

高效液相色谱法测定毛支清口服液中 tortoside A

刘世杰¹, 徐晓丽², 魏文静¹, 刘同祥^{1*}

1. 中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081

2. 河南太龙药业股份有限公司, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 建立毛支清口服液中 tortoside A 的定量测定方法。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法, 选用 Venusil MP C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水(18:82)为流动相, 检测波长为 207 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃。结果 Tortoside A 进样质量浓度为 1.76~35.20 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程 $Y=83\,335X-47\,442$, $r=0.999\,7$, 平均回收率为 101.53%, RSD 值为 2.50%。结论 所建立的 HPLC 法简便、准确、灵敏度高、重复性好, 可控制毛支清口服液的质量。

关键词: 毛支清口服液; tortoside A; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)03-0203-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.03.012

Determination of tortoside A in Maozhiqing Oral Liquid by HPLC

LIU Shi-jie¹, XU Xiao-li², WEI Wen-jing¹, LIU Tong-xiang¹

1. Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. Henan Tailong Pharmaceutical Company Limited, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of tortoside A in Maozhiqing Oral Liquid (MOL). **Methods** The tortoside A was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The Venusil MP C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-water (18:82), the detection wavelength was 207 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 ℃. **Results** Tortoside A has a good linear relationship with the peak area within the range of 1.76—88.00 μg/mL with an regression equation $Y = 83\,335X - 47\,442$ ($r = 0.999\,7$). The average recovery was 101.53%, and RSD was 2.50%. **Conclusion** The established method of HPLC could be used for the quality control of MOL for its simplicity, accuracy, high sensitivity, and good reproducibility.

Key words: Maozhiqing Oral Liquid; tortoside A; high performance liquid chromatography

毛支清口服液是新研制的中药六类新药, 由毛冬青、板蓝根、大青叶、鱼腥草、黄芩配伍组成, 具有清热解毒、活血化瘀的功效, 临床上用于治疗小儿肺炎。毛冬青是冬青科冬青属植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. 的干燥根, 味微苦、涩, 性寒, 归心、肺经, 功效活血、通脉、清热解毒、止咳祛痰, 具有抗血栓、抗炎、抗菌、止咳祛痰等药理作用^[1-3]。tortoside A 是毛冬青的主要成分之一, 具有较好的抗炎和抗氧化作用^[4]。为了有效控制该制剂的质量, 保证疗效, 采用高效液相色谱(HPLC)法, 建立了毛支清口服液中 tortoside A 的含量测定方法, 用于产品的质量控制。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

岛津 LC—20AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), SPD—M20A 检测器; AL104 型万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ—500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药

tortoside A 对照品(自制, 经归一化法检测, 质量分数大于 98%); 毛支清口服液(中国少数民族传统医学研究院民族药中试研究室自制, 批号 120703、120710、120716); 乙腈为色谱纯, 水为重

收稿日期: 2013-02-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073151)

*通信作者 刘同祥 Tel: (010)68933254-801 E-mail: liutongxiang@yahoo.com.cn

蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Venusil MP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-水 (18:82) 为流动相, 检测波长 207 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 理论板数按 tortoside A 峰计算应不低于 5 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 tortoside A 对照品 2.2 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声溶解, 放至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 弃去初滤液, 续滤液中 tortoside A 的质量浓度为 88.00 μg/mL, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取本品 10 mL, 置分液漏斗中, 用水饱和正丁醇萃取 3 次, 每次 20 mL, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 弃去初滤液, 续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照品溶液的制备 按照组方比例制备缺毛冬青的毛支清口服液, 按供试品溶液的制备方法同法制成阴性对照品溶液。

2.3 系统适用性试验

精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液及缺毛冬青的阴性对照样品溶液各 5 μL, 注入色谱仪。按“2.1”项下色谱条件检测。结果供试品溶液中 tortoside A 峰能与其他成分峰分离, 缺毛冬青的阴性对照样品色谱在与供试品及对照品色谱中 tortoside A 吸收峰相应时间处无干扰峰出现, 说明样品中其他成分对测定无干扰, 色谱图见图 1。

2.4 线性关系的考察

分别精密吸取对照品溶液 2 mL 至 5、10、25、50、100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成质量浓度为 35.20、17.60、7.04、3.52、1.76 μg/mL 的 tortoside A 对照品溶液。分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积。以 tortoside A 峰面积积分值为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $Y = 83\,335X - 47\,442$, $r = 0.999\,7$, tortoside A 进样浓度为 1.76~35.20 μg/mL 时与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取同一对照品溶液 (88.00 μg/mL), 分别精密吸取 10 μL, 重复进样 6 次, 按照“2.1”项下色谱条件测定, 记录 tortoside A 峰面积, 结果 RSD 值

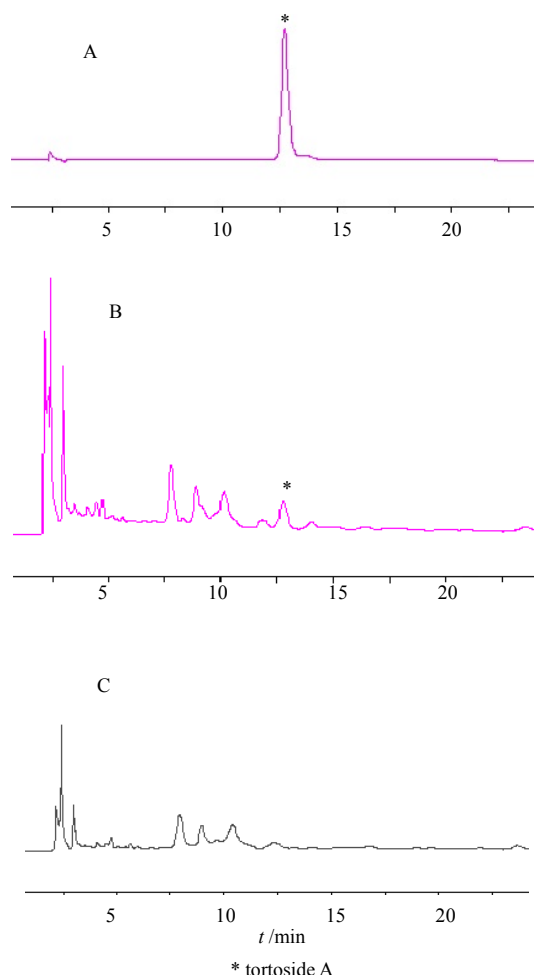


图 1 tortoside A 对照品 (A)、毛支清口服液 (B)、阴性对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of tortoside A reference substance (A), MOL (B), and negative control (C)

为 0.99% ($n=6$), 精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号为 120716), 分别精密吸取 5 μL, 按照“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8 h 进样测定 tortoside A 峰面积, 并计算 RSD。结果 RSD 值为 0.23% ($n=5$), 说明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批号 (批号为 120716) 样品, 按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样 5 μL, 测定 tortoside A, 并计算 RSD 值。结果 tortoside A 的平均浓度为 156.85 μg/mL, RSD 值为 1.84% ($n=6$), 所建立方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知量的 tortoside A 样品 10 mL (质量浓度为 156.85 μg/mL), 精密加入 1.51 μg/mL

tortoside A 对照品溶液 1 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件测定, 平行测定 6 份。平均回收率为 101.53%, RSD 值为 2.50%。

2.9 样品的含量测定

取 3 批毛支清口服液样品, 按“2.2.2”项下方法分别制成 3 份供试品溶液, 精密吸取 5 μ L 注入色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 每一个样品均进样 3 次, 记录 tortoside A 的峰面积, 按外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 毛支清口服液 tortoside A 含量测定结果 ($n=3$)
Table 1 Content determination of tortoside A of MOL ($n=3$)

批号	tortosideA/(μ g·mL ⁻¹)
120703	163.27
120710	148.34
120716	157.41

3 讨论

毛冬青中主要含三萜及其苷类和苯丙素及其苷类等化学成分^[5-6]。现有的文献报道, 毛冬青的质量控制大部分用 HPLC 法测定 ilexgenin A、ilexsaponin A₁、ilexsaponin B₁、ilexsaponin B₂、tortoside A、原儿茶醛等的含量^[7-12]。2010 年版《中国药典》未收载毛冬青, 上海、湖南等地方标准收载毛冬青仅有理化鉴别和薄层色谱检视, 无含量测定标准^[13-14]。毛冬青水煎液中三萜及其苷类含量不高, 紫外吸收较弱; 原儿茶醛专属性不强, 在鱼腥草等药材中也含有。作者从毛冬青中分离得到 tortoside A, 它是毛冬青中含量较高的活性成分, 紫外吸收较强, 故选择 tortoside A 控制毛支清口服液的质量。通过摸索条件, 选择乙腈-水 (18:82) 为流动相, 结果供试品色谱图中峰形良好, 与杂质峰分离效果较好, 保留时间适当, 阴性对照无干扰。

本实验建立的毛支清口服液中 tortoside A 的含

量测定方法简便、快速、准确, 稳定性高、重复性好, 可用于毛支清口服液的质量控制。

参考文献

- [1] 范文昌, 梅全喜, 李楚源. 广东地产清热解毒药物大全 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2011.
- [2] 张芳林, 郭 晟, 朱令元, 等. 毛冬青酸抗血栓实验研究及机制探讨 [J]. 江西医学院学报, 2003, 43(2): 33-37.
- [3] 曾俊玲, 杨树英, 麦永前. 毛冬青乙素抗炎作用研究 [J]. 中药材, 1993, 16(11): 31-33.
- [4] 杨 鑫. 华山松松塔和毛冬青化学成分及生物活性的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [5] 尹文清, 周中流, 邹节明, 等. 毛冬青根中化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 995-996.
- [6] 冯 锋, 朱明晓, 谢 宁. 毛冬青化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(10): 732-736.
- [7] 倪 晨, 陈汀波, 陈 军, 等. HPLC 法测定毛冬青中毛冬青苷元 A 的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1): 89-91.
- [8] 陈新菊, 利家平, 袁海铭, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定毛冬青药材中 ilexgenin A 的含量 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1337-1338.
- [9] 陈新菊, 利家平, 袁海铭, 等. 毛冬青药材中毛冬青皂苷甲和毛冬青皂苷 B₂ 的含量测定的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1880-1881.
- [10] 周中流, 尹文清, 傅春燕, 等. HPLC 法同时测定毛冬青药材中 2 个三萜皂苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2229-2231.
- [11] 梁旭霞, 徐文箭. 毛冬青胶囊中原儿茶醛含量测定的方法学验证 [J]. 中药材, 2007, 30(10): 1324-1325.
- [12] 朱才庆, 曾宪仪, 李玉云, 等. 毛冬青胶囊对照品的分离鉴定和质量标准研究 [J]. 中成药, 2007, 29(2): 303-304.
- [13] 上海市食品药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
- [14] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2010.