

HPLC 法同时测定疏风解毒胶囊中 7 种活性成分

郭倩¹, 田成旺^{2,3}, 朱月信⁴, 张铁军^{2,3*}, 任涛^{2,3}, 李翔宇⁴, 成娅婷⁵

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300193

4. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

5. 天津大学, 天津 300072

摘要: **目的** 建立同时测定疏风解毒胶囊中鞣叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐和大黄素的 RP-HPLC 方法。**方法** 采用 RP-HPLC 法测定, 色谱柱为 Unitary C₁₈ 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 250 nm; 进样量 10 μL。**结果** 鞣叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐和大黄素分别在 0.096~1.920、0.089~1.784、0.119~2.348、0.059~1.176、0.021~4.224、0.206~4.120、0.053~1.064 μg 与色谱峰面积呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 98.43% (RSD 2.13%)、98.30% (RSD 2.68%)、99.31% (RSD 2.76%)、101.64% (RSD 2.37%)、97.47% (RSD 2.05%)、100.89% (RSD 1.98%)、99.05% (RSD 2.21%)。**结论** 该方法简单、快速、准确, 为疏风解毒胶囊的质量控制提供一种可靠的参考方法。

关键词: 疏风解毒胶囊; 活性成分; 鞣叶马鞭草苷; 马鞭草苷; 虎杖苷; 连翘酯苷 A; 毛蕊花糖苷; 甘草酸单铵盐; 大黄素
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1174-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.014

Simultaneous determination of seven active components in Shufeng Jiedu Capsule by HPLC

GUO Qian¹, TIAN Cheng-wang^{2,3}, ZHU Yue-xin⁴, ZHANG Tie-jun^{2,3}, REN Tao^{2,3}, LI Xiang-yu⁴, CHENG Ya-ting⁵

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

5. Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Objective To establish a reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPL) method for the simultaneous determination of the contents of hastatoside, verbenalin, polydatin, ofrsytllsoid A, verbascoside, ammonium glycyrrhizinate, and emodin in Shufeng Jiedu Capsule. **Methods** RP-HPLC method was applied with the chromatographic condition as follows: the chromatographic column was Unitary C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), acetonitrile-0.1% formic acid as the mobile phase with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** Linearity relationships of hastatoside, verbenalin, polydatin, ofrsytllsoid A, verbascoside, ammonium glycyrrhizinate, and emodin were 0.096—1.920, 0.089—1.784, 0.119—2.348, 0.059—1.176, 0.021—4.224, 0.206—4.120, and 0.053—1.064 μg, respectively, as well as the average recoveries of 98.43% (RSD 2.13%), 98.30% (RSD 2.68%), 99.31% (RSD 2.76%), 101.64% (RSD 2.37%), 97.47% (RSD 2.05%), 100.89% (RSD 1.98%), and 99.05% (RSD 2.21%). **Conclusion** The method is simple, fast, accurate, and can be used to control the quality of Shufeng Jiedu Capsule.

Key words: Shufeng Jiedu Capsule; active components; hastatoside; verbenalin; polydatin; ofrsytllsoid A; verbascoside; ammonium glycyrrhizinate; emodin

收稿日期: 2014-11-12

作者简介: 郭倩 (1991—), 女, 甘肃庆阳人, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制研究。Tel: (022)23006845 E-mail: grq1413@163.com

*通信作者 张铁军, 研究员, 主要研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjpr.com

疏风解毒胶囊是由虎杖、连翘、板蓝根、马鞭草、败酱草、柴胡、芦根、甘草 8 味药材组成的中药复方制剂,用于急性上呼吸道感染属风热证,症见发热、恶心、咽痛、头痛、鼻塞、流浊涕、咳嗽等,经多年临床实践与应用,疗效确切^[1-4]。目前,方中多种成分已有明确的药理活性,其中虎杖苷、大黄素、连翘酯苷 A、马鞭草苷、甘草酸单铵盐等成分均与疏风解毒胶囊祛风解表、清热解毒的功效相关。而现有的质量标准仅制定了采用薄层扫描法测定虎杖中大黄素的量^[5],有关疏风解毒胶囊中虎杖苷的定量测定方法有相关报道^[6],但这些均难以全面有效地控制药品的内在质量,目前关于疏风解毒胶囊多指标定量测定方法的研究还尚未见报道。本实验首次建立了同时测定疏风解毒胶囊中戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素 7 种指标成分的 RP-HPLC 方法,实验证明,该方法简单快速、灵敏度高,能进一步有效控制药品的质量。

1 仪器与材料

Dionex 高效液相系统,美国戴安公司;配有 Chromeleon 色谱工作站、DAD 检测器;色谱柱为 Unitary C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),华谱新创科技有限公司; Sartorius BT25S 电子天平,十万分之一,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; Mettler Toledo AB204-N 电子天平,万分之一,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; AS3120 超声仪,美国 Autoscience 公司。乙腈(色谱纯)、乙醇(分析纯),天津市康科德科技有限公司;甲酸,分析纯,天津市光复科技发展有限公司;去离子水。

戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素对照品均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-201208、110737-201212、111575-201302、111810-201306、111530-201305、110731-201310、110756-201310,各对照品质量分数均大于 98%。疏风解毒胶囊,由安徽济人药业有限公司提供,批号分别为 140203、140204、140206、140208、140213、140214。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素对照品,置于 25 mL 量瓶中,加适量甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得对照品混合溶液,含戟叶

马鞭草苷 96.0 μg/mL, 马鞭草苷 89.2 μg/mL, 虎杖苷 119.2 μg/mL, 连翘酯苷 A 58.8 μg/mL, 毛蕊花糖苷 211.2 μg/mL, 甘草酸单铵盐 206.0 μg/mL, 大黄素 53.2 μg/mL。

2.2 供试品溶液的制备

取疏风解毒胶囊内容物 1.0 g,精密称定,置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 70%乙醇水溶液 25 mL,称质量,回流提取 2 h,冷却后称质量,用 70%乙醇溶液补足失质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 空白对照溶液制备

依照疏风解毒胶囊标准,由相关辅料制得疏风解毒阴性胶囊,按照“2.2”项下方法制得空白对照溶液。

2.4 色谱条件

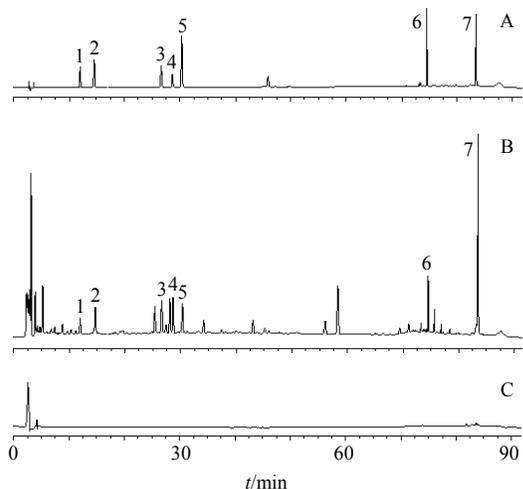
色谱柱为 Unitary C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~65 min, 10%~30%乙腈;65~85 min, 30%~80%乙腈;85~90 min, 80%~10%乙腈;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 250 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

2.5 专属性考察

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液,按“2.4”项下方法进样检测,结果 7 种被测成分均能达到基线分离,与相邻色谱峰的分度均大于 1.5,以各成分色谱峰计算,理论塔板数均大于 10 000,空白对照无干扰,HPLC 色谱图见图 1。

2.6 线性关系考察

精密吸取按“2.1”项下方法制备的混合对照品溶液 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0 μL,注入液相色谱仪,检测分析,以色谱峰峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数(r)和线性范围,结果分别为戟叶马鞭草苷 $Y=52.558 X-6.372 6, r=0.999 9$,线性范围 0.096~1.920 μg;马鞭草苷 $Y=80.154 X-4.007 0, r=0.999 9$,线性范围 0.089~1.784 μg;虎杖苷 $Y=71.991 X+13.925, r=0.999 8$,线性范围 0.119~2.348 μg;连翘酯苷 A $Y=38.143 X+9.693 0, r=0.998 9$,线性范围 0.059~1.176 μg;毛蕊花糖苷 $Y=151.69 X+4.462 3, r=0.999 8$,线性范围 0.021~4.224 μg;甘草酸单铵盐 $Y=97.902 X+6.570 5, r=0.999 8$,线性范围 0.206~4.120 μg;大黄素 $Y=108.97 X+$



1-戟叶马鞭草苷 2-马鞭草苷 3-虎杖苷 4-连翘酯苷 A 5-毛蕊花糖苷 6-甘草酸单铵盐 7-大黄素, 下图同
1-hastatoside 2-verbenalin 3-polydatin 4-ofrsytllsoid A 5-verbascoiside 6-ammonium glycyrrhizinate 7-emodin, same as below

图 1 混合对照品 (A)、疏风解毒胶囊供试品 (B) 和空白对照样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A), Shufeng Jiedu Capsule sample (B), and negative sample (C)

123.06, $r=0.9988$, 线性范围 $0.053\sim 1.064\ \mu\text{g}$ 。

2.7 精密度试验

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定峰面积值, 求得戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素日内精密度 RSD 分别为 0.63%、0.95%、0.89%、1.20%、0.79%、0.93%、1.10%; 连续分析 4 d, 每天进样 1 次, 求得日间精密度 RSD 分别为 0.94%、1.14%、1.21%、1.06%、1.03%、1.25%、1.04%。

2.8 重复性试验

取批号为 140204 的样品 6 份, 按“2.2”项下

方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下方法测定各物质的量。结果戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素的平均质量分数分别为 3.18、3.80、7.32、4.99、1.40、6.26、5.24 mg/g, RSD 分别为 2.53%、2.18%、2.06%、1.88%、2.11%、2.33%、1.97%。

2.9 稳定性试验

取重复性试验中 1 号供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、12 h, 按“2.4”项下色谱条件测定峰面积, 结果戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素峰面积的 RSD 值分别为 2.04%、1.73%、1.87%、2.19%、1.92%、2.16%、1.63%, 表明供试品溶液室温放置 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

取批号为 140204 的样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 分别精密加入戟叶马鞭草苷 (1.59 mg/mL)、马鞭草苷 (1.90 mg/mL)、虎杖苷 (3.66 mg/mL)、连翘酯苷 A (2.49 mg/mL)、毛蕊花糖苷 (0.70 mg/mL)、甘草酸单铵盐 (3.13 mg/mL)、大黄素 (2.62 mg/mL) 7 种对照品溶液 1.0 mL, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素的平均回收率分别为 98.43%、98.30%、99.31%、101.64%、97.47%、100.89%、99.05%, RSD 分别为 2.13%、2.68%、2.76%、2.37%、2.05%、1.98%、2.21%。

2.11 样品测定

取 6 批疏风解毒胶囊, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进样测定, 结果见表 1。

表 1 疏风解毒胶囊中 7 种成分测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of seven components in Shufeng Jiedu Capsule ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	戟叶马鞭草苷	马鞭草苷	虎杖苷	连翘酯苷 A	毛蕊花糖苷	甘草酸单铵盐	大黄素
140203	3.15	4.10	8.87	4.64	1.65	5.98	4.05
140204	2.80	3.60	8.29	4.15	1.69	6.11	4.30
140206	3.11	3.64	8.73	4.50	1.87	6.08	4.44
140208	3.21	3.95	8.59	4.70	1.99	6.67	4.43
140213	2.95	3.57	7.92	4.76	1.75	6.37	4.64
140214	2.78	3.77	8.03	4.36	1.74	6.25	4.29

3 讨论

本实验以君药虎杖中虎杖苷、大黄素的量为主要考察指标, 优选了供试品溶液制备方法。对包括超声、回流和索氏提取的 3 种提取方式进行考察, 结果表明采用回流提取时提取收率最高。另对回流提取条件包括提取溶剂、提取时间、提取次数进行考察, 实验结果表明, 采用 70%乙醇回流提取 2 h 时, 提取收率最高。

本实验考察对比了不同的流动相系统, 包括甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液, 结果表明, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液体系为流动相, 采用梯度洗脱方法, 样品中的待测组分分离较好, 理论塔板数符合要求, 故选用乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。

用甲醇溶液分别配制戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素对照品溶液, 使用 DAD 检测器进行 200~400 nm 全波长扫描, 结果表明, 戟叶马鞭草苷、马鞭草苷在 240 nm 处有最大吸收, 虎杖苷在 306 nm 处有最大吸收, 连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷在 330 nm 处有最大吸收, 甘草酸单铵盐、大黄素在 250 nm 处有最大吸收。实验比较了在 230、250、330 nm 检测波长下 7 个成分的吸收情况(图 2), 结果表明, 在 230 nm 检测波长下, 基线发生明显漂移; 在 330 nm 检测波长下, 戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、甘草酸单铵盐、大黄素的吸收均较弱; 在 250 nm 检测波长下, 7 种待测成分均具有较强的吸收, 分离度良好, 符合定量测定要求。故选择 250 nm 作为检测波长。

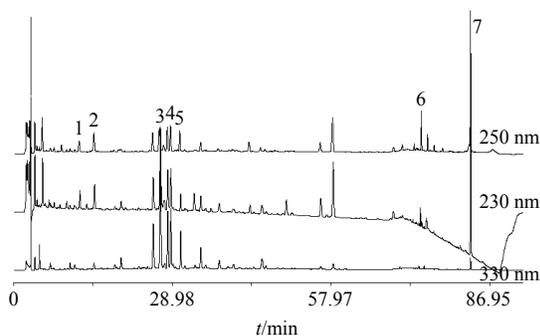


图 2 不同波长下疏风解毒供试品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of Shufeng Jiedu Capsule sample at different detection wavelength

由样品定量测定结果可以看出, 不同批次疏风解毒胶囊之间相应活性成分的量较为接近, 大部分批次的量差异在±5%范围内, 表明疏风解毒胶囊的质量较为稳定, 从而为产品的临床安全有效奠定了坚实的基础。但是, 个别批次的某些分量也存在差异较大的现象, 需要在以后的生产过程中通过加强药材质量控制和制备工艺控制等措施加以改进和完善。

研究表明, 大黄素、虎杖苷分别具有抗菌、抗病毒、镇咳作用^[7], 连翘酯苷具有强的抗菌、抗病毒作用^[8], 马鞭草苷具有镇咳、抗微生物作用^[9], 甘草酸单铵盐具有抗炎作用^[10], 这些成分分别来源于本方君药虎杖、臣药连翘、佐药马鞭草、使药甘草。本实验首次建立了同时测定疏风解毒胶囊中戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、甘草酸单铵盐、大黄素的 HPLC 分析方法, 该法灵敏度高, 重复性好, 结果可靠, 操作简单易行, 为该产品建立了一种全面有效的质量控制方法。

参考文献

- [1] 奚肇庆, 周建中, 梅建强, 等. 疏风解毒胶囊治疗病毒性上呼吸道感染发热患者 130 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 426-427.
- [2] 胡蓉, 王丽华, 张珺珺, 等. 疏风解毒胶囊治疗急性咽炎风热证的临床观察 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(5): 460-462.
- [3] 叶祥庆, 曾德志, 罗世芳, 等. 疏风解毒胶囊治疗感冒风热证临床观察 [J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 664-666.
- [4] 王书臣, 罗海丽. 疏风解毒胶囊治疗上呼吸道感染 480 例临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(12): 875.
- [5] 中国食品药品监督管理局标准 [S]. YB200652009.
- [6] 张海欢, 缪红. HPLC 法测定疏风解毒胶囊中虎杖苷 [J]. 中成药, 2013, 35(10): 2281-2283.
- [7] 伍晓春, 陆豫. 虎杖的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中医药信息, 2005, 22(2): 22-25.
- [8] 胡静, 马琳, 张坚, 等. 连翘的研究进展 [J]. 中南药学, 2012, 10(10): 760-764.
- [9] 陈兴丽, 孟岩, 张兰桐. 马鞭草化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 河北医药, 2010, 32(15): 2089-2091.
- [10] 田庆来, 官月平, 张波, 等. 甘草有效成分的药理作用研究进展 [J]. 天然药物的研究与开发, 2006, 18(2): 343-347.