

HPLC 同时测定宣肺止咳合剂 3 种指标成分的含量

王莹, 杜静* (杭州市红十字会医院, 杭州 310003)

摘要: 目的 建立反相高效液相色谱法同时测定宣肺止咳合剂中葛根素、大豆苷、甘草酸的含量。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 检测波长: 254 nm, 以乙腈-0.1%甲酸水为流动相, 梯度洗脱, 柱温为 30 ℃。结果 葛根素、大豆苷、甘草酸浓度分别在 99.14~991.4, 22.50~225.0, 22.60~226.0 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系($r \geq 0.999$), 平均回收率分别为 99.2%, 98.8%, 99.3%。结论 该方法简便、准确、重复性好, 为宣肺止咳合剂的质量评价与质量控制提供了科学依据。

关键词: 宣肺止咳合剂; 高效液相色谱法; 葛根素; 大豆苷; 甘草酸; 含量测定

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0599-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.018

Study on Simultaneous Determination of Three Main Marker Components in Xuanfeizhike Mixture by HPLC

WANG Ying, DU Jing* (Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of puerarin, daidzein and glycyrrhizic acid in Xuanfeizhike mixture. **METHODS** Isolation of sample was achieved on an Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), under the 254 nm detection wavelength, gradient eluted by acetonitrile-0.1% formic acid, and the column temperature was maintained at 30 ℃. **RESULTS** The linearity ranges of puerarin, daidzein and glycyrrhizic acid were 99.14~991.4, 22.50~225.0, 22.60~226.0 μg·mL⁻¹, respectively($r \geq 0.999$). The average recoveries($n=9$) of them were 99.2%, 98.9%, 99.3%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and has a good repeatability. The study provides scientific foundation for quality evaluation and quality control standards for Xuanfeizhike mixture.

KEY WORDS: Xuanfeizhike mixture; HPLC; puerarin; daidzein; glycyrrhizic acid; content determination

宣肺止咳合剂(原名清肺饮)由麻黄、杏仁、生石膏、葛根、甘草、僵蚕、知母等组成, 是笔者所在医院治疗上呼吸道感染、肺炎等病证的临床常用药物之一; 具有清热宣肺, 止咳平喘的功效。研究表明, 清肺饮对治疗急慢性支气管炎具有较好疗效^[1], 能减轻呼吸道合胞病毒感染大鼠气道阻力, 提高其肺顺应性^[2], 还可通过调节氧化-抗氧化平衡和减少黏蛋白表达来调控慢性支气管炎的发生和发展^[3]; 其中多种中药成分对支气管黏膜肿胀均有明显缓解作用。傅应华等^[4]已对清肺饮的君药麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱进行了含量测定研究。葛根为宣肺止咳合剂方中臣药, 麻黄和葛根配伍, 可轻扬发散, 清解肺热, 两药相辅相成, 既能宣肺, 又能清热。甘草能益气和, 又能与葛根相合而生津止渴, 更能调和于寒温宣降之间, 是佐使药。葛根的主要成分为葛根素和大豆苷,

具有抗炎、抗氧化应激、抗过敏、改善血液循环等功效, 甘草的主要活性成分为甘草酸, 具有解毒、抗炎、镇咳等作用。为进一步控制该中药制剂的质量, 本研究采用反相高效液相色谱法同时测定宣肺止咳合剂臣药葛根及佐使药甘草中的葛根素、大豆苷、甘草酸 3 个活性指标成分的含量, 为丰富宣肺止咳合剂的定量指标、更全面评价和控制药品的质量提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配有 G1312C 二元泵、G1315D 二级管阵列检测器、G1316A 柱温箱和 G1329B 自动进样器、安捷伦色谱工作站管理软件以及 G1322A 在线脱气装置; BT25S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); KH-250B 型超声清洗器(昆山市禾创超声仪器有限公司)。

基金项目: 杭州市科学技术委员会项目(20130633B25); 浙江省中西医结合学会临床药学科研基金(2013LYD005)

作者简介: 王莹, 女, 硕士, 中药师 Tel: (0571)56109879
Tel: (0571)56109880 E-mail: Dujing1166@sina.com

E-mail: yingying.luck@163.com *通信作者: 杜静, 女, 主任药师

1.2 试药

宣肺止咳合剂(杭州市红十字会医院制剂室, 批号: 20150428、20150512、20150604); 葛根素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110752-200912, 含量以 96.0%计); 大豆苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111738-200501, 含量以 91.3%计); 甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110731-201317, 含量以 93.1%计); 乙腈(德国默克公司, 色谱纯); 甲醇和甲酸(杭州试剂公司, 分析纯); 实验用水为娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相: 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)。梯度洗脱程序: 0~25 min, 10%→20% B; 25~40 min, 20%→40% B; 40~45 min, 40%→95% B; 45~48 min, 95% B; 48~49 min, 95%→10% B; 49~53 min, 10% B。柱温: 30 °C, 检测波长: 254 nm, 进样量: 10 μL, 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取葛根素、大豆苷、甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解配制成含葛根素、大豆苷、甘草酸铵浓度分别为 991.4, 225.0, 226.0 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取宣肺止咳合剂 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 50%甲醇适量, 摇匀, 超声 30 min, 放凉, 加 50%甲醇至刻度, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 多指标含量测定

2.3.1 系统适用性试验 按“2.1”项下色谱条件, 分别精密吸取对照品、供试品各 10 μL, 进样测定, 记录色谱图, 结果见图 1。由图 1 可知, 对照品和供试品溶液在相同的保留时间处均出现色谱峰, 分离度>1.5, 理论板数以葛根素、大豆苷、甘草酸计算≥3 000, 满足定量要求。

2.3.2 线性关系的考察 精密吸取混合对照品储备液 1, 2, 3, 4, 6, 10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成系列浓度的混合对照品溶液。取 10 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积值, 以峰面积为纵坐标(Y)、浓度为横坐标(X)绘制标准曲线, 结果见表 1。

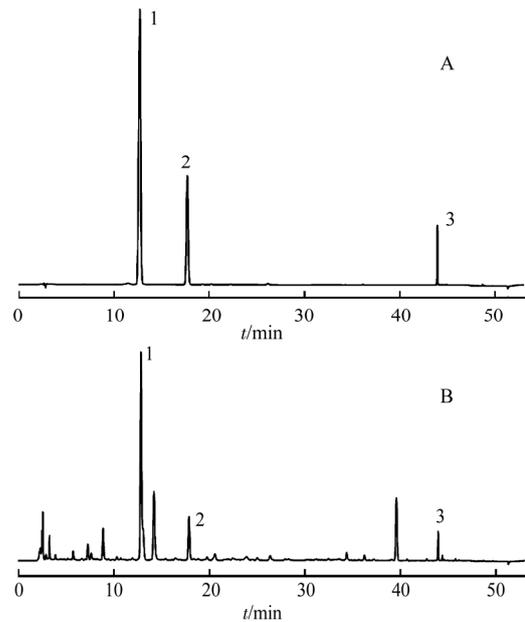


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-宣肺止咳合剂样品; 1-葛根素; 2-大豆苷; 3-甘草酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standards solution; B-Xuanfeizhike Mixture sample solution; 1-puerarin; 2-daidzein; 3-glycyrrhizic acid.

表 1 3 种指标成分的线性关系

Tab. 1 Linearity of determination of 3 index componenes

成分	线性范围/μg·mL ⁻¹	回归方程	r
葛根素	99.14~991.4	Y=2 365.3X-751.23	0.999
大豆苷	22.50~225.0	Y=1 299.2X-719.56	0.999
甘草酸	22.60~226.0	Y=265.04X-92.246	0.998

2.3.3 仪器精密度的试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定待测成分峰面积。结果葛根素、大豆苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.11%, 0.12% 和 1.07%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号: 20150604)适量, 室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h, 分别进样 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件测定, 考察其稳定性。葛根素、大豆苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.15%, 0.17% 和 0.10%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取批号为 20150604 的制剂, 平行制备 6 份供试品溶液, 精密吸取 6 份供试品溶液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录其峰面积, 并计算 3 种成分含量, 葛根素含量为 1.928 mg·mL⁻¹, RSD 为 0.12%(n=6)、大豆苷含量为 0.405 mg·mL⁻¹, RSD 为 0.12%(n=6), 甘草酸含

量为 0.456 mg·mL⁻¹, RSD 为 0.09%(n=6), 结果表明, 方法重复性良好。

2.3.6 回收率试验 精密移取 9 份已知含量的样品(批号: 20150604)0.5 mL, 分为 3 组, 按低、中、高浓度分别加入混合对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5 mL, 按“2.2”项下方法制备溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样 10 μL 测定峰面积, 计算回收率, 结果显示, 葛根素、大豆苷、甘草酸的回收率(n=9)分别为 99.2%、98.8%和 99.3%, RSD 为 0.6%~1.6%。表明该方法回收率良好。结果见表 2。

表 2 3 种指标成分的加样回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery test for 3 index componenes (n=9)

成分	样品含量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	RSD/%	平均回收率/%
葛根素	0.964	0.496	1.455	99.0	1.1	99.2
		0.991	1.949	99.4	1.0	
		1.485	2.436	99.1	0.9	
大豆苷	0.202	0.112	0.313	99.1	1.5	98.8
		0.225	0.424	98.7	0.8	
		0.337	0.534	98.5	0.6	
甘草酸	0.228	0.113	0.341	100.0	1.2	99.3
		0.226	0.453	99.6	0.9	
		0.339	0.561	98.2	1.6	

2.3.7 含量测定 分别取不同批号的宣肺止咳合剂, 按“2.2.2”项下方法制得供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 由回归方程计算含量。结果见表 3。

表 3 宣肺止咳合剂 3 种指标成分的含量测定结果(n=3)

Tab. 3 Contents of three components on three batches of Xuanfeizhike mixture(n=3)

成分	批号	平均含量/mg·mL ⁻¹	RSD/%
葛根素	20150428	1.940	0.24
	20150512	1.922	0.21
	20150604	1.928	0.21
大豆苷	20150428	0.407	0.31
	20150512	0.400	0.21
	20150604	0.405	0.27
甘草酸	20150428	0.459	0.14
	20150512	0.451	0.16
	20150604	0.456	0.13

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用光电二极管阵列检测器(DAD)于 190~400 nm 波长进行扫描, 比较不同波长吸收峰的数

量、强弱及分离情况, 宣肺止咳合剂主要成分在 254 nm 波长处有最大吸收且吸收峰较多, 各色谱峰的分布均匀, 峰形大小合适, 基线也较平稳, 可以较完全表达宣肺止咳合剂各类成分的出峰情况, 因此可选用 254 nm 作为检测波长。

3.2 供试品提取方法的选择

本实验比较了不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇等)、提取方式(超声提取 40 min、回流提取、超声提取 30 min)的提取效果。结果表明, 以 50%甲醇超声 30 min 的提取效果最好, 色谱峰总数多, 且峰面积相对较大, 分离度好。

3.3 洗脱系统的选择

宣肺止咳合剂中化学成分较为复杂, 待测成分的化学结构和极性差异较大, 难以采用固定的流动相同时测定, 本研究经反复试验, 确定了流动相的梯度洗脱程序, 多种待测成分峰形基本对称, 与相邻峰可达较好的分离度, 并对不同流动相系统(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液以及乙腈-0.05%甲酸水溶液)及其不同流动相比比例进行了比较, 结果以乙腈-0.1%甲酸水溶液系统为最佳, 其图谱上各个色谱峰的分离度较好, 基线较平稳, 保留时间适中。

3.4 小结

采用 HPLC 同时测定宣肺止咳合剂臣药和佐使药中 3 种指标成分的含量, 所建立的方法操作简便, 快捷准确, 重复性好, 能够较全面反应药物的内在质量, 可为该药物的全面质量评价提供参考, 更好地控制该制剂的质量。

REFERENCES

- [1] TIAN Y. Qing Fei Yin Mixture treat 60 cases of acute bronchitis [J]. J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报), 2006, 30(6): 655-655.
- [2] GAO Y X, JIANG J G, WANG M L. Content determination of minocycline hydrochloride and its tablets by turbidimetric method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学) 2008, 25(7): 641-644.
- [3] 吕小琴, 徐颖颖, 张相彩, 等. 清肺饮合剂对慢性支气管炎大鼠 SOD 和 MDA 含量及黏蛋白表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(6): 408-409.
- [4] FU Y H, DU J. RP-HPLC determination of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in Qingfeiyin oral solution [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(8): 1148-1150.

收稿日期: 2015-07-14