

HPLC法测定内消瘰疬丸中哈巴俄苷的含量

许勇, 苗水, 诸艳蓉, 张威, 王柯, 季申*

(上海市食品药品监督管理局, 上海 201203)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法测定内消瘰疬丸中哈巴俄苷的含量。方法: 样品经 80% 甲醇溶液浸泡、超声处理, 采用色谱柱 Thermo ODS-HYPERSIL(0.46×20 cm, 5 μm); 柱温: 30℃; 流动相: 乙腈-水 (25:75); 检测波长 280 nm。结果: 哈巴俄苷在 15.18 ng~4743.75 ng 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$, $n=6$)。哈巴俄苷的平均加样回收率 ($n=9$) 为 93.5%。结论: 该方法灵敏度高、专属性好、操作简便、重现性好。

[关键词] 高效液相色谱法; 哈巴俄苷; 内消瘰疬丸

[中图分类号] O657.7+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)06-1367-02

HPLC determination of Harpagoside in Neixiao Luoli Pill

XU Yong, MIAO Shui, ZHU Yan-rong, ZHANG Wei, WANG Ke, JI Shen*

(Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective** To develop an HPLC method for the determination of Harpagoside in Neixiao Luoli Pill. **Methods** The column was Thermo ODS-HYPERSIL (0.46×20 cm, 5 μm), The mobile phase consisted of acetonitrile-water (25:75). The determination wavelength was set at 280nm. **Results** Linear ranges was 15.18 ng~4743.75 ng for Harpagoside. The average recovery of Harpagoside was 93.5% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate, specific and reproducible in the quality control of Neixiao Luoli Pill.

[Key words] HPLC; Harpagoside; Neixiao Luoli Pill

内消瘰疬丸是由夏枯草、玄参、大青盐等十七味药材组成的丸剂, 临床上主要用于瘰疬痰核或肿或痛等症状。玄参为玄参科植物玄参 (*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.) 的干燥根, 为常用中药, 具有清热凉血、滋阴降火之功效, 用于热病伤阴、津伤便秘、目赤、咽痛等^[1]。哈巴俄苷是玄参中含量较高的指标性成分, 有抗炎、镇痛、解痉以及耐缺氧、抗心律不齐, 正性肌力等作用。玄参中哈巴俄苷的含量测定方法已有文献报道^[2-4]。但复方制剂内消瘰疬丸中哈巴俄苷的含量测定方法未见报道。为控制药品质量, 保证临床用药的安全性和有效性, 我们建立了 HPLC 法测定内消瘰疬丸中哈巴俄苷含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 紫外-可见光检测器, Agilent 1100 色谱工作站; 哈巴俄苷对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号 111730-200603); 乙腈为色谱纯 (MERCK 公司), 其余试剂均为分析纯 (中国医药 (集团) 上海化学试剂公司); 样品: 内消瘰疬丸分别由吉林紫鑫药业股份有限公司 (批号 100801, 100802, 100803)、杭州胡庆余堂药业有限公司 (批号: 100502)、及上海雷允上封浜制药有限公司 (批号 100205, 100706, 100707) 提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取哈巴俄苷对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇溶液制成每 1 ml 含哈巴俄苷为 15 μg 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取本品粉末 (过三号筛) 约 5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇溶液 25 ml 称定重量, 浸泡 0.5 h 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min 放冷, 再称定重量, 分别用相应溶剂补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方量分别制备缺玄参的阴性样品, 照“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

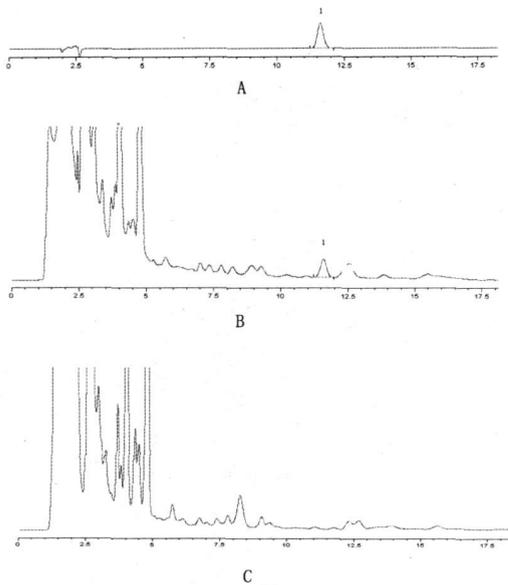
色谱柱: Thermo ODS-HYPERSIL (0.46×20 cm, 5 μm); 柱温: 30℃; 流动相: 乙腈-水 (25:75)。理论板数按哈巴俄苷峰计算, 不低于 9000。按上述色谱条件进行测定, 结果样品中哈巴俄苷与相邻峰分离度大于 1.8。阴性样品溶液在与哈巴俄苷色谱峰相同位置处无干扰峰, 表明样品中其他成分对哈巴俄苷的测定无干扰, 见图 1。

2.3 线性关系的考察

精密称取哈巴俄苷对照品适量, 加 80% 甲醇溶液制成浓度为 15.18 μg/ml 的对照品溶液 ①; 和浓度为 189.75 μg/ml 的对照品溶液 ②。分别精密吸取对照品溶液 ① 1 μl, 5 μl, 10 μl, 20 μl; 对照品溶液 ② 5 μl, 25 μl 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以进样量 (ng) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行回归分析, 得哈巴俄苷的回归方程为: $Y = 2.48197X + 1.48289$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 哈巴俄苷在 15.18 ng~4743.75 ng 范围内线性关系良好。

【作者简介】 许勇 (1976-), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中药质量标准研究。

* 通讯联系人, E-mail: jishen@sohu.com.cn



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性样品; 1. 哈巴俄苷 (11.612 min)

图 1 高效液相色谱图

2.4 精密度试验

精密吸取上述对照品溶液 (哈巴俄苷浓度为 $15.18 \mu\text{g}/\text{mL}$) $20 \mu\text{L}$ 连续进样 6 次, 记录峰面积, 哈巴俄苷峰面积的 RSD 为 0.02% , 结果表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 哈巴俄苷含量平均值为 $60.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.62% 。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别于 0 h、6 h、10 h、16 h、24 h 进样测定, 结果哈巴俄苷峰面积的 RSD 为 1.51% , 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 加样回收率试验

取本品 (吉林紫鑫药业股份有限公司提供, 批号: 100803) 粉末 (过三号筛) 约 5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 一式 9 份, 以 3 份为一组, 分别精密加入哈巴俄苷对照品溶液 (哈巴俄苷浓度为 $0.18975 \text{mg}/\text{mL}$) 0.8mL 、 1.0mL 、 1.2mL 精密加入 80% 甲醇溶液 25mL 按“2.1.2”项下方法制备 9 份供试品溶液分别注入 GC 仪, 测定, 结果见表 1。

表 1 哈巴俄苷回收率试验 ($n=9$)

样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.151966	0.2277	0.36805	94.898		
0.151064	0.2277	0.36153	92.431		
0.154490	0.2277	0.37029	94.773		
0.147621	0.1898	0.31897	90.302		
0.150932	0.1898	0.32845	93.553	93.5%	1.5
0.150596	0.1898	0.32729	93.119		
0.150331	0.1518	0.29279	93.846		
0.151287	0.1518	0.29347	93.664		
0.151623	0.1518	0.29504	94.477		

2.8 样品测定

按上述供试品溶液的制备方法和测定条件, 测定 7 批样品中哈巴俄苷的含量, 用外标法计算, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

批号	100801	100802	100803	100502	100205	100706	100706
哈巴俄苷 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	60.81	60.33	60.10	220.9	294.8	280.6	310.7

3 讨论

3.1 测定指标的选择

《中国药典》2010 年版一部“玄参”项下含量测定方法, 是以哈巴苷和哈巴俄苷为测定指标, 对玄参进行含量测定。经试验, 内消瘰疬丸中哈巴苷含量较低, 又因内消瘰疬丸为十七味药组成的复方制剂, 成分复杂, 且哈巴苷的最大吸收波长为 210nm 的末端吸收, 干扰较多, 因此很难对哈巴苷进行分离测定, 故最后以哈巴俄苷为测定指标, 对玄参进行含量测定。

3.2 溶剂的选择

采用甲醇、 80% 甲醇溶液、 50% 甲醇溶液三种不同溶剂对样品进行超声提取, 结果发现, 80% 甲醇溶液对本品的溶解性最好, 能有效的将丸剂中的哈巴俄苷提取出来。因此最终选择提取溶剂为 80% 甲醇溶液。

3.3 提取时间的选择

为了能有效的将样品中的哈巴俄苷提取出来, 试验中考察了浸泡与非浸泡, 以及超声处理时间对哈巴俄苷提取效率的影响。选择了 15min 、 30min 、 60min 三个超声处理时间对样品进行提取, 结果表明, 超声处理 30min 提取效率较高。考察了浸泡与非浸泡对试验结果的影响, 结果表明, 样品经过浸泡后, 哈巴俄苷可以很好的溶出, 使提取效率更高。故对浸泡时间进行了考察, 结果表明, 浸泡 0.5h 适宜, 所以本试验最终确定提取方式为浸泡 0.5h 后, 超声处理 30min 。

4 总结

目前玄参的质量控制指标, 仅限于哈巴苷和哈巴俄苷等化合物, 这样还无法对玄参药材或者含玄参的制剂达到真正有效的质量控制, 所以, 有待进一步研究发现, 玄参中新的具有生物活性的药效指标, 对其进行合理的质量控制。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 108
- [2] 张发科, 吕青涛, 张兆旺, 等. HPLC 法研究不同炮制工艺对玄参中哈巴俄苷和肉桂酸含量的影响 [J]. 化学分析计量, 2006, 15 (6): 51
- [3] 张洪霞, 宋金玉, 赵荣淑, 等. RP-HPLC 法同时测定玄参中肉桂酸、哈巴酯苷的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23 (8): 507.
- [4] 王震, 王岳钧, 袁淑斐, 等. RP-HPLC 法测定增液颗粒中哈巴俄苷的含量 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41 (4): 72
- [5] 吴寿荣, 程刚, 冯岩. 冰片药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32 (12): 1143.

(收稿日期: 2011-03-09)