

RP-HPLC法测定咽炎片中哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的含量

付永慧, 彭绪玲, 熊志立*, 李发美

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法同时测定咽炎片中哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷和黄芩苷 5 种有效成分的含量。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 以甲醇-0.05% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 于 278 nm 波长下检测, 柱温为 35 ℃。结果: 哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷和黄芩苷进样浓度分别在 0.200~4.00, 0.208~4.16, 0.610~12.2, 0.960~19.2, 1.00~20.0 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好; 平均回收率 ($n=6$) 分别为 100%, 102%, 101%, 98.3%, 101%。结论: 本方法简便, 准确可靠, 重现性好, 能有效测定该药品主要成分的含量, 具有较强的实用价值。

关键词: 高效液相色谱; 咽炎片; 哈巴俄苷; 肉桂酸; 丹皮酚; 芸香苷; 黄芩苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2032-04

RP-HPLC determination of harpagoside, cinnamic acid, paeonol, rutin and baicalin in Yanyan tablets

FU Yong-hui, PENG Xu-ling, XIONG Zhi-li*, LI Fa-mei

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

Abstract Objective To develop an HPLC method for determining the content of harpagoside, cinnamic acid, paeonol, rutin and baicalin in Yanyan tablets. **Methods** A Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was methanol-water (contained 0.05% phosphoric acid) for gradient elution with flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection was set at 278 nm, and the column temperature was maintained at 35 ℃. **Results** Good linearities were obtained from 0.200 to 4.00, 0.208 to 4.16, 0.610 to 12.2, 0.960 to 19.2, 1.00 to 20.0 μg·mL⁻¹ for harpagoside, cinnamic acid, paeonol, rutin and baicalin, respectively. The mean recoveries ($n=6$) of 5 components were 100%, 102%, 101%, 98.3%, 101%, respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility. It has been successfully applied to the quantitative determination of the main components of Yanyan tablets.

Key words RP-HPLC; harpagoside; cinnamic acid; paeonol; rutin; baicalin; Yanyan tablets

咽炎片由玄参、牡丹皮、地黄、木蝴蝶、板蓝根、(制)款冬花等 12 味中药组方, 收载于卫生部药品标准·中药成方制剂 (第 2 册), 具有养阴润肺、清热解毒、清利咽喉、镇咳止痒之功效^[1]。组方药材的主要有效成分为萜类和黄酮类化合物^[2~4], 目前咽炎片部颁标准中仅有萜类的理化鉴别与 (制)款冬花花粉粒的显微鉴别, 无有效成分含量测定。有文献报道测定咽炎片中哈巴俄苷^[5]、丹皮酚^[6]和黄芩苷^[7]含量的 HPLC 方法, 尚未见多成分同时测定的报道。为了进一步完善咽炎片的质量控制方法,

本文建立了 RP-HPLC 法同时测定咽炎片中哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷和黄芩苷的含量, 用于监测制剂中有效成分含量变化情况, 以全面控制制剂质量。

1 仪器与试剂

JASCO 高效液相色谱仪, UV-975 紫外检测器, ANASTAR 色谱工作站。

对照品哈巴俄苷 (批号 111730-200603)、肉桂酸 (批号 110786-200503)、丹皮酚 (批号 708-9003)、芸香苷 (批号 080-9303) 和黄芩苷 (批号

* 通讯作者 Tel: (024) 23986290 E-mail: beary200@126.com

110715- 200514)均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用。咽炎片由各厂家提供。甲醇(江苏汉邦科技有限公司)为色谱纯,磷酸(沈阳经济技术开发区试剂厂)、醋酸(天津市百世化工有限公司)、甲酸(天津市博迪化工有限公司)为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品储备液 精密称取对照品哈巴俄苷 10.0 mg 肉桂酸 10.4 mg, 丹皮酚 12.2 mg 芸香苷 9.6 mg 黄芩苷 10.0 mg 分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量溶解并定容,制得各对照品储备液。依次精密吸取上述 5 个储备液 1.0 1.0 2.5 5.0 5.0 mL 于同一 25 mL 量瓶中,以 30% 甲醇定容,即得。

2.1.2 供试品溶液 取咽炎片适量,除去包衣,研细,取 0.6 g 精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加 30% 甲醇 20 mL,超声提取 (180 W, $35 \pm 5^\circ\text{C}$ kHz) 30 min 冷却后以 30% 甲醇定容,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按照咽炎片制备工艺和“2.1.2”项下方法操作,分别制备玄参、牡丹皮、(制)款冬花和木蝴蝶的阴性样品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

2.2.1 色谱条件 采用 Kromasil C_{18} 分析柱 (4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μm); 以甲醇 (A) - 0.05% 磷酸水溶液 (B) 为流动相,线性梯度洗脱 [0~ 10 min, 20% $\rightarrow$ 35% A; 10~ 15 min, 35% $\rightarrow$ 40% A; 15~ 35 min, 40% $\rightarrow$ 44% A; 35~ 40 min, 44% $\rightarrow$ 55% A; 40~ 45 min, 55% $\rightarrow$ 75% A], 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 检测波长 278 nm,柱温 35°C ,进样量 20 μL 。

2.2.2 系统适用性试验 按“2.2.1”项下的色谱条件,取供试品溶液进样分析,理论塔板数以芸香苷计不低于 10000,此 5 种成分的色谱峰对称因子在 0.98~ 1.08 之间,且与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5。混合对照品溶液进样分析,峰面积的 RSD ($n = 5$) 分别为 0.50%, 1.5%, 1.7%, 1.3%, 1.9%。混合对照品、样品、阴性样品色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品储备液 0.25 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,以 30% 甲醇定容,制成系列对照品溶液。按“2.2.1”项下的色谱条件测定峰面积,以溶液浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归,绘制标准曲线,得到哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷和黄芩苷的线性回

归方程分别为:

$$Y = 3.35 \times 10^4 X - 2.97 \times 10^2 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 8.32 \times 10^4 X - 2.00 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 4.74 \times 10^4 X - 3.11 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 7.29 \times 10^3 X - 3.28 \times 10^2 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 1.87 \times 10^4 X - 1.98 \times 10^3 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为 0.200~ 4.00 0.208~ 4.16 0.610 ~ 12.2 0.960~ 19.2 1.00~ 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 稳定性试验 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0 2 4 8 12 24 h 测定峰面积。结果表明,供试品溶液在 24 h 内色谱峰面积无显著性变化,哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的 RSD 分别为 2.0%, 2.4%, 2.5%, 2.8%, 1.0%。

2.5 重复性试验 精密称取同一批号咽炎片 (批号 20080516) 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行分析,测定峰面积,计算哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的含量平均值 ($n = 6$) 分别为 93.1 79.0 252 629 626 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.4%, 1.3%, 1.9%, 2.9%, 1.7%。结果表明方法的重复性良好。

2.6 日间精密度 精密称取同一批号咽炎片 (批号 20080516) 6 份,按“2.5”项下方法连续测定 3 d 计算各成分的含量,其 RSD ($n = 3$) 分别为 0.70%, 2.7%, 2.8%, 1.2%, 2.8%。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的咽炎片 (批号 20080516) 6 份,分别加入各对照品溶液适量,按照“2.1.2”项下方法制备溶液后,按“2.2.1”项下色谱条件进行分析,计算哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的平均回收率,结果见表 1。

表 1 哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 The recovery results of harpagoside, cinnamic acid, paeonol, rutin and baicalin

成分 (component)	样品含量 (content) μg	加入量 (added) μg	测得量 (detected) μg	平均回收率 (average recovery) %	RSD %
哈巴俄苷 (harpagoside)	27.9	30.0	57.9	100	2.2
肉桂酸 (cinnamic acid)	23.8	22.9	47.1	102	2.4
丹皮酚 (paeonol)	76.8	75.6	154	101	2.9
芸香苷 (rutin)	187	182	366	98.3	0.30
黄芩苷 (baicalin)	191	200	392	101	1.6

2.8 样品测定 取不同厂家咽炎片,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件

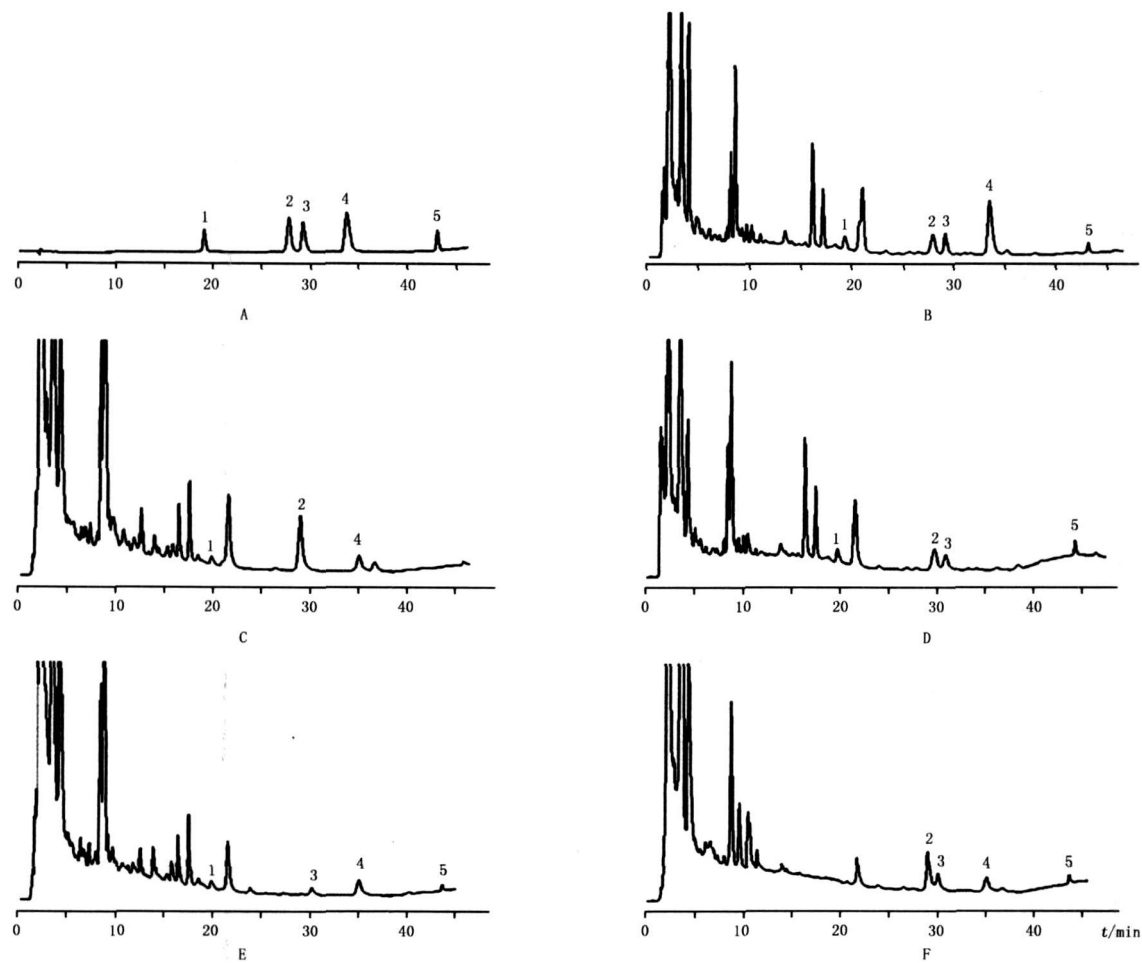


图 1 混合对照品 (A)、样品 (B)、玄参阴性样品 (C)、牡丹皮阴性样品 (D)、木蝴蝶阴性 (E) 及 (制) 款冬花阴性 (F) 色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances(A), sample(B), negative sample without Radix Scrophulariae(C), negative sample without Cortex Moutan (D), negative sample without Semen Oroxyli(E) and negative sample without Flos Farfarae(F)
1. 芸香苷 (rutoside) 2. 黄芩苷 (baicalin) 3. 肉桂酸 (cinnamic acid) 4. 丹皮酚 (paeonol) 5. 哈巴俄苷 (harpagoside)

进行分析, 记录色谱图。采用外标法分别计算哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷和黄芩苷的含量, 测定结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取条件的选择 分别考察了水及 30%, 50%, 75%, 100% 甲醇超声提取。结果表明水与 100% 甲醇对黄芩苷与芸香苷的提取效率较低, 75% 甲醇相对略低, 30% 甲醇与 50% 甲醇提取 5 种成分效率均较好, 参考相关文献^[8], 最终采用 30% 甲醇作为提取溶剂。考察了超声与回流提取, 结果二者无显著性差异, 试验采用了操作较简便的超声提取; 又考察了不同提取时间的影响, 结果表明, 超声 30 min、60 min、90 min 的提取效率相近, 所以本试验选择提取时间为 30 min。

表 2 咽炎片中哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

Tab 2 The content of harpagoside, cinnamic acid, paeonol, rutoside and baicalin in Yanyan tablets

批号 (Lot No.)	哈巴俄苷 (harpagoside)	肉桂酸 (cinnamic acid)	丹皮酚 (paeonol)	芸香苷 (rutoside)	黄芩苷 (baicalin)
20080516	94.0	78.1	258	624	631
20080301	11.6	108	27.9	—	73.5
20070501	—	19.3	27.7	42.2	535
20070319	9.37	47.9	30.0	125	259
20071029	23.0	60.4	28.8	106	249
20070902	—	75.0	30.0	—	451
20080524	—	58.5	40.9	—	351
20080503	—	68.4	44.5	—	145
20080202	12.7	40.0	28.5	51.0	57.0
20070501	—	10.1	—	47.8	395

注 (note): 每一批号代表 1 个厂家 (each lot number represents a manufacturer);
“—” 未检测到 (not detected)

3.2 流动相的选择 由于待测组分结构中均含有羟基或羧基等基团,为了改善峰形与分离度,考察了在流动相的水相中加入一定比例的醋酸,或甲酸、磷酸,结果显示,加入磷酸效果最佳;又考察了不同的磷酸浓度(0.01%, 0.02%, 0.05%),结果表明:增加磷酸浓度,分离效果随之改善,因此,本试验采用0.05%磷酸水溶液作为流动相的水相。咽炎片所含成分复杂,采用等度洗脱保留时间较长且分离度较差,梯度洗脱能将5个成分有效分离。

3.3 检测波长的选择 由于待测成分结构上的差异,决定了其最大吸收波长不等。本试验采用DAD检测器进行波长扫描,结果显示,芸香苷在365 nm处有最大吸收,丹皮酚的最大吸收波长为273 nm,哈巴俄苷和肉桂酸的最大吸收波长为278 nm,黄芩苷在280 nm处有最大吸收,由于哈巴俄苷与肉桂酸的含量较低,为了进行同时测定且保证检测灵敏度,最终确定278 nm为测定的最佳波长。

3.4 柱温的选择 考察了柱温25 30 35 40 45℃对色谱分离的影响,结果显示,柱温为35℃时出峰时间适中,各待测成分色谱峰分离较好,且峰形良好,所以选择35℃为本试验的柱温。

4 结论

本试验采用RP-HPLC法同时测定咽炎片中哈巴俄苷、肉桂酸、丹皮酚、芸香苷、黄芩苷的含量,用以表征全方制剂的质量。由实验结果表明,各厂家咽炎片中有效成分的含量相差较大,可能是由于制剂工艺与药材来源不统一造成的。因此,提高中药制剂的质量就有必要统一中药材的来源和规范制剂工艺。

参考文献

- 1 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health P.R. China Vol 2(卫生部药品标准第二册). 1990. 161
- 2 JIANG Shou-gang(姜守刚), JIANG Jian-qin(蒋建勤), ZU Yuan-gang(祖元刚), *et al* Chemical components from the root of *Scrophularia ningpoensis*(玄参的化学成分研究). *Bull Bot Res*(植物研究), 2008 28(2): 254
- 3 LIU Ke-yue(刘可越), ZHANG Tie-jun(张铁军), GAO Wen-yuan(高文远), *et al* Phytochemical and pharmacological research progress in *Flos farfarae*(款冬花的化学成分及药理活性研究进展). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 22(31): 1837
- 4 YIN Wen-guang(殷文光), LIM an-ling(李曼玲), KANG Chen(康琛). Advances in the studies of *Oroxylum indicum*(木蝴蝶的研究进展). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007 32(19): 1965
- 5 LI Ya-rong(李亚荣), ZHAO Ming-hui(赵明会). Determination of hapagoside content in Yanyan tablets by HPLC(高效液相色谱法测定咽炎片中哈巴俄苷的含量). *Chin J Inf Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2007, 5(10): 18
- 6 SUN Ye-cheng(孙业成), FU Ling-yan(付凌燕), CHENG Xiao-ying(程晓英), *et al* Determination the content of paeonol in Yanyan tablets by HPLC(高效液相色谱法测定咽炎片中丹皮酚的含量). *China Pharm*(中国药师), 2007 10(10): 999
- 7 WU Hong-yan(吴宏岩), SUN Gui-mei(孙桂梅), HU Bo(胡波), *et al* HPLC determination of baicalin in Yanyan tablets(高效液相法测定咽炎片中黄芩苷的含量). *China Pharm*(中国药业), 2006 15(17): 36
- 8 CAI Shao-qing(蔡少青), XIE Li-hua(谢丽华), WANG Jian-hua(王建华), *et al* HPLC determination of hapagoside and cinnamic acid in *Radix Scrophulariae*(中药玄参中哈巴俄苷与肉桂酸的高效液相色谱法测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2000 20(3): 191

(本文于2009年6月18日修改回)