

高效液相色谱法测定小儿金丹片中橙皮苷和牛蒡苷的含量

杨庆胜, 张京健, 赵雪晖

(河南仲景药业股份有限公司, 郑州 450001)

[摘要] 目的: 建立小儿金丹片中橙皮苷、牛蒡苷的含量测定方法。方法: Diamonsil-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(45:55); 检测波长为 284 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为室温; 流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果: 橙皮苷对照品在 0.12 ~ 1.08 μg 范围内, 进样量与峰面积间呈良好的线性关系, $r = 0.9999$, 平均回收率为 99.2%; 牛蒡苷对照品在 0.16 ~ 1.44 μg 范围内, 进样量与峰面积间呈良好的线性关系, $r = 0.9998$, 平均回收率为 98.9%。结论: 本方法操作简便, 结果准确, 重现性好, 可作为该制剂的含量测定方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 小儿金丹片; 橙皮苷; 牛蒡苷; 含量测定

[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2008)01-0060-03

Determination of hesperidin and arctiin in Xiaoer Jindan Pian by HPLC

YANG Qing-sheng, ZHANG Jing-jian, ZHAO Xue-hui

(Henan Zhongjing Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of hesperidin and arctiin in Xiaoer Jindan Pian. **Methods:** The separation was performed on a Diamonsil-C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 25 °C. The mobile phase was methanol-water(45:55) at the flow rate of 0.1 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was 284 nm. **Results:** Hesperidin showed a linear relationship in the range of 0.12 ~ 1.08 μg ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.2%. Arctiin showed a linear relationship in the range of 0.16 ~ 1.44 μg ($r = 0.9998$). The average recovery was 98.9%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and good reproducible. It can be applied to the determination of hesperidin and arctiin in Xiaoer Jindan Pian.

[Key words] high performance liquid chromatography; Xiaoer Jindan Pian; hesperidin; arctiin; determination content

小儿金丹片是收载于《中华人民共和国药典》2005 年版一部的品种, 处方由朱砂、橘红、川贝母、胆南星、葛根、牛蒡子、荆芥穗、钩藤等 26 味中药组成, 具有祛风化痰、清热解毒之功效, 用于外感风热, 痰火内盛所致的感冒, 症见发热、头痛、咳嗽、气喘、咽喉肿痛、呕吐及高热惊风^[1]。橘红、牛蒡子为本方的臣药, 橘红具有抗炎、抗溃疡、利胆的作用^[2]; 牛蒡子具有抗菌、抗病毒的作用^[3], 橙皮苷、牛蒡苷分别为橘红、牛蒡子的特征性有效成分。原标准中无橘红、牛蒡子含量测定指标, 为了控制小儿金丹片的质量, 保证其疗效, 本实验在对该品种进行研究提高的过程中, 采用高效液相色谱法同一条件下测定了橙皮苷、牛蒡苷在该制剂中的含量, 并对测定方法学进行了研究。

仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(单元泵, 手动进样器, 紫外检测器, Agilent 色谱工作站, 美国安捷伦公司)。橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,

批号: 110721-200211, 供含量测定用); 牛蒡苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110819-200303, 供含量测定用); 小儿金丹片 3 批及缺橘红、牛蒡子的阴性样品, 均为研制产品时自制。流动相用甲醇为色谱纯(天津四友公司); 其他试剂均为分析纯; 水为自制重蒸馏水。

方法与结果

1 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 瑞士迪马公司), 流动相为甲醇-水(45:55), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 284 nm, 柱温为室温, 进样量为 10 μL。理论塔板数按橙皮苷峰计算应 ≥ 2 000。

2 对照品溶液的制备

精密称取橙皮苷对照品 6.0 mg, 牛蒡苷对照品 8.0 mg, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得混合对照品原液(橙皮苷 0.60 mg·mL⁻¹, 牛蒡

苷 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。取混合对照品原液 1 mL 用甲醇稀释至 10 mL , 作为混合对照品溶液 (橙皮苷 $60.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 牛蒡苷 $80.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

3 供试品溶液的制备

取本品 10 片, 研细, 混匀, 取细粉约 1.0 g , 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL , 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W , 频率 33 kHz) 30 min , 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜 ($0.45 \mu\text{m}$) 滤过, 取续滤液, 即得。

4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 $2, 6, 10, 14, 18 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 按 HPLC 条件, 进样分析, 记录峰面积。以进样量 (X) 与对应的峰面积 (Y) 作回归处理, 得到 2 条标准曲线。橙皮苷回归方程为: $Y = 289.02X - 20.95, r = 0.9999 (n = 5)$; 牛蒡苷回归方程为: $Y = 2192.98X - 64.04, r = 0.9998 (n = 5)$ 。结果表明, 橙皮苷在 $0.12 \sim 1.08 \mu\text{g}$ 范围内, 牛蒡苷在 $0.16 \sim 1.44 \mu\text{g}$ 范围内, 进样量与峰面积间均呈良好的线性关系。

5 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液 $10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱

仪, 测定峰面积值, 重复进样 6 次, 结果橙皮苷 RSD 为 $1.3\% (n = 6)$, 牛蒡苷 RSD 为 $1.7\% (n = 6)$ 。表明本法精密度较好。

6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 $0, 1, 2, 4, 6, 8 \text{ h}$ 进样 $10 \mu\text{L}$, 测定橙皮苷、牛蒡苷的峰面积, 结果橙皮苷 RSD 为 $1.4\% (n = 6)$, 牛蒡苷 RSD 为 $2.0\% (n = 6)$ 。可见供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

7 重复性试验

对同一批样品, 平行制备 5 份供试液, 分别取 $10.0 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 进行含量测定, 结果橙皮苷含量 RSD 为 $1.4\% (n = 5)$, 牛蒡苷含量 RSD 为 $1.9\% (n = 5)$ 。表明本法重复性较好。

8 阴性对照试验

取缺橘红、牛蒡子的处方药材, 按工艺制备制成缺橘红、牛蒡子的阴性制剂, 照供试品溶液制备方法制成阴性溶液, 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性溶液各 $10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 按上述条件进行测定, 记录色谱图, 从色谱图中可以看出, 方中其他成分在本测定条件下, 对橙皮苷、牛蒡苷的含量测定无干扰。见图 1。

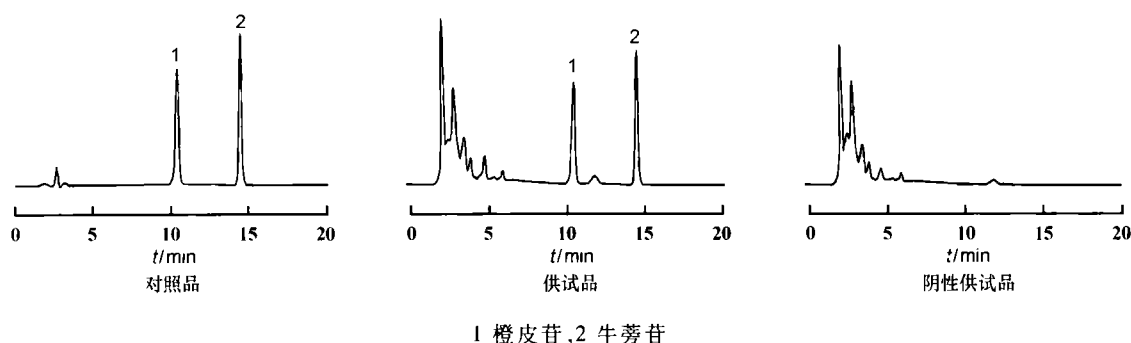


图 1 阴性对照试验的 HPLC 色谱图

9 加样回收率试验

分别精密称取已知含量 (橙皮苷含量 $1.1625 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 牛蒡苷含量 $1.6450 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的同一批号样品 5 份, 每份约 0.5 g , 均精密称定, 分别精密加入混合对照品原液 (橙皮苷 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 牛蒡苷 0.80

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.0 mL , 照供试品溶液的制备方法, 分别吸取供试品液各 $10.0 \mu\text{L}$, 按照上述色谱条件, 测定橙皮苷、牛蒡苷的含量, 分别计算加样回收率, 橙皮苷加样回收率试验和牛蒡苷加样回收率试验的结果见表 1 和表 2。

表 1 橙皮苷加样回收率试验

样品量/g	样品中橙皮苷量/mg	橙皮苷加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.5008	0.5822	0.60	1.1682	97.67	99.2	1.2
0.4987	0.5797	0.60	1.1716	98.64		
0.4991	0.5802	0.60	1.1836	100.57		
0.5039	0.5858	0.60	1.1856	99.97		
0.5062	0.5885	0.60	1.1822	98.96		

表 2 牛蒡苷加样回收率试验

样品量/g	样品中牛蒡苷量/mg	牛蒡苷加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.500 8	0.823 8	0.80	1.611 6	98.47		
0.498 7	0.820 4	0.80	1.623 5	100.39		
0.499 1	0.821 0	0.80	1.618 7	99.71	98.9	1.2
0.503 9	0.828 9	0.80	1.608 6	97.46		
0.506 2	0.832 7	0.80	1.621 2	98.56		

10 供试样品的含量测定

分别取不同批号的样品,按供试品溶液制备方法制备。精密吸取对照品溶液和各供试品溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,分别测定各样品中橙皮苷和牛蒡苷的含量,测定结果见表 3。

表 3 3 批供试品中橙皮苷和牛蒡苷的含量测定结果

样品批号	橙皮苷含量(mg/片)	RSD/%	牛蒡苷含量(mg/片)	RSD/%
050516	0.33	1.3	0.48	1.6
050518	0.35	1.4	0.49	1.8
050520	0.35	1.5	0.50	2.0

小儿金丹片规格:0.3 g/片

讨 论

根据对橙皮苷、牛蒡苷对照品溶液的紫外扫描结果及文献[4,5]资料显示,橙皮苷的最大吸收波长为 284 nm,牛蒡苷的最大吸收波长为 280 nm,二者的检测波长非常接近,因此,以 284 nm 波长检测,橙皮苷、牛蒡苷都有最大吸收,峰形较好,在测定橙皮苷的同时,也能测定出牛蒡苷的含量,对控制产品的质量有实际的意义。

本实验在供试品溶液的制备过程中,曾选用甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇和水分别超声处理 30 min,结果 5 种方法所得供试液色谱基本一致,20 min 内色谱峰已出完。以甲醇超声提取的供试液测定值最高,故确定以甲醇为超声处理的溶剂。

以甲醇为溶剂,分别超声处理 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,然后分别测定各供试溶液中橙皮苷和牛蒡苷的含量,结果在 10 ~ 30 min 之间,含量逐渐增高;在 30 ~ 60 min 之间,含量增加很小,基本稳定,

因此超声处理 30 min 基本能提取完全,故确定超声处理时间为 30 min。

已有文献报道橙皮苷^[6]和牛蒡苷^[7]的含量测定方法,本研究曾选用不同比例的甲醇-水^[4,5]、乙腈-水^[8]、乙腈-0.2% 磷酸溶液^[9]等系统为流动相进行比较,结果表明,以甲醇-水(45:55)作为流动相时,橙皮苷、牛蒡苷分离效果好、峰形较好、出峰时间适当,因此选择甲醇-水(45:55)作为流动相。

【作者简介】 杨庆胜(1969-),男,副主任药师,主要从事中药的成分分析与新产品开发。联系电话:13613841299, E-mail:yangqsheng@126.com。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2005 年版. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:345-346.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:2637-2640.
- [3] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社,1997:1049-1052.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2005 年版. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:48-49.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2005 年版. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:117-118.
- [6] 祝德秋,罗启剑,李肖玲,等. HPLC 法测定舒胆颗粒中橙皮苷的含量[J]. 中国新药杂志,2004,13(5):428-429.
- [7] 杨庆胜,赵雪晖,李彩荣. HPLC 法测定凉血祛风糖浆中牛蒡苷的含量[J]. 中国新药杂志,2005,14(8):1033-1035.
- [8] 王铁军,郭绪林. 高效液相色谱法测定增生消散液中橙皮苷的含量[J]. 中国中药杂志,1997,22(1):32-34.
- [9] 赵岚,章曙丹,倪晟. HPLC 法测定凉解感冒合剂中牛蒡子苷的含量[J]. 中国现代应用药学,1997,14(1):47-48.

编辑:周卓/接受日期:2007-08-10