] 唐双意,李清,刘滔滔,等.迷迭香提取物的抗肿瘤作用与机制研究进展[J].中国药业,2019,28(15):1-5.
- [6] 袁慧杰,赖志辉,管艳艳,等.野菊花主要活性成分的药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2018,36(3):651-653.
- [7] 陈海燕,李冰.高效液相色谱法测定鼻咽清毒剂中4种活性成分的含量[J].中南药学,2015,13(3):303-306.
- [8] 陈万发,李振雨,魏梅,等.夏枯草中迷迭香酸含量测定及UPLC特征图谱研究[J].今日药学,2019,29(9):613-616.
- [9] 张艳娇,黄宽,向润清,等.反相高效液相色谱法测定不同煎煮时间夏枯草中丹参素、咖啡酸、迷迭香酸含量[J].中国中医药信息杂志,2020,27(2):64-67.
- [10] 王慧,李洋,周燕妮,等.用HPLC法同时测定扶正平消胶囊中龙胆苦苷和迷迭香酸的含量[J].药学服务与研究,2015,15(6):436-438.
- [11] 王文月,刘志宏,黄爱文,等.双波长HPLC法测定酸性龙胆合剂中龙胆苦苷和橙皮苷的含量[J].中国药房,2015,26(9):1241-1243.
- [12] 梁建丽,陆石英,李雪玲,等.HPLC法同时测定野菊花配方颗粒中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(6):69-71.
- [13] 邓俊杰.HPLC双波长法同时测定炎热清片中6种有效成分的含量[J].中国现代应用药学,2018,35(9):1329-1332.
- [14] 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,2015:96,280,315.

(收稿日期:2020-11-11;修回日期:2021-03-19)