

# RP-HPLC法测定新扶正除疫颗粒中红景天苷和虎杖苷的含量<sup>Δ</sup>

付美丽\*, 严铭铭#, 邵 帅, 吴程彦, 刘 畅, 田 双, 尉忠贤, 杨 洋(长春中医药大学中医药与生物工程研发中心, 长春 130117)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0809-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.24

**摘要** 目的:建立测定新扶正除疫颗粒中红景天苷和虎杖苷含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为GRACE Alltima TMC 18,流动相为甲醇-水(15:85, V/V, 红景天苷)、乙腈-水(23:77, V/V, 虎杖苷),流速为1.0 mL/min,检测波长为275 nm(红景天苷)、306 nm(虎杖苷),柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:红景天苷和虎杖苷检测进样量线性范围分别为0.99~10.89 μg( $r=0.999\ 8$ )、0.046~1.196 μg( $r=0.999\ 8$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为96.31%~99.44%(RSD=1.20%,  $n=6$ )、95.96%~99.73%(RSD=1.42%,  $n=6$ )。结论:该方法操作简单方便、结果准确可靠,适用于测定新扶正除疫颗粒中红景天苷和虎杖苷的含量。

**关键词** 反相高效液相色谱法;新扶正除疫颗粒;红景天苷;虎杖苷;含量测定

## Contents Determination of Salidroside and Polydatin in New Fuzheng Chuyi Granule by RP-HPLC

FU Meili, YAN Mingming, SHAO Shuai, WU Chengyan, LIU Chang, TIAN Shuang, YU Zhongxian, YANG Yang (Chinese Medicine and Bioengineering R&D Center, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of salidroside and polydatin in new Fuzheng chuyi granule. METHODS: RH-HPLC was performed on the column of GRACE Alltima TMC 18 with mobile phase of methanol - water (15:85, V/V, salidroside) and acetonitrile-water (23:77, V/V, polydatin) at a flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength was 275 nm (salidroside) and 306 nm (polydatin), column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. RESULTS: The linear range was 0.99-10.89 μg for salidroside ( $r=0.999\ 8$ ) and 0.046-1.196 μg for polydatin ( $r=0.999\ 8$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 96.31%-99.44% (RSD=1.20%,  $n=6$ ) and 95.96%-99.73% (RSD=1.42%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and suitable for the contents determination of salidroside and polydatin in new Fuzheng chuyi granule.

**KEYWORDS** RP-HPLC; New Fuzheng chuyi granule; Salidroside; Polydatin; Content determination

新扶正除疫颗粒原始剂型为汤剂,即扶正除疫汤,因其使用不便,本课题组对剂型进行了改造,制备了新扶正除疫颗粒。该制剂由红景天、虎杖、大青叶、贯众等中药材组成,具有扶正祛邪、清热透毒之功效;方中以红景天为君,解毒达邪,先证用药;以虎杖、大青叶为臣,清热解毒、截断病势,结合贯众的佐使之力,从而达到整体调节、多靶治疗的目的,有效地阻断多个病理环节的恶性循环<sup>[1-4]</sup>。为了更好地控制新扶正除疫颗粒的质量,本课题组参考相关文献<sup>[5]</sup>,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定新扶正除疫颗粒中红景天苷和虎杖苷的含量,以期为该制剂的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Δ 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2012ZX09103201-033);吉林省科技发展计划项目(No.20150204036YY)

\* 硕士研究生。研究方向:中药化学。E-mail:273575508@qq.com

# 通信作者:教授。研究方向:中药创新药物。E-mail:yanmm595@126.com

1100型HPLC仪,包括紫外检测器(美国Agilent公司);AB265-S型、ALB-224型万分之一分析天平平均购自奥豪斯仪器(上海)有限公司;KQ-250B型超声波清洗器(功率:250 W;频率:40 kHz)。

### 1.2 药品与试剂

新扶正除疫颗粒(长春中医药大学自制,批号:20140301、20140302、20140303、20140304、20140305,规格:10 g/袋);红景天苷对照品(批号:111920-201001,纯度:99.8%)、虎杖苷对照品(批号:111575-200502,纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,无水乙醇、甲醇为分析纯,水为纯净水。

## 2 方法与结果

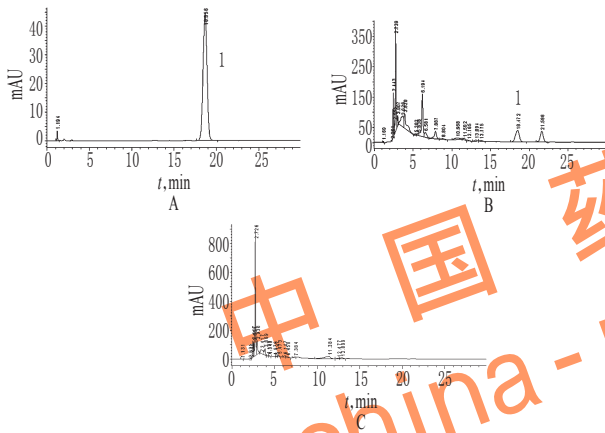
### 2.1 红景天苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:GRACE Alltima TMC 18(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:275 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液的制备 ①对照品溶液。精密称取红景天

昔对照品 9.9 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制备每 1 mL 含红景天苷 1.98 mg 的对照品贮备液。取上述贮备液适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制备每 1 mL 含红景天苷 0.48 mg 的对照品溶液。②供试品溶液。取样品适量, 研细, 精密称取细粉 1.0 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 10 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷; 再次称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得<sup>[6]</sup>。③阴性对照溶液。按样品的处方比例和制备工艺, 制备不含红景天苷的阴性样品, 再按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液<sup>[7]</sup>。

2.1.3 系统适用性试验 精密量取“2.1.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量, 按“2.1.1”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; 理论板数以红景天苷峰计 ≥ 2 000, 保留时间为 18.656 min。结果表明, 其他成分对测定无干扰。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 红景天苷

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. salidroside

图 1 红景天苷高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of salidroside

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下对照品贮备液各 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.1 mL, 分别置于 2 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.099、0.198、0.396、0.594、0.792、0.990、1.089 mg/mL 的系列对照品溶液。取上述对照品溶液适量, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得红景天苷的回归方程为  $y = 308.3x - 42.301$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明, 红景天苷检测进样量线性范围为 0.99~10.89 μg。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(批号: 20140302) 10 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 红景天苷峰面积的 RSD = 0.42% ( $n = 12$ ), 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号: 20140304) 适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h 时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结

果, 红景天苷峰面积的 RSD = 1.43% ( $n = 7$ ), 表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取样品(批号: 20140303) 适量, 按“2.1.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果, 红景天苷的平均含量为 0.41%, RSD = 0.86% ( $n = 6$ ), 表明本方法重复性良好<sup>[8-9]</sup>。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号: 20140305) 适量, 精密加入一定质量的红景天苷对照品, 按“2.1.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”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 1。

表 1 红景天苷加样回收率试验结果 ( $n = 6$ )

Tab 1 Results of recovery test of salidroside ( $n = 6$ )

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, %
1.0029	4.1713	4.1400	8.2146	97.66	97.39	1.20
1.0045	4.1780	4.1450	8.1760	96.45		
1.0050	4.1800	4.1450	8.1888	96.75		
1.0020	4.1678	4.1550	8.2295	97.76		
1.0025	4.1699	4.1550	8.1717	96.31		
1.0009	4.1632	4.1450	8.2849	99.44		

2.1.9 样品含量测定 取 5 批样品各适量, 分别按“2.1.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算红景天苷的含量。结果, 5 批样品(批号: 20140301、20140302、20140303、20140304、20140305) 中红景天苷的含量分别为 6.675‰、5.354‰、4.893‰、3.464‰、4.183‰ ( $n = 3$ )。

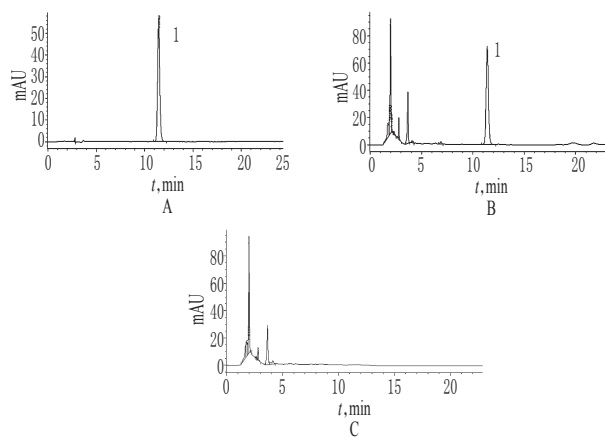
## 2.2 虎杖苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: GRACE Alltima TMC 18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (23:77, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 306 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.2.2 溶液的制备 ①对照品溶液。精密称取虎杖苷对照品 9.2 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加稀乙醇(取乙醇 529 mL, 加水稀释至 1 000 mL, 即得稀乙醇溶液) 溶解并定容, 制备每 1 mL 含 0.184 mg 的对照品贮备液。取上述贮备液适量, 置于 100 mL 量瓶中, 加稀乙醇定容, 制备每 1 mL 含虎杖苷 0.03 mg 的对照品溶液(避光放置)。②供试品溶液。取样品适量, 研细, 取约 0.25 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加稀乙醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷; 再次称定质量, 用稀乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得(避光放置)。③阴性对照溶液。按样品的处方比例和制备工艺, 制备不含虎杖苷的阴性样品, 再按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.2.3 系统适用性试验 精密量取“2.2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 2。由图 2 可

知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度 $>1.5$ ,理论板数以虎杖苷峰计 $\geq 3\ 000$ ,保留时间为 $11.452\ \text{min}$ 。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.虎杖苷

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.polydatin

图2 虎杖苷高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of polydatin

**2.2.4 线性关系考察** 取“2.2.2”项下对照品贮备液 $0.25, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5\ \text{mL}$ ,分别置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,加稀乙醇定容,摇匀,制成质量浓度分别为 $0.004\ 6, 0.009\ 2, 0.027\ 6, 0.046\ 0, 0.064\ 4, 0.082\ 8, 0.101\ 2, 0.119\ 6\ \text{mg/mL}$ 的系列对照品溶液。取上述对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得虎杖苷的回归方程为 $y=308.3x-42.301$ ( $r=0.999\ 8$ )。结果表明,虎杖苷检测进样量线性范围为 $0.046\sim 1.196\ \mu\text{g}$ 。

**2.2.5 精密度试验** 取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20140302) $10\ \mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,虎杖苷峰面积的 $\text{RSD}=1.21\%$ ( $n=12$ ),表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取同一批供试品溶液(批号:20140304)适量,分别于室温下放置 $0, 2, 4, 6, 8, 10, 12\ \text{h}$ 时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,虎杖苷峰面积的 $\text{RSD}=0.70\%$ ( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温下放置 $12\ \text{h}$ 内稳定性良好。

**2.2.7 重复性试验** 取样品(批号:20140303)适量,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,虎杖苷的平均含量为 $0.75\%$ , $\text{RSD}=1.22\%$ ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的样品(批号:20140305)适量,精密加入一定质量的虎杖苷对照品,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”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2。

**2.2.9 样品含量测定** 取5批样品各适量,分别按

表2 虎杖苷加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery test of polydatin( $n=6$ )

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,%
0.252 5	1.998 1	2.000 0	3.984 2	99.31		
0.251 5	1.990 2	2.000 0	3.981 1	99.55		
0.251 3	1.988 6	2.000 0	3.967 8	98.96	98.77	1.42
0.251 5	1.990 2	2.000 0	3.984 8	99.73		
0.250 9	1.985 9	2.000 0	3.968 7	99.14		
0.254 2	2.012 0	1.990 0	3.921 6	95.96		

“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算虎杖苷的含量。结果,5批样品(批号:20140301,20140302,20140303,20140304,20140305)中虎杖苷的含量分别为 $2.891\%, 7.898\%, 0.947\%, 11.247\%, 5.332\%$ ( $n=3$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 流动相的选择

本课题组参考了相关文献中红景天苷的流动相:乙腈-水-磷酸<sup>[10]</sup>、乙腈-水<sup>[11]</sup>、甲醇-水<sup>[12]</sup>;虎杖苷的流动相:乙腈-水<sup>[13]</sup>、乙腈- $0.5\%$ 乙酸、乙腈- $0.1\%$ 磷酸-四氢呋喃<sup>[14]</sup>、甲醇-乙腈- $0.1\%$ 甲酸<sup>[15]</sup>,结果,测定红景天苷时以甲醇-水为流动相、测定虎杖苷时以乙腈-水为流动相的分离效果最好,并且柱效最高。因此,本试验选择甲醇-水(红景天苷)、乙腈-水(虎杖苷)为流动相。

#### 3.2 样品提取方法的选择

在提取方法的选择上,本课题组分别用回流法、索氏回流法、超声法对样品中红景天苷和虎杖苷进行提取。结果,采用回流法、索氏回流法、超声法制备的供试品溶液所测得的待测成分含量相差不大,以超声法测得待测成分的含量最高,且超声法操作简便,故两种成分均选择超声法提取。

#### 3.3 样品提取溶剂的选择

在提取溶剂的选择上,课题组考察了甲醇、 $70\%$ 乙醇、水(红景天苷),甲醇、稀乙醇、 $70\%$ 乙醇-乙酸乙酯( $3:1, V/V$ )(虎杖苷)。结果,红景天苷以甲醇、虎杖苷以稀乙醇为溶剂时经超声法提取最充分,且含量均较高。因此,本试验选择甲醇(红景天苷)、稀乙醇(虎杖苷)为提取溶剂。

综上所述,本方法操作简单方便、结果准确可靠,适用于测定新扶正除疫颗粒中红景天苷和虎杖苷的含量。

### 参考文献

- [1] 张雨舟.红景天药理作用研究进展及应用前景分析[J].安徽农业科学,2015,43(25):77-79,82.
- [2] 黄海量.中药虎杖药理作用研究进展[J].西部中医药,2012,25(4):100-103.
- [3] 崔伟亮,李慧芬,刘江亭.大青叶抗病毒抑菌作用研究进展[J].山东中医杂志,2014,33(5):410-411.
- [4] 崔月曦,刘合刚.贯众的研究进展[J].中国现代中药,2014,16(12):1043-1048.
- [5] 王忠波,李丹.RP-HPLC法测定阿哌沙班片的含量及有



# RP-HPLC法同时测定桑杏口服液中芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷的含量<sup>Δ</sup>

程雪<sup>1\*</sup>, 谈琰忠<sup>1,2#</sup>, 苏联麟<sup>1</sup>, 陆兔林<sup>1</sup>, 毛春芹<sup>1</sup>, 张雪荣<sup>1</sup>(1.南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2.南京市中医院, 南京 210001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0812-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.25

**摘要** 目的:建立同时测定桑杏口服液中芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为276、348 nm,柱温为30℃,进样量为5 μL。结果:芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷检测质量浓度线性范围分别为1.068~10.68 μg/mL( $r=0.999\ 3$ )、9.320~93.20 μg/mL( $r=0.999\ 2$ )、46.91~469.1 μg/mL( $r=0.999\ 4$ )、0.511 0~5.110 μg/mL( $r=0.999\ 2$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为95.10%~101.90%(RSD=2.1%, $n=9$ )、96.75%~101.80%(RSD=1.4%, $n=9$ )、95.69%~100.00%(RSD=1.5%, $n=9$ )、98.22%~104.60%(RSD=2.1%, $n=9$ )。结论:该方法准确、灵敏、重复性好,可用于桑杏口服液中芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷含量的同时测定。

**关键词** 桑杏口服液;反相高效液相色谱法;芦丁;橙皮苷;牛蒡苷;甘草苷

## Simultaneous Determination of Rutin, Hesperidin, Arctiin and Liquiritin in Sangxing Oral Liquid by RP-HPLC

CHENG Xue<sup>1</sup>, TAN Xuanzhong<sup>1,2</sup>, SU Lianlin<sup>1</sup>, LU Tulin<sup>1</sup>, MAO Chunqin<sup>1</sup>, ZHANG Xuerong<sup>1</sup>(1.School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2.Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of rutin, hesperidin, arctiin, liquiritin and glycyrrhizinate in Sangxing oral liquid. METHODS: RP-HPLC was performed on the column of Kromasil C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 276, 348 nm, column temperature was 30 °C, and the injection volume was 5 μL. RESULTS: The linear range was 1.068-10.68 μg/mL ( $r=0.999\ 3$ ) for rutin, 9.320-93.20 μg/mL ( $r=0.999\ 2$ ) for hesperidin, 46.91-469.1 μg/mL ( $r=0.999\ 4$ ) for arctiin, 0.511 0-5.110 μg/mL ( $r=0.999\ 2$ ) for liquiritin; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were less than 3%; recoveries were 95.10% -101.90% (RSD=2.1%, $n=9$ ), 96.75% -101.80% (RSD=1.4%, $n=9$ ), 95.69% -100.00% (RSD=1.5%, $n=9$ ), 98.22% -104.60% (RSD=2.1%, $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, sensitive and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of rutin, hesperidin, arctiin and liquiritin in Sangxing oral liquid.

**KEYWORDS** Sangxing oral liquid; RP-HPLC; Rutin; Hesperidin; Arctiin; Liquiritin

- 关物质[J].中国药房,2015,26(6):828-831.
- [6] 韩彩霞,蒋艳红,马海波.心欣颗粒中红景天苷含量测定[J].中国中医药信息杂志,2012,19(6):51-52.
- [7] 李海齐,周凡,胡志林.HPLC法测定复方蔷薇红景天口服液 中红景天苷的含量[J].兵团医学,2014,41(3):4-7.
- [8] 刘青,杜守颖,多吉仁青,等.HPLC法同时测定不同产地大花红景天中6种活性成分[J].中草药,2015,46(2):276-279.
- [9] 黄钰芳,李越峰,袁菊丽,等.正交设计-多元回归法优选红景天中红景天苷超声波提取工艺[J].中国药房,2015,26(22):3128-3130.
- [10] 付锦光.心脑血管片中红景天苷含量测定[J].河北中医,2012,34(1):105-107.
- [11] 戚志华,王庆伟,王四旺,等.HPLC法测定不同生长期女贞子中红景天苷的含量[J].中国药房,2010,21(11):996-997.
- [12] 刘建明,熊立新,余松华.RP-HPLC法测定大鼠血浆中红景天苷的浓度[J].江西中医药,2011,42(2):64-65.
- [13] 车彦忠,王培智,陈洪英,等.HPLC测定护肝宁丸中虎杖苷的含量[J].中医临床研究,2013,5(19):27-28.
- [14] 王亚洲.HPLC法同时测定烫伤合剂中绿原酸、虎杖苷和盐酸小檗碱的含量[J].中国药师,2012,15(7):993-995.
- [15] 丁雪鹰,侯晓丽,孙铭学,等.LC-MS/MS测定大鼠血浆中虎杖苷浓度[J].药学实践杂志,2012,30(1):45-48.

(收稿日期:2016-03-01 修回日期:2016-10-11)

(编辑:刘柳)

Δ 基金项目:国家临床重点专科建设项目(No.苏中医综[2014]3号);南京市科技发展计划项目(No.201605035)

\* 硕士研究生。研究方向:中药炮制与复方制剂。E-mail: 878921875@qq.com

# 通信作者:主任中药师。研究方向:中药学、药事管理。电话: 025-52276121。E-mail: txz282@sohu.com