

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^Δ

程雪^{1*}, 谈琰忠^{1,2#}, 苏联麟¹, 陆兔林¹, 毛春芹¹, 张雪荣¹ (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 C₁₈,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 Xue¹, TAN Xuanzhong^{1,2}, SU Lianlin¹, LU Tulin¹, MAO Chunqin¹, ZHANG Xuerong¹ (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 C₁₈ 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

桑杏口服液由桑叶、牛蒡子、陈皮、甘草等组成,具有祛风解(散)热、宣肺豁(化)痰、止咳利咽的功效,临床用于治疗外感风热、肺卫失宣之咳嗽。桑叶为方中君药,具有滋阴补血、疏散风热之功效,药理实验表明,桑叶中有效成分芦丁具有降血糖、降血压、抗菌和抗病毒等多种药理活性^[1-2];牛蒡子为方中臣药,长于宣肺祛痰、清利咽喉,常用于风热感冒而见咽喉红肿疼痛,有研究表明,牛蒡苷能明显降低发热模型家兔体温,对二甲苯致炎模型小鼠和巴豆油致炎模型大鼠均有良好的抗炎作用^[3-4];陈皮具有理气健脾、燥湿化痰功效,为方中佐药,橙皮苷是其质控指标成分^[5-6];甘草为方中使药,具有清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和药性之功效,药理研究表明,甘草苷具有镇咳、祛痰、平喘及抗呼吸道病原体等作用^[7-8]。目前,该口服液并没有相关含量测定的内容,因此完善该制剂的质量控制十分必要。本试验采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)同时测定上述4种有效成分,为桑杏口服液的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括VWD检测器(美国Agilent公司);Milli-Q Intergral水纯化系统(美国Millipore公司);MS105DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HH-S型水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);LXJ-IIB型高速离心机(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

桑杏口服液(南京市中医院制剂室自制,批号:151102、151105、151107,规格:10 mL/瓶);芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:90.5%)、橙皮苷对照品(批号:110721-201316,纯度:≥98%)、牛蒡苷对照品(批号:110819-2011080,纯度:≥98%)、甘草苷对照品(批号:111610-201106,纯度:93.7%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余成分均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:276、348 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μL。

2.2 溶液的制备

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0	10	90
10	10	90
15	20	80
35	25	75
38	30	70
45	70	30

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密量取待测成分对照品适量,加甲醇制成芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷质量浓度分别为1.068 0、0.932 0、0.938 1、1.022 0 mg/mL的单一对照品贮备液。分别量取上述单一对照品贮备液适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇制成芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷质量浓度分别为21.36、186.4、10.22、93.81 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品0.5 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,以半径为10 cm、3 000 r/min离心20 min,取上清液,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按桑杏口服液处方和工艺制备缺桑叶、牛蒡子、陈皮、甘草的单一阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成单一阴性对照溶液。

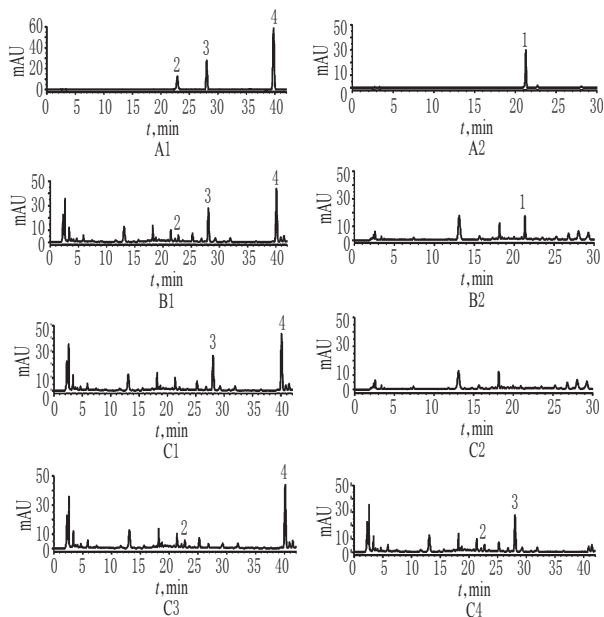
2.3 系统适用性试验

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。结果,理论板数以芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷峰计分别<5 000、5 000、1 500、2 000;分离度>1.5,各成分基线分离良好;其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于2 mL量瓶中,加甲醇定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷回归方程分别为 $y=10.872x+0.265 8$ ($r=0.999 3$)、 $y=8.257 8x+1.459 2$ ($r=0.999 2$)、 $y=2.931 7x-6.304 1$ ($r=0.999 4$)、 $y=24.402x+1.525 2$ ($r=0.999 2$)。结果表明,芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷检测质量浓度线性范围分别为1.068~10.68、9.320~93.20、46.91~469.1、0.511 0~5.110 μg/mL。

2.5 精密度试验



A1.混合对照品(276 nm);A2.混合对照品(348 nm);B1.供试品(276 nm);B2.供试品(348 nm);C1. 缺甘草的阴性对照(276 nm);C2. 缺桑叶的阴性对照(348 nm);C3.缺陈皮的阴性对照(276 nm);C4. 缺牛蒡子的阴性对照(276 nm);1.芦丁;2.甘草苷;3.橙皮苷;4.牛蒡苷

A1.mixed reference substance(276 nm); A2.mixed reference substance(348 nm); B1. test sample(276 nm); B2. test sample(348 nm); C1. negative sample without *Glycyrrhiza uralensis* (276 nm); C2. negative sample without *Morus alba*(348 nm); C3. negative sample without *Prunella carpitum citri*(276 nm); C4.negative sample without *Fructus arctii*(276 nm);1.rutin; 2.liquiritin; 3.hesperidin; 4.arctiin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷峰面积的RSD分别为1.3%、1.0%、2.1%、2.1%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:151102)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷峰面积的RSD分别为1.6%、1.7%、1.9%、2.6%(n=6),表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:151102)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷平均含量分别为0.095 54、0.912 6、4.011、0.042 67 mg/mL,RSD分别为1.2%、1.7%、2.1%、1.7%(n=6),表明本方法重复性

良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:151102)适量,共9份,每份0.2 mL,分别加入低、中、高质量的待测成分对照品,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2。

表2 加样回收试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test(n=9)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芦丁	19.07	15.38	34.62	101.10	99.31	2.1
	19.07	15.38	34.16	98.09		
	19.07	15.38	33.70	95.10		
	19.07	19.22	38.66	101.90		
	19.07	19.22	38.11	99.07		
	19.07	19.22	38.48	101.00		
	19.07	23.06	41.79	98.53		
	19.07	23.06	42.16	100.10		
	19.07	23.06	41.88	98.92		
	182.5	149.1	334.3	101.80		
	182.5	149.1	326.8	96.75		
	182.5	149.1	329.3	98.45		
橙皮苷	182.5	186.4	368.3	99.68	99.26	1.4
	182.5	186.4	369.0	100.10		
	182.5	186.4	367.7	99.36		
	182.5	223.7	403.3	98.71		
	182.5	223.7	405.4	99.63		
	182.5	223.7	403.5	98.82		
	802.4	645.4	1 428.0	96.93		
	802.4	645.4	1 434.0	97.86		
	802.4	645.4	1 420.0	95.69		
	802.4	806.8	1 595.0	98.24		
	802.4	806.8	1 587.0	97.25		
	802.4	806.8	1 592.0	97.87		
牛蒡苷	802.4	968.2	1 771.0	100.00	98.15	1.5
	802.4	968.2	1 769.0	99.83		
	802.4	968.2	1 767.0	99.63		
	8.482	6.541	15.070	100.70		
	8.482	6.541	14.910	98.22		
	8.482	6.541	14.990	99.47		
	8.482	8.176	16.630	99.63		
	8.482	8.176	16.910	103.10		
	8.482	8.176	17.040	104.60		
	8.482	9.811	18.510	102.20		
	8.482	9.811	18.350	100.60		
	8.482	9.811	18.140	98.48		

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 波长的选择

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/支)

Tab 3 Determination results of samples ($n=3$, mg/per oral solution)

样品批号	芦丁	橙皮苷	牛蒡苷	甘草苷
151102	0.953 7	9.124	40.12	0.424 1
151105	0.950 2	9.153	40.09	0.427 7
151107	0.955 4	9.214	40.38	0.433 5

芦丁、橙皮苷、牛蒡苷、甘草苷的最大吸收波长分别为358、283、280、237nm^[9]。本试验采用二极管阵列检测器在200~400 nm处进行扫描,选择对芦丁、甘草苷、橙皮苷、牛蒡苷均有较好响应的348、276 nm波长作为检测波长。

3.2 提取溶剂的选择

笔者分别考察了甲醇、乙醇和水为提取溶剂,结果显示,以水为提取溶剂时有效成分的提取率较低,且杂质较多,以乙醇为提取溶剂时,有效成分的峰形及含量都不如甲醇,故选择甲醇为提取溶剂。

3.3 流动相的选择

本试验参考了2015年版《中国药典》及相关文献^[10-15],比较了不同比例的乙腈-磷酸、乙腈-乙酸、甲醇-水的流动相。结果显示,乙腈-磷酸为流动相时,可以较短时间内测出芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷,且分离效果较好,峰面积较大。笔者还考察了不同磷酸质量分数(0.05%、0.1%、0.2%)对有效成分峰形的影响。结果表明,0.1%磷酸溶液效果最好,故选择乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相。

中药复方成分复杂,单一指标成分的含量测定并不能有效地控制中药复方质量,本试验通过HPLC对方中药材主要有效成分进行测定,方法准确、灵敏、重复性好,可用于桑杏口服液中芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷含量的同时测定。

参考文献

[1] 苏方华.桑叶的化学成分及临床应用研究进展[J].中国医药导报,2010,7(14):9-11.
[2] 李明聪,杨丹,郭英,等.桑叶中黄酮类化学成分及药理作

用研究进展[J].辽宁中医杂志,2012,39(2):377-379.

[3] 张淑雅,王小萍,陈昕,等.牛蒡苷抗炎和解热作用研究[J].药物评价研究,2013,36(6):422-425.
[4] 李燕,孙敬勇,武海艳.牛蒡子化学成分及药理作用研究进展[J].齐鲁药事,2009,28(12):738-740.
[5] 张志海,王彩云,杨天鸣,等.陈皮的化学成分及药理作用研究进展[J].西北药学杂志,2005,20(1):47-48.
[6] 欧立娟,刘启德.陈皮药理作用研究进展[J].中国药房,2006,17(10):787-789.
[7] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等.炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药大学学报,2015,29(3):99-100.
[8] 郑军,赵镭,郑颖洁.复方甘草片含服与吞服的镇咳祛痰疗效比较[J].中国新药与临床杂志,2002,21(3):186-188.
[9] 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,2015:72、86、191、201、265、297.
[10] 程聪梅,毛菊华,余乐.HPLC法同时测定桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量[J].中国药房,2016,27(21):2990-2992.
[11] 王伟影,范蕾,余华丽,等.HPLC法同时测定芙朴感冒颗粒中芦丁、橙皮苷和牛蒡苷[J].中草药,2014,45(5):665-667.
[12] 许海棠,陈其锋,李小燕.感冒解毒灵颗粒中橙皮苷和牛蒡苷的HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2010,41(9):688-689.
[13] 罗云,张婧,赵海平,等.高效液相色谱法同时测定银翘散中绿原酸、连翘苷、牛蒡苷、甘草苷、甘草酸的含量[J].中国药学杂志,2013,48(6):473-475.
[14] 张翔,韩继永.HPLC法同时测定养血化瘀合剂中阿魏酸、甘草苷和甘草酸[J].中成药,2011,33(4):622-624.
[15] 杜蓉,张孟佑.HPLC法测定加味逍遥丸中芍药苷与甘草苷的含量[J].中国药房,2015,26(18):2571-2572.

(收稿日期:2016-08-31 修回日期:2016-10-27)

(编辑:张静)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,欢迎投稿、订阅