

RP-HPLC 法测定复方百部止咳颗粒中 5 种黄酮类成分

王 鸽, 张洪霞, 薛秋霞, 魏晓亮, 张晓梅, 赵怀清*

沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定复方百部止咳颗粒中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的方法。方法 Diamonsil C₁₈ 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 1%冰醋酸溶液, B 为乙腈, 线性梯度洗脱, 检测波长 283 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。结果 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素分别在 3.52~35.2 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、5.92~59.2 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、2.64~26.4 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、5.76~57.6 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、0.60~6.0 μg/mL ($r=0.999\ 8$) 线性关系良好; 平均加样回收率依次为 98.9%、99.8%、99.7%、99.8%、99.2%, RSD 分别为 0.6%、0.9%、1.0%、1.3%、1.3%。结论 该方法快速、简便, 重现性好, 适合于同时测定复方百部止咳颗粒中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素。

关键词: 复方百部止咳颗粒; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 黄芩苷; 黄芩素; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)03-0498-04

RP-HPLC determination of five flavonoids in Compound Baibu Zhike Granula

WANG Ge, ZHANG Hong-xia, XUE Qiu-xia, WEI Xiao-liang, ZHANG Xiao-mei, ZHAO Huai-qing

School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Key words: Compound Baibu Zhike Granula; naringin; hesperidin; neohesperidin; baicalin; baicalein; HPLC

复方百部止咳颗粒收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》第三册, 是由百部、陈皮、黄芩、枳壳、苦杏仁、桔梗、知母等 11 味中药经提取加工而成。百部具有清肺止咳的功效, 为君药; 陈皮、黄芩理气化痰, 消炎解毒, 为主药。临床上主要用于肺热咳嗽, 痰黄黏稠、百日咳的治疗。已有文献报道^[1-3]采用 HPLC 法分别测定制剂中橙皮苷、黄芩苷、柚皮苷的量。本实验建立了同时测定复方百部止咳颗粒中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的 RP-HPLC 法, 该方法简便、准确, 灵敏度高, 为该制剂质量标准的提高提供了依据。

1 仪器与材料

LC-10ATvp 高效液相色谱泵、SPD-10Avp 紫外检测器 (日本 Shimadzu 公司), ANASTAR 色谱数据工作站 (美国 Suntek Science 公司), KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器 (上海冠特超声仪器有限公司), BS124S 电子分析天平 (北京赛

多利斯仪器系统有限公司), HH-4 型数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司), SHB-III 循环水式真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), RE52CS-1 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

复方百部止咳颗粒 (广西日田药业集团有限责任公司, 批号 090327、090721、090914), 柚皮苷 (批号 110722-200610)、橙皮苷 (批号 110721-200613)、黄芩苷 (批号 110715-200514)、黄芩素 (批号 1115950-200604) 对照品均购于中国药品生物制品检定所, 新橙皮苷对照品 (质量分数≥99%, 上海融禾医药科技发展有限公司, 批号 091225)。

乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 1%冰醋酸水溶液, B 为乙腈, 线性梯度洗脱, 洗脱程序: 0~15 min、20%~30% B,

收稿日期: 2010-06-09

作者简介: 王 鸽, 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制方法与药动学研究。Tel: 15840148582 E-mail: wangge0319@163.com

*通讯作者 赵怀清 Tel: (024)23986556 E-mail: zhaohq1955@sina.com

15~25 min、30%~70% B；体积流量 1 mL/min；检测波长 283 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.2 混合对照品储备液的制备

取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素对照品适量，精密称定，分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解并稀释至刻度，摇匀，配制成质量浓度分别为 0.44、0.37、0.33、0.36、0.15 mg/mL 的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素对照品溶液。分别精密量取各对照品溶液 2.0、4.0、2.0、4.0、1.0 mL 置 25 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为 35.2、59.2、26.4、57.6、6.0 μg/mL 的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取复方百部止咳颗粒 10 包，研细。取约 1 g 粉末，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 20 mL，加热回流 30 min，放冷，滤过，滤渣用甲醇洗涤，合并滤液和洗涤液，蒸干，残渣用甲醇复溶并定容至 10 mL 量瓶中，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方比例分别称取除黄芩，除陈皮和枳壳，除黄芩、陈皮和枳壳以外的其余药味，按复方百部

止咳颗粒的制备工艺分别制备缺黄芩，缺陈皮、枳壳与缺黄芩、陈皮、枳壳的阴性样品。按“2.3”项下方法操作，制成缺黄芩，缺陈皮、枳壳和缺黄芩、陈皮、枳壳的阴性对照溶液。

2.5 系统适用性试验

取供试品溶液，进样分析，理论塔板数按柚皮苷计算不低于 9 000，按橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素计算均不低于 10 000，5 种成分与相邻峰之间分离度均大于 1.5，对称因子在 0.95~1.05。阴性对照溶液对供试品溶液测定无干扰。结果见图 1。

2.6 线性关系考察

依次精密吸取混合对照品储备液 1.0、2.0、4.0、6.0 和 8.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，制成系列质量浓度的混合对照品溶液。在上述色谱条件下，分别进样 10 μL，记录色谱图。以各对照品的质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，得回归方程：柚皮苷 $Y=5.323 \times 10^6 X+3.494 \times 10^3$ ($r=0.9998$)；橙皮苷为 $Y=4.624 \times 10^6 X+2.371 \times 10^3$ ($r=0.9999$)；新橙皮苷为 $Y=6.451 \times 10^6 X+2.084 \times 10^3$ ($r=0.9997$)；黄芩苷为 $Y=7.761 \times 10^6 X-4.723 \times 10^3$ ($r=0.9997$)；黄芩素 $Y=1.681 \times 10^7 X-5.493 \times 10^3$ ($r=0.9998$)；表明柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄

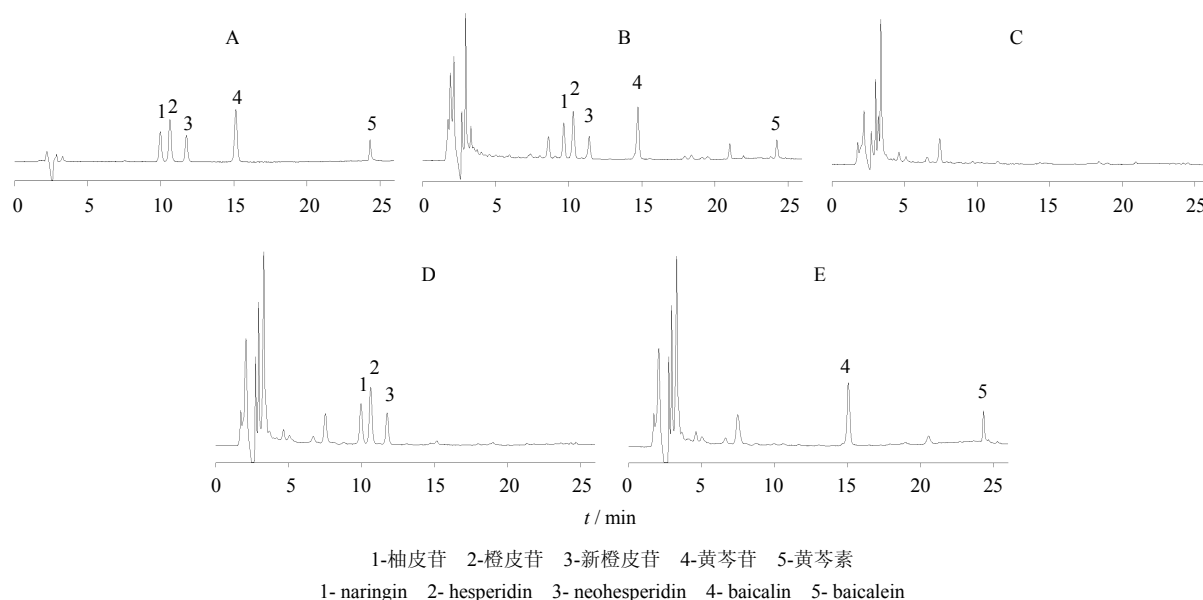


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B)、缺陈皮、枳壳、黄芩阴性对照 (C)、缺黄芩阴性对照 (D)、缺陈皮、枳壳阴性对照 (E) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample (B), negative sample without *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Aurantii Fructus*, and *Scutellariae Radix* (C), negative sample without *Scutellariae Radix* (D), and negative sample without *Citri Reticulatae Pericarpium* and *Aurantii Fructus* (E)

芩苷和黄芩素分别在 3.52~35.2 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 8$)、5.92~59.2 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$)、2.64~26.4 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 7$)、5.76~57.6 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 7$)、0.60~6.0 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 8$) 线性关系良好。

2.7 精密性试验

取混合对照品溶液(柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的质量浓度分别为 14.08、23.68、10.56、23.04、2.4 $\mu\text{g/mL}$)，在上述色谱条件下重复进样 6 次，结果柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的峰面积 RSD 分别为 0.9%、1.4%、1.6%、0.8%、0.7%。

2.8 重现性试验

取同一样品(批号 090721)，按“2.3”项下方法操作，平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素质量分数的 RSD 分别为 1.6%、1.8%、0.7%、1.5%、1.1%。

2.9 稳定性试验

取同一样品(批号 090721)的供试品溶液，室

温放置，按“2.1”项色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素色谱峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.6%、1.1%、2.0%、1.7%，表明供试品溶液室温下 24 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

称取已测定的样品(批号 090721) 9 份，每份 0.5 g，精密称定，分别加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液，制备供试品溶液，进样分析，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的回收率，结果平均回收率分别为 98.9%、99.8%、99.7%、99.8%、99.2%，RSD 分别为 0.6%、0.9%、1.0%、1.3%、1.3%。

2.11 样品测定

取 3 批样品，制备供试品溶液，进样分析，记录色谱峰，采用外标一点法计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素的质量分数，结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of samples ($n=3$)

批 号	柚皮苷		橙皮苷		新橙皮苷		黄芩苷		黄芩素	
	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %
090721	0.166	0.2	0.272	1.4	0.108	0.4	0.240	0.7	0.032	0.6
090327	0.162	0.2	0.270	0.7	0.109	0.4	0.237	1.1	0.031	1.1
090914	0.172	1.1	0.274	0.8	0.112	0.4	0.247	0.5	0.034	1.3

3 讨论

3.1 检测波长的选择

配制一定质量浓度的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷和黄芩素对照品溶液，分别在 200~400 nm 波长进行全扫描，结果柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷在 283 nm 波长处有最大吸收，黄芩苷在 280 nm 波长处有较强的紫外吸收，黄芩素在 272 nm 处有最大吸收，分别在上述 3 个波长下对样品进行了检测。在 280、272 nm 波长下柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的峰面积均减小，实验选择 283 nm 进行测定，各色谱峰分离良好，基线平稳，且待测 5 种成分的峰面积接近，各个峰均能满足定量的要求。

3.2 提取方法的选择

根据文献报道^[4-7]，本实验分别考察了超声提取法和回流提取法及提取溶剂(甲醇，50%、60%、70%、75%乙醇)、提取时间(15、30、45、60 min)、

溶剂体积(15、20、25 mL)对提取结果的影响。其中 70%乙醇和甲醇回流对供试品的提取效率较高，但因 70%乙醇提取液中含有较多糖类和果胶类物质，影响色谱柱寿命，故选用甲醇作为供试品的提取溶剂。提取时间和提取溶剂的考察表明 20 mL 溶剂用量提取 30 min 已提取完全。得到最优化的提取方法为甲醇 20 mL 加热回流提取 30 min。

3.3 色谱条件的选择

参考文献，采用乙腈-甲醇-磷酸溶液^[8]、乙腈-(0.02%、0.06%、0.12%、0.16%、0.2%) 磷酸溶液^[9]、甲醇-0.2%磷酸水溶液、甲醇-1%醋酸水溶液^[10]、乙腈-(0.5%、1%、1.5%) 醋酸水溶液等多个流动相系统，乙腈-甲醇-磷酸溶液为流动相时，柚皮苷和橙皮苷的分离效果不理想，不能达到测定的要求。乙腈系统的柱效优于甲醇系统。乙腈-磷酸系统黄芩素有拖尾，乙腈-醋酸系统各测定物质的柱效和相邻

两物质之间的分离度达到测定要求, 最终流动相系统定为 1%冰醋酸溶液-乙腈。

参考文献

- [1] 肖燕, 徐鹏, 王宁. HPLC 法测定复方百部止咳颗粒中橙皮苷的含量 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(16): 2458-2459.
- [2] 周作光. 高效液相色谱法测定复方百部止咳颗粒中黄芩苷含量 [J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(1): 46-48.
- [3] 高云峰, 赵瑞. 高效液相色谱法测定小儿百部止咳糖浆中橙皮苷的含量 [J]. 中国新技术新产品, 2009, 24: 26.
- [4] 戴航, 侯小涛, 程世贤. 正交试验优选复方百部止咳颗粒中黄芩苷的提取工艺 [J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(3): 139-141.
- [5] 魏建文, 李莹莹, 王传杰, 等. 用正交试验法优选黄芩中黄芩素的提取工艺 [J]. 山东中医杂志, 2009, 28(7): 493-495.
- [6] 董玄, 高文远, 李凤阁, 等. RP-HPLC 法测定枳壳药材中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 283-284.
- [7] 杨武亮, 杨世林, 张敏, 等. RP-HPLC 法测定枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(4): 261-263.
- [8] 孙冬梅, 毕晓黎, 胥爱丽, 等. HPLC 法测定不同产地陈皮药材中橙皮苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 1-3.
- [9] 郑国栋, 蒋林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.
- [10] 张箭, 肖丽和, 李发美. RP-HPLC 法测定黄芩属四种药材中五个活性成分的含量 [J]. 中药材, 2005, 28(5): 389-391.

天津中草药杂志社售过刊信息

天津中草药杂志社经国家新闻出版总署批准于 2009 年 8 月在天津滨海新区注册成立。编辑出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》(2009 年由《国外医药·植物药分册》改刊)、《药物评价研究》(2009 年由《中文科技资料目录·中草药》改刊)。欢迎投稿, 欢迎订阅。

《中草药》杂志合订本: 1974-1975 年、1976 年、1979 年、1988-1993 年 (80 元/年), 1996、1997 年 (110 元/年), 1998 年 (120 元/年), 1999 年 (135 元/年), 2000 年 (180 元/年), 2001-2003 年 (200 元/年), 2004 年 (220 元/年), 2005 年 (260 元/年), 2006—2008 年 (280 元/年), 2009—2010 年 (400 元/年)。

《中草药》增刊: 1996 年 (50 元), 1997 年 (45 元), 1998 年 (55 元), 1999 年 (70 元), 2000、2001 年 (70 元), 2002-2007 年 (65 元/年), 2008、2009 年 (55 元/年)。凡订阅《中草药》杂志且提供订阅凭证者, 购买增刊 7 折优惠, 款到寄刊。

《现代药物与临床》合订本: 2009—2010 年 (100 元/年)。

《国外医药·植物药分册》合订本: 1996—2008 年 (80 元/年), 2006—2008 年 (90 元/年)。

《药物评价研究》2009 年单行本, 每册 15.00 元, 2010 年合订本 100 元/年。

《中文科技资料目录·中草药》: 1993—2006 年合订本 (全套 2040 元), 2007—2008 年单行本, 每册定价 30.00 元, 全年订价 210.00 元 (6 期+年索引)。

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 (300193)

电子信箱: zcy@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

电话: (022)27474913, 23006821 传真: (022)23006821

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com

账号: 44114010010081504

户名: 天津中草药杂志社