

UPLC法同时测定清喉利咽颗粒中5种成分的含量

牛小花*,陈洪源#,段玉平,黄 娇(重庆三峡医药高等专科学校药理学系,重庆 404100)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4282-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.34

摘要 目的:建立同时测定清喉利咽颗粒中没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为0.40 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为1 μl。结果:没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷检测进样量线性范围分别为0.048~0.480 μg($r=0.999\ 3$)、0.012~0.120 μg($r=0.999\ 9$)、0.016~0.160 μg($r=0.999\ 8$)、0.022~0.220 μg($r=0.999\ 9$)、0.072~0.720 μg($r=0.999\ 2$);定量限分别2.4、1.6、1.8、1.8、1.6 ng,检测限分别为7.5、5.0、5.6、5.6、5.0 ng;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为96.64%~102.02%(RSD=2.00%, $n=6$)、95.86%~102.56%(RSD=2.86%, $n=6$)、97.24%~102.54%(RSD=2.10%, $n=6$)、97.44%~102.60%(RSD=2.40%, $n=6$)、96.91%~103.13%(RSD=2.62%, $n=6$)。结论:该方法快速、准确,可用于同时测定清喉利咽颗粒中没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷的含量。

关键词 超高效液相色谱法;清喉利咽颗粒;没食子酸;橙皮苷;新橙皮苷;柚皮苷;黄芩苷

Contents Determination of Five Components in Qinghou Liyan Granule by UPLC

NIU Xiaohua, CHEN Hongyuan, DUAN Yuping, HUANG Jiao(Dept. of Pharmacy, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of gallic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin and baicalin in Qinghou liyan granule. METHODS: UPLC was performed on the column of ACQUITY UPLC BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 0.40 ml/min, detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 1 μl. RESULTS: The linear range was 0.048-0.480 μg for gallic acid ($r=0.999\ 3$), 0.012-0.120 μg for naringin ($r=0.999\ 9$), 0.016-0.160 μg for hesperidin ($r=0.999\ 8$), 0.022-0.220 μg for neohesperidin ($r=0.999\ 9$) and 0.072-0.720 μg for baicalin ($r=0.999\ 2$); limit of quantitation was 2.4, 1.6, 1.8, 1.8, 1.6 ng, limit of detection was 7.5, 5.0, 5.6, 5.6, 5.0 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no lower than 3.0%; recoveries were 96.64%-102.02% (RSD=2.00%, $n=6$), 95.86%-102.56% (RSD=2.86%, $n=6$), 97.24%-102.54% (RSD=2.10%, $n=6$), 97.44%-102.60% (RSD=2.40%, $n=6$) and 96.91%-103.13% (RSD=2.62%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid and accurate, and can be used for the simultaneous determination of gallic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin and baicalin in Qinghou liyan granule.

KEYWORDS UPLC; Qinghou liyan granule; Gallic acid; Naringin; Hesperidin; Neohesperidin; Baicalin

清喉利咽颗粒是由黄芩、西青果、桔梗、竹茹、胖大海、橘红、枳壳等13味中药材组成,具有清热利咽、宽胸润喉的功效;常用于治疗外感风热所致的咽喉发干、声音嘶哑、急慢性咽喉炎、扁桃体炎等症,常用有保护声带的作用。清喉利咽颗粒收载于2015年版《中国药典》(一部)^[1]以及《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》(第17册)^[2]中,均仅将黄芩苷作为其质量控制指标,不能有效控制清喉利咽颗粒的质量;同时,超高效液相色谱法(UPLC)相比传统高效液相色谱法(HPLC)具有柱效高、分析时间短等优点^[3-4]。为更好地控制该制剂的质量,笔者采用UPLC法建立了同时测定清喉利咽颗粒中黄芩苷、没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-CLASS 型 UPLC 仪,包括 QSM 四元溶剂管理器、PDA eλ 二极管阵列检测器、SM-FTN 样品管理器、

* 讲师,硕士。研究方向:中药提取纯化。电话:023-58567305。E-mail: Xiahua_206@163.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:中药化学成分分析。电话:023-58556066。E-mail: Chyuan123@163.com

CH-A 型柱温箱、Empower3 色谱工作站(美国 Waters 公司);BP211D 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-100DE 型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz);DISCOVER-III/IV 型实验室专用超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

清喉利咽颗粒(桂龙药业有限公司,批号:141206、141218、150124、150128、150425、150508、150515、150810,规格:5 g/袋);没食子酸对照品(上海金穗生物科技有限公司,批号:20140412,纯度≥98.0%);柚皮苷对照品(批号: MUST-12030914,纯度≥98.0%);橙皮苷对照品(批号: MUST-11030701,纯度>98.0%);新橙皮苷对照品(批号: MUST-12040812,纯度≥98.0%);黄芩苷对照品(批号: MUST-12040812,纯度≥98.0%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈、磷酸均为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0 min, 10%

A; 8 min, 40% A); 流速: 0.40 ml/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 1 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷对照品适量, 置于同一 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 制成每 1 ml 含没食子酸 240 μg、柚皮苷 60 μg、橙皮苷 80 μg、新橙皮苷 110 μg、黄芩苷 360 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品约 0.5 g, 精密称定, 置于 25 ml 量瓶中, 加甲醇 20 ml, 超声处理 30 min, 放冷后加甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例制备缺西青果、黄芩、橘红、枳壳的阴性样品, 再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, 在该色谱条件下, 各成分均能达到基线分离, 分离度 > 1.5; 理论板数以黄芩苷峰计 ≥ 20 000, 保留时间为 7.154 min。结果表明, 其他成分对测定无干扰。

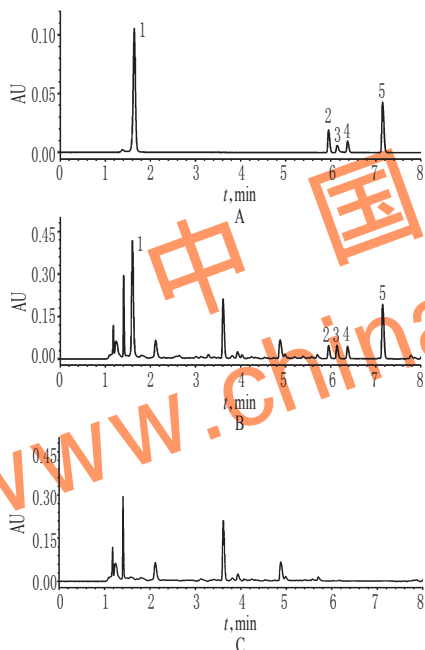


图 1 超高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 没食子酸; 2. 柚皮苷; 3. 橙皮苷; 4. 新橙皮苷; 5. 黄芩苷

Fig 1 UPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. gallic acid; 2. naringin; 3. hesperidin; 4. neohesperidin; 5. baicalin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得系列线性溶液, 取上述溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 回归方程与线性范围见表 1。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 等倍逐步稀释, 按

“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 10:1 时, 得定量限(LOQ); 当信噪比为 3:1 时, 得检测限(LOD), 结果见表 2。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear rang

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
没食子酸	$y=6\ 133.71x-101\ 239.54$	0.999 3	0.048~0.480
柚皮苷	$y=5\ 225.90x+1\ 755.64$	0.999 9	0.012~0.120
橙皮苷	$y=2\ 644.86x+46.25$	0.999 8	0.016~0.160
新橙皮苷	$y=2\ 615.13x-718.92$	0.999 9	0.022~0.220
黄芩苷	$y=4\ 255.60x+4\ 977.36$	0.999 2	0.072~0.720

表 2 定量限与检测限测定结果

Tab 2 Determination results of quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ, ng	LOD, ng
没食子酸	2.4	7.5
柚皮苷	1.6	5.0
橙皮苷	1.8	5.6
新橙皮苷	1.8	5.6
黄芩苷	1.6	5.0

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.81%、1.16%、1.34%、1.08%、1.50% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、16、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 2.05%、1.54%、2.07%、1.80%、1.66% ($n=6$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取样品(批号: 141206)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算平均含量。结果, 没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的平均含量分别为 11.22、2.89、2.93、2.88、7.39 mg/g, RSD 分别为 2.01%、1.68%、1.94%、2.08%、2.20% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号: 141206)适量, 共 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别置于 25 ml 量瓶中, 加入一定质量的没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 3。

2.10 样品含量测定

取 8 批样品各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本试验考察了甲醇-水、乙腈-水以及不同浓度乙腈-磷酸作为流动相时对 5 种成分分离度的影响。结果, 乙腈-0.1% 磷

酸作为流动相时,5种成分分离效果最佳,峰型较好。因此,本试验选择乙腈-0.1%磷酸作为流动相。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Result of the recovery tests(n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
没食子酸	0.250 3	2.808 4	2.456 0	5.204 6	97.87	98.29	2.00
	0.250 8	2.814 0	2.456 0	5.326 8	102.02		
	0.250 0	2.805 0	2.456 0	5.220 4	98.55		
	0.249 8	2.802 8	2.456 0	5.164 5	96.64		
	0.250 8	2.814 0	2.456 0	5.181 2	96.84		
	0.250 1	2.806 1	2.456 0	5.200 1	97.79		
柚皮苷	0.250 3	0.723 4	0.702 0	1.421 5	99.46	99.70	2.86
	0.250 8	0.724 8	0.702 0	1.396 8	95.86		
	0.250 0	0.722 5	0.702 0	1.443 0	102.56		
	0.249 8	0.721 9	0.702 0	1.441 2	102.40		
	0.250 8	0.724 8	0.702 0	1.403 6	96.80		
	0.250 1	0.722 8	0.702 0	1.432 8	101.11		
橙皮苷	0.250 3	0.733 4	0.730 2	1.482 2	102.54	99.59	2.10
	0.250 8	0.734 8	0.730 2	1.445 1	97.29		
	0.250 0	0.732 5	0.730 2	1.442 5	97.24		
	0.249 8	0.731 9	0.730 2	1.459 7	99.67		
	0.250 8	0.734 8	0.730 2	1.462 4	99.65		
	0.250 1	0.732 8	0.730 2	1.471 2	101.12		
新橙皮苷	0.250 3	0.720 9	0.705 4	1.442 6	102.26	99.97	2.40
	0.250 8	0.722 3	0.705 4	1.416 4	98.44		
	0.250 0	0.720 0	0.705 4	1.436 2	101.50		
	0.249 8	0.719 4	0.705 4	1.443 5	102.60		
	0.250 8	0.722 3	0.705 4	1.409 2	97.44		
	0.250 1	0.720 3	0.705 4	1.408 4	97.60		
黄芩苷	0.250 3	1.849 7	1.886 4	3.678 9	96.91	98.82	2.62
	0.250 8	1.853 4	1.886 4	3.692 1	97.43		
	0.250 0	1.847 5	1.886 4	3.751 0	100.93		
	0.249 8	1.846 0	1.886 4	3.680 4	97.18		
	0.250 8	1.853 4	1.886 4	3.690 1	97.32		
	0.250 1	1.848 2	1.886 4	3.792 5	103.13		

表4 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 4 Results of contents determination of sample(n=3,mg/g)

样品批号	没食子酸	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	黄芩苷
141206	11.54	2.70	2.80	2.58	7.08
141218	10.54	2.56	2.68	2.80	6.84
150124	11.22	2.89	2.93	2.88	7.39
150128	11.40	2.75	2.76	2.50	7.45
150425	10.81	2.62	2.71	2.64	7.16
150508	10.06	3.08	2.83	2.76	6.72
150515	10.42	2.80	2.78	2.65	7.08
150810	10.85	2.95	2.68	2.71	6.85

3.2 检测波长的选择

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,在210~400 nm波长范围内进行全波长扫描。结果显示,没食子酸的最大吸收峰为271 nm,柚皮苷的最大吸收峰为283 nm,橙皮苷的最大吸收峰为284 nm,新橙皮苷的最大吸收峰为284 nm,黄芩苷的最大吸收峰为277 nm,这5种待测成分在280 nm附近均有最大吸收,故本试验选择280 nm为检测波长。

3.3 阴性样品的制备

清喉利咽颗粒中黄芩含黄芩苷^[5-6],西青果含没食子酸^[7],橘红含柚皮苷^[8-9],枳壳含橙皮苷和新橙皮苷^[10-11],故阴性样品

为缺此四者的样品。

3.4 待测成分的选择

查阅相关文献^[12-13],已有关于清喉利咽颗粒中黄芩苷、橙皮苷等含量测定的报道,但尚未见没食子酸含量测定的报道。没食子酸是西青果的主要质量控制指标,西青果作为清喉利咽颗粒中的主要药材,有必要将其列为考察指标;亦未见同时测定橘红主成分(即柚皮苷)、枳壳主成分(即橙皮苷和新橙皮苷)、黄芩主成分(即黄芩苷)含量的报道。因此本试验将没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷列为待测成分。

综上所述,本方法快速、准确,可用于同时测定清喉利咽颗粒中没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1 562.
- [2] 卫生部药典委员会.卫生部药品标准中药成方制剂:17册[S].北京:人民卫生出版社,1998:245.
- [3] 单玲玲,靳光乾,刘善新.UPLC、RRLC及UFLC在中药质量控制中的研究进展[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2 340.
- [4] 赵明霞,胡基埂,吴方千,等.超高压液相色谱系统的研究进展[J].分析实验室,2009,28(S2):137.
- [5] 薛黎明,秦雪梅,张丽增.不同产地黄芩药材的黄芩苷含量测定及指纹图谱研究[J].中成药,2008,30(1):10.
- [6] 刘金欣,孟繁蕴,张胜海,等.UPLC同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A[J].中草药,2014,45(10):1 477.
- [7] 赵建平.西青果中没食子酸的含量测定[J].广西中医学院学报,2003,6(4):53.
- [8] 蔡晔芬.HPLC法测定橘红枇杷颗粒中柚皮苷的含量[J].中国药房,2011,22(19):1 798.
- [9] 刘晓涵,陈永刚,林励,等.化橘红中柚皮苷和野漆树苷含量同时测定方法的建立[J].中药新药与临床药理,2010,21(6):640.
- [10] 张宏武,封宇飞,邹忠梅.高效液相色谱法同时测定枳壳饮片中4种黄酮类化合物的含量[J].中国新药杂志,2008,17(18):1 600.
- [11] 林宗涛,陈世忠,王弘.HPLC法测定枳壳中6个二氢黄酮类成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(2):201.
- [12] 林冬杰.HPLC法测定清喉利咽颗粒中柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷的含量[J].亚太传统医药,2010,6(7):25.
- [13] 陈江涛,林冬杰.HPLC法测定清喉利咽颗粒中柚皮苷、橙皮苷的含量[J].中国药师,2010,13(9):1 275.

(收稿日期:2015-11-01 修回日期:2016-07-29)

(编辑:刘 柳)