

HPLC 法同时测定拨云退翳丸中 10 种指标成分

谢 意¹, 郑礼胜², 雷勇胜²

1. 天津医科大学第二医院, 天津 300211

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 采用 HPLC-DAD 法同时测定拨云退翳丸中甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷 10 种成分。方法 应用 Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈 (50 : 50, A) 和 0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 梯度洗脱程序为 0~5 min, 50% A; 5~30 min, 50%~80% A; 30~32 min, 80%~50% A; 32~40 min, 50% A; 进样体积 10 μL, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 40 °C。结果 甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷 10 种成分能够达到很好分离; 其线性范围分别为 2~20 ($r=0.999\ 2$)、20~200 ($r=0.999\ 5$)、3~30 ($r=0.999\ 4$)、2~20 ($r=0.999\ 7$)、1.2~12.0 ($r=0.999\ 5$)、3.5~35.0 ($r=0.999\ 2$)、8~80 ($r=0.999\ 3$)、9~90 ($r=0.999\ 3$)、2~20 ($r=0.999\ 6$)、3~30 μg/mL ($r=0.999\ 5$); 平均加样回收率分别为 99.1%、101.1%、100.2%、99.4%、101.9%、98.5%、100.5%、101.7%、100.8%、99.7%, RSD 分别为 0.62%、0.79%、0.77%、0.83%、0.47%、0.38%、0.97%、1.05%、0.86%、1.11% ($n=6$)。6 批次供试品中甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷质量分数分别为 0.505~0.685、1.793~2.012、0.227~0.268、0.183~0.206、1.258~1.324、0.348~0.381、0.648~0.720、1.544~1.722、1.543~1.627、3.434~3.883 mg/丸。结论 该方法快速、灵敏度高、准确度高、专属性好, 为拨云退翳丸的质量控制提供依据。

关键词: 拨云退翳丸; HPLC-DAD; 甘草苷; 甘草酸铵; 蔓荆子黄素; 胡薄荷酮; 阿魏酸; 绿原酸; 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸; 盐酸小檗碱; 山柰素; 蒙花苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-3039-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.013

Simultaneous determination of 10 constituents in Boyun Tuiyi Pill by HPLC

XIE Yi¹, ZHENG Li-sheng², LEI Yong-sheng²

1. The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

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

Abstract: Objective To develop an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, vitexicarpin, pulegone, ferulic acid, chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoyl quinic acid, berberine hydrochloride, kaempferol, and buddleoside in Boyun Tuiyi Pill (BTP). **Methods** Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was composed of methanol-acetonitrile (50 : 50, A) and 0.05% phosphoric acid (B) with gradient elution. Gradient elution: 0—5.0 min, 50% A; 5.0—30.0 min, 50%—80% A; 30.0—32.0 min, 80%—50% A; and 32.0—40.0 min, 50% A; Injection volume was 10 μL. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 40 °C. **Results** liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, vitexicarpin, pulegone, ferulic acid, chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoyl quinic acid, berberine hydrochloride, kaempferol, and buddleoside were separated well. The linear calibration curves were obtained in 2—20 μg/mL for liquiritin, $r = 0.999\ 2$; 20—200 μg/mL for ammonium glycyrrhizinate, $r = 0.999\ 5$; 3—30 μg/mL for vitexicarpin, $r = 0.999\ 4$; 2—20 μg/mL for pulegone, $r = 0.999\ 7$; 1.2—12.0 μg/mL for ferulic acid, $r = 0.999\ 5$; 3.5—35.0 μg/mL for chlorogenic acid, $r = 0.999\ 2$; 8—80 μg/mL for 3,5-dicaffeoyl quinic acid, $r = 0.999\ 3$; 9—90 μg/mL for berberine hydrochloride, $r = 0.999\ 3$; 2—20 μg/mL for kaempferol, $r = 0.999\ 6$; and 3—30 μg/mL for buddleoside, $r = 0.999\ 5$. The average recoveries of the 10 constituents were 99.1%, 101.1%, 100.2%, 99.4%, 101.9%, 98.5%, 100.5%, 101.7%, 100.8%, and 99.7% with RSD of 0.62%, 0.79%, 0.77%, 0.83%, 0.47%, 0.38%, 0.97%, 1.05%, 0.86%, and 1.11%. The contents of six

收稿日期: 2016-04-20

作者简介: 谢 意 (1987—), 研究方向为中药的质量研究与临床药学。Tel: 13702149806 (022)88328604 E-mail: xieyi870223@163.com

batches of the liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, vitexicarpin, pulegone, ferulic acid, chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoyl quinic acid, berberine hydrochloride, kaempferol, and buddleioside were 0.505—0.685, 1.793—2.012, 0.227—0.268, 0.183—0.206, 1.258—1.324, 0.348—0.381, 0.648—0.720, 1.544—1.722, 1.543—1.627, and 3.434—3.883 mg/pill, respectively. **Conclusion** The method is rapid and has high sensitivity, high accuracy, and good specificity. It can be applied to the quality control of BTP.

Key words: Boyun Tuiyi Pill; HPLC-DAD; liquiritin; ammonium glycyrrhizinate; vitexicarpin; pulegone; ferulic acid; chlorogenic acid; 3,5-dicaffeoyl quinic acid; berberine hydrochloride; kaempferol; buddleioside

拨云退翳丸由菊花、蛇蜕、荆芥穗、薄荷、川芎、地骨皮、楮实子、甘草、蒺藜(盐炙)、木贼、蝉蜕、蔓荆子、当归、黄连、花椒、天花粉 17 味药材组成,主要用于散风清热、退翳明目,主治风热上扰所致的目翳外障、视物不清、隐痛流泪^[1-2]。关于其质量控制研究的报道,主要是测定其中的甘草酸^[3]、盐酸小檗碱^[4-5],《中国药典》2015 年版规定以蒙花苷为控制指标。《中国药典》2015 年版中当归的指标成分为阿魏酸,甘草的主要指标成分为甘草苷和甘草酸铵,木贼的主要指标成分为山柰素,黄连的主要指标成分为盐酸小檗碱,荆芥穗的主要指标成分为胡薄荷酮,菊花的主要指标成分为绿原酸和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,蔓荆子的主要指标成分为蔓荆子黄素,密蒙花的主要指标成分为蒙花苷。为更有效地控制拨云退翳丸的质量,本实验采用 HPLC-DAD 法在同一色谱条件下测定该制剂中甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷 10 种成分。结果表明,该方法良好,可为全面控制拨云退翳丸内在质量提供参考。

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪, DAD 紫外检测器, Waters 公司; 梅特勒 ME204E 型电子分析天平, 十万分之一, 瑞士梅特勒公司; 甘草苷(批号 111610-201106, 质量分数 93.7%)、甘草酸铵(批号 110731-201418, 质量分数 93.1%)、蔓荆子黄素(批号 111554-201304, 质量分数 99.7%)、胡薄荷酮(批号 111706-201205, 质量分数 99.8%)、阿魏酸(批号 110773-201313, 质量分数 99.6%)、绿原酸(批号 110753-201415, 质量分数 96.2%)、盐酸小檗碱(批号 110713-201212, 质量分数 96.2%)、山柰素(批号 110861-201310, 质量分数 93.2%)、蒙花苷(批号 111528-201509, 质量分数 97.5%), 均购自中国食品药品检定研究院; 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号 MUST-15112111, 质量分数 99.74%), 成都曼斯特生物科技有限公司; 拨云退翳丸(规格: 9 g/丸), 吉林紫鑫药业股份有限公司, 批号 150712、150715、

150820; 陕西华西制药股份有限公司, 批号 151014、151016、151018; 甲醇与乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷对照品适量, 精密称定, 用 50% 甲醇配制成含甘草苷 20 μg/mL、甘草酸铵 200 μg/mL、蔓荆子黄素 30 μg/mL、胡薄荷酮 20 μg/mL、阿魏酸 12 μg/mL、绿原酸 35 μg/mL、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 80 μg/mL、盐酸小檗碱 90 μg/mL、山柰素 20 μg/mL、蒙花苷 30 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取质量差异项下的本品 5 丸, 剪碎, 混匀, 取约 1 g, 精密称定, 加硅藻土 1 g, 研匀, 置索氏提取器中, 用甲醇适量分次洗涤乳钵, 洗液并入索氏提取器中, 加入适量甲醇, 加热回流 3.0 h, 提取液移至蒸发皿中, 浓缩至约 15 mL, 放冷, 转移至 25 mL 量瓶中, 用适量的 50% 甲醇洗涤容器数次, 洗液并入量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性对照溶液制备

按拨云退翳丸处方比例和工艺, 分别制备缺少密蒙花药材的阴性对照样品、缺少木贼和蔓荆子药材的阴性对照样品、缺少当归、菊花、荆芥穗、黄连药材的阴性对照样品、缺少甘草药材的阴性对照样品, 并按“2.2”项下方法制备各阴性对照溶液。

2.4 色谱条件

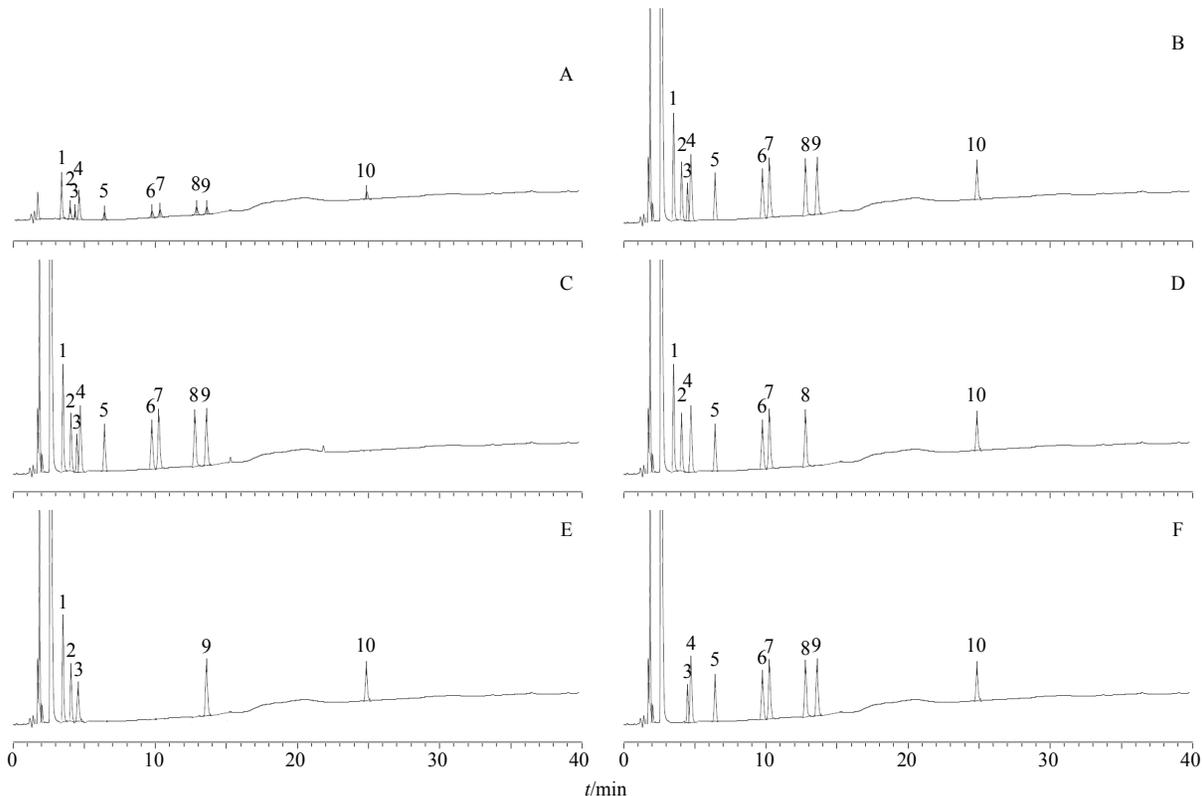
色谱柱为 Shim-pack VP-ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为甲醇-乙腈(50:50, A) 和 0.05% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序为 0~5 min, 50% A; 5~30 min, 50%~80% A; 30~32 min, 80%~50% A; 32~40 min, 50% A; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C; 进样体积 10 μL; 检测波长(分段变波长测定): 0~5 min 为 250 nm, 5~9 min

为 316 nm, 9~20 min 为 350 nm, 20~30 min 为 326 nm, 30~40 min 为 250 nm。

2.5 专属性考察

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按照“2.4”项下方法进行样检测,结

果表明供试品色谱图中呈现与对照品主峰保留时间一致的色谱峰,阴性对照无干扰。甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷与其相邻色谱峰的分度均大于 2.0。结果见图 1。



1-甘草苷 2-甘草酸铵 3-蔓荆子黄素 4-胡薄荷酮 5-阿魏酸 6-绿原酸 7-3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 8-盐酸小檗碱 9-山柰素 10-蒙花苷
1-liquiritin 2-ammonium glycyrrhizinate 3-vitexicarpin 4-pulegone 5-ferulic acid 6-chlorogenic acid 7-3,5-dicaffeoyl quinic acid 8-berberine hydrochloride 9-kaempferol 10-buddleioside

图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B)、缺密蒙花阴性对照 (C)、缺木贼和蔓荆子阴性对照 (D)、缺当归、菊花、荆芥穗、黄连阴性对照 (E)、缺甘草阴性对照 (F) 的 HPLC-DAD 图

Fig. 1 HPLC-DAD of mixed reference substances (A), sample (B), negative control without *Buddlejae Flos* (C), negative control without *Equiseti hiemalis Herba* and *Viticis Fructus* (D), negative control without *Angelica Sinensis Radix*, *Chrysanthemi Flos*, *Schizonepetae Spike*, and *Coptidis Rhizoma* (E), and negative control without *Glycyrrhizae Radix* (F)

2.6 线性关系的考察

取“2.1”项下混合对照品溶液,精密量取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列溶液。按“2.4”项色谱条件,分别精密吸取上述溶液各 10 μL,测定峰面积,以质量浓度为横坐标 (X),峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归,结果表明,甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷在相应质量浓度范围内呈良好线性关系,线性范围、回归方程、相关系数分别为

甘草苷 $Y=11.42 X+452.8$, $r=0.999 2$, 线性范围 2~20 μg/mL; 甘草酸铵 $Y=-4.352 X+873.5$, $r=0.999 5$, 线性范围 20~200 μg/mL; 蔓荆子黄素 $Y=342.1 X+6 738.9$, $r=0.999 4$, 线性范围 3~30 μg/mL; 胡薄荷酮 $Y=0.472 X-3.847$, $r=0.999 7$, 线性范围 2~20 μg/mL; 阿魏酸 $Y=23.65 X-87.38$, $r=0.999 5$, 线性范围 1.2~12.0 μg/mL; 绿原酸 $Y=-3.728 X+56.93$, $r=0.999 2$, 线性范围 3.5~35.0 μg/mL; 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 $Y=53.21 X+688.3$, $r=0.999 3$, 线性范围 8~80 μg/mL; 盐酸小檗碱 $Y=843.5 X+55.44$, $r=0.999 3$, 线性范围 9~

90 μg/mL; 山柰素 $Y = -0.538X + 6.473$, $r = 0.9996$, 线性范围 2~20 μg/mL; 蒙花苷 $Y = 6.444X + 78.39$, $r = 0.9995$, 线性范围 3~30 μg/mL。

2.7 精密度试验

精密吸取“2.1”项下的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算, 求得甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 0.56%、1.11%、1.25%、1.31%、0.98%、0.94%、0.77%、0.59%、0.86%、0.61%。

2.8 重复性试验

取同一批号样品(批号为 150712), 按照“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件分别进样, 测定峰面积, 计算质量分数。结果甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷平均质量分数的 RSD 分别为 0.73%、0.51%、0.55%、1.18%、0.83%、1.06%、0.99%、0.74%、0.82%、0.49%。

2.9 稳定性试验

取同一批号样品(批号为 150712), 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、6、4、8、10、12、16、18、24 h, 按照“2.4”项下色谱条件进行测定, 计算其峰面积。结果甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 0.98%、0.95%、1.03%、1.03%、0.97%、1.01%、0.89%、0.94%、0.97%、0.85%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

取同一批号样品(批号为 150712), 每份约 1.0

g, 精密称定, 分成 3 组, 分别按已知质量分数的 50%、100%、150% 3 个水平加入混合对照品溶液, 按照“2.2”项下方法平行制备供试品溶液, 进样分析, 计算回收率。结果甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷的平均回收率分别为 99.1%、101.1%、100.2%、99.4%、101.9%、98.5%、100.5%、101.7%、100.8%、99.7%、RSD 分别为 0.62%、0.79%、0.77%、0.83%、0.47%、0.38%、0.97%、1.05%、0.86%、1.11%。

2.11 样品测定

分别取不同批号的拨云退翳丸适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 计算 10 种成分质量分数。结果见表 1。6 批次供试品中甘草苷、甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷质量分数分别为 0.505~0.685、1.793~2.012、0.227~0.268、0.183~0.206、1.258~1.324、0.348~0.381、0.648~0.720、1.544~1.722、1.543~1.627、3.434~3.883 mg/丸。结果表明本品各批次之间 10 种成分略有差异, 相同厂家的批次差异较小, 不同厂家的差异较大, 这可能是由于不同厂家采购的药材不同导致的。

3 讨论

以 10 种目标成分的提取率为考察指标, 分别考察了影响索氏提取的因素, 包括提取溶剂(甲醇、乙醇、50%甲醇、70%甲醇)、提取时间(1.0、1.5、2.0、3.0 h), 最终确定甲醇为提取溶剂, 提取时间为 3.0 h。

对于多指标成分的控制, 一般选择分段变波长检测^[6-9]。根据《中国药典》2015 年版, 甘草苷、

表 1 6 批拨云退翳丸样品中 10 种成分定量测定结果

Table 1 Determination of 10 constituents in six batches of BTP

批号	质量分数/(mg·丸 ⁻¹)									
	甘草苷	甘草酸铵	蔓荆子黄素	胡薄荷酮	阿魏酸	绿原酸	3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	盐酸小檗碱	山柰素	蒙花苷
150712	0.505	2.012	0.236	0.183	1.258	0.370	0.713	1.563	1.611	3.734
150715	0.511	1.997	0.227	0.187	1.266	0.354	0.718	1.544	1.623	3.682
150820	0.509	1.994	0.238	0.178	1.199	0.348	0.720	1.559	1.627	3.883
151014	0.677	1.802	0.256	0.198	1.311	0.381	0.655	1.709	1.554	3.572
151016	0.685	1.793	0.261	0.191	1.324	0.374	0.648	1.722	1.543	3.551
151018	0.683	1.812	0.268	0.206	1.322	0.359	0.651	1.706	1.564	3.434

甘草酸铵、蔓荆子黄素、胡薄荷酮、阿魏酸、绿原酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、盐酸小檗碱、山柰素、蒙花苷的检测波长分别为 237、237、258、252、316、348、348、345、365、326 nm; 根据实验结果确定了 250、316、350、326 nm 4 个检测波长, 分段变波长对 10 种成分进行检测。结果表明各指标成分峰形良好, 分离度高。

本实验首次建立变波长 HPLC-DAD 法同时测定拨云退翳丸中 10 种活性成分的方法, 方法简便、结果可靠, 可作为拨云退翳丸多指标定量测定方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 于红海. 加减拨云退翳散治疗老年性蚕食性角膜溃疡 49 例 [J]. 浙江中医杂志, 2011, 46(8): 589.
- [3] 宋新波, 张丽娟, 李 锦, 等. 拨云退翳丸的质量控制方法研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1014-1017.
- [4] 蒋万浪, 姚丽佳, 沈克拉. 拨云退翳丸质量标准研究 [J]. 中国药业, 2004, 13(7): 41-42.
- [5] 黄树华, 吕玉光, 刘惠军, 等. 双波长系数倍率法测定拨云退翳丸中小檗碱的含量 [J]. 佳木斯医学院学报, 1996, 19(2): 40-41.
- [6] 郑 娟, 茅 纯. HPLC 波长转换法同时测定小儿咳喘灵颗粒中 (*R,S*)-告依春、绿原酸和甘草苷的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 727-731.
- [7] 殷洪梅, 刘俊超, 徐忠坤, 等. HPLC-UV-ELSD 同时测定复方红景天胶囊中 8 种成分 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 771-774.
- [8] 王 冬, 雷勇胜, 王 晨. 超高效液相色谱法测定热炎宁颗粒中大黄素、咖啡酸、绿原酸、野黄芩苷、木犀草素和虎杖苷 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(12): 1365-1368.
- [9] 魏 霞, 谢强胜, 祝清芬, 等. UPLC-DAD 法同时测定珍龙醒脑胶囊中的 9 种成分 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1926-1930.