

## 高效液相色谱法测定支扩养阴颗粒中蒙花苷的含量

吴文飞, 张利斌, 李玉平 (同济大学附属上海市肺科医院药剂科, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 建立 HPLC 测定支扩养阴颗粒中蒙花苷的含量方法。方法 色谱柱为 DIKMA Platisil ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-醋酸(55 : 44 : 2), 流速 1.0 ml/min, 进样量 20 μl, 检测波长 326 nm。结果 蒙花苷在 2.95 ~ 98.3 μg/ml 内线性良好,  $r = 0.999 9$  ( $n = 5$ ), 平均回收率 100.2%,  $RSD$  为 0.96% ( $n = 15$ )。结论 该法操作简便、灵敏、可靠, 可用于支扩养阴颗粒中蒙花苷的含量测定。

**[关键词]** 蒙花苷; 小蓟; 支扩养阴颗粒; 含量测定; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)04-0307-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.04.019

## Determination of buddleoside in Zhikuoyangyin granules by HPLC

WU Wen-fei, ZHANG Li-bin, LI Yu-pin (Department of Pharmacy, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a high performance liquid chromatography method for the determination of buddleoside in Zhikuoyangyin granules. **Methods** The HPLC method was performed on a DIKMA Platisil ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of methanol-water-acetic acid (55 : 44 : 2). The flow rate was 1.0 ml/min. The sample injection volume was 20 μl. The detective wavelength was 326 nm. **Results** The calibration curve of buddleoside showed good linear response ranged from 2.95 to 98.3 μg/ml with  $r = 0.999 9$  ( $n = 5$ ). The average recovery of spiked samples for buddleoside was 100.2% while the relative standard deviation for repetitions was 0.96% ( $n = 15$ ). **Conclusion** The method was simple, sensitive, reliable and repeatable, and could be used for the quantitative determination of buddleoside in Zhikuoyangyin granules.

**[Key words]** buddleoside; Cirsii herba; Zhikuoyangyin granules; content determination; HPLC

支扩养阴颗粒系本院传统中药制剂, 批准文号为沪药制字 Z04180751, 由羊乳根、小蓟、桑白皮、侧柏叶、麦冬等十一味药材提取配制而成, 具有消炎、化痰、止血的功效, 能有效治疗支气管扩张和感染所引起的咳嗽、痰多、咯血。本品在肺科医院治疗呼吸道疾病方面起着了重要作用, 其生产和使用数量逐年递增。本制剂活性成分中含有黄酮, 对此, 经实验研究发现, 可以用高效液相色谱法测定出所含抗炎抗菌成分蒙花苷。本法可作为制剂质量监控项目之一。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 美国 HP 1100 型高效液相色谱仪, 包括手动进样器, 单元泵, 紫外检测器; N2000 色谱工作站 (浙江大学); 色谱柱为 DIKMA Platisil ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); BS 210S 电子天平 (德国赛多利斯)。

**1.2 试剂** 蒙花苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 111528-200606); 羊乳根、小蓟等药材

(安徽德昌药业饮片有限公司); 支扩养阴颗粒 (委托上海练塘药业有限公司配制), 甲醇为色谱纯; 其余试剂为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件与系统适用性** 色谱柱: DIKMA platisil ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 定量环: 20 μl; 流动相: 甲醇-水-冰醋酸 (55 : 44 : 2); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 326 nm; 柱温: 室温。理论板数按蒙花苷峰计算应不低于 1 500<sup>[1]</sup>。

#### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取蒙花苷对照品 10.0 mg, 置 100 ml 量瓶中, 用甲醇溶解, 并稀释定容, 按含量以 98.3% 计, 得 98.3 μg/ml 的蒙花苷对照品贮备液, 密封, 2 ~ 8 °C 冰箱贮存。

**2.2.2 供试品溶液** 精密称取支扩养阴颗粒 10 g, 置索氏提取器中, 用石油醚 (60 ~ 90 °C) 100 ml 回流 2 h, 弃去醚液, 残留物置 40 °C 恒温箱中过夜以挥干, 再置索氏提取器中用甲醇 100 ml 回流提取 4 h, 放冷, 提取液过滤, 置 100 ml 量瓶中, 用少量甲醇荡洗烧瓶壁数

次,洗液滤至上述量瓶中,定容,即得供试品原液。

**2.2.3 阴性对照液** 按处方制备不含小蓟药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照液原液。

**2.3 方法专属性试验** 精密量取供试品原液、阴性

对照原液各 3 ml,对照品贮备液 2 ml,分别置 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释定容,旋匀,临用时,用 0.45  $\mu\text{m}$  孔径针头滤器过滤,按“2.1”项下的色谱条件进样测定,结果见图 1。

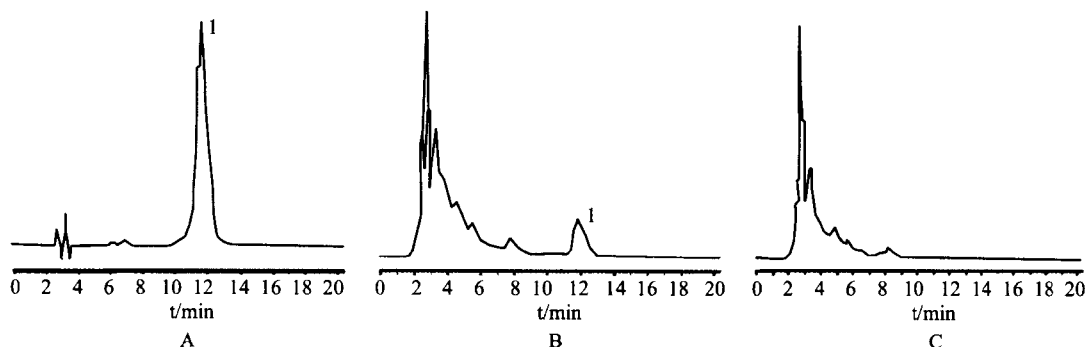


图 1 高效液相色谱图

A-对照品;B-供试品;C-阴性对照品;1-蒙花苷

**2.4 线性关系考察** 精密量取对照品贮备液 0.30、0.60、1.00、1.50、2.00、3.00、5.00 和 10.0 ml,分别置 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,旋匀,按“2.1”项下色谱条件,测定峰面积,以蒙花苷溶液的浓度  $C(\mu\text{g}/\text{ml})$  为横坐标,峰面积值  $A$  为纵坐标,进行线性回归,得回归方程  $A = 4.331 \times 10^4 C - 2.949 \times 10^3$  ( $n = 5, r = 0.9999$ )。结果表明,蒙花苷在 2.95 ~ 98.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内线性关系良好,且理论板数符合规定。

**2.5 精密度试验** 取蒙花苷对照品溶液(29.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),按“2.1”项下色谱条件测定 6 次,结果峰面积的 RSD 为 0.67%,说明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 称取同一批号的支扩养阴颗粒 6 份,按“2.2.2”项下的方法制备供试品原液,分别精密量取 3.0 ml,置 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释定容,用 0.45  $\mu\text{m}$  孔径针头滤器过滤,按“2.1”项下的条件进样测定,代入“2.4”项下的回归方程计算样品含量,结果测得样品平均含量为 0.195  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , RSD 为 1.10%。可见方法的重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,在凉处放置,与 0.4、24、48、96 h 依法测定,结果测得峰面积的 RSD 为 1.01%。表明供试液在 4 日内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 精密量取已知蒙花苷含量为 0.195  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,制剂批号为 20101201 的支扩养阴颗粒供试品溶液(100.855  $\text{mg}/\text{ml}$ )2.00 ml 15 份,置于 10 ml 量瓶中,分成 3 组,每组重复 5 份,分别精密加入 39.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  蒙花苷对照液 0.60、1.00、1.36 ml,加甲醇稀释定容,旋匀,按“2.1”项下的色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 支扩养阴颗粒加样回收率试验结果 ( $n = 15$ )

样品量 ( $\mu\text{g}$ )	对照品加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
39.3	23.6	62.9	100.1		
39.3	23.6	62.5	98.4		
39.3	23.6	63.1	100.8		
39.3	23.6	62.7	99.1		
39.3	23.6	62.8	99.9		
39.3	39.3	78.9	100.7		
39.3	39.3	78.8	100.4		
39.3	39.3	78.2	98.9	100.2	0.96
39.3	39.3	79.0	101.1		
39.3	39.3	78.7	100.3		
39.3	53.4	92.4	99.4		
39.3	53.4	93.3	101.1		
39.3	53.4	93.6	101.6		
39.3	53.4	93.5	101.3		
39.3	53.4	92.5	99.6		

**2.9 样品含量测定** 取不同批号的供试品 5 批,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,作适当稀释,过滤后进样,按“2.1”项下的色谱条件测定,按外标峰面积法和“2.4”项下的回归方程计算蒙花苷的含量,结果见表 2。

表 2 支扩养阴颗粒含量测定结果 ( $n = 5$ )

批号	含量 ( $\text{mg}/\text{g}$ )	RSD (%)
20061101	0.181	0.99
20080303	0.188	0.68
20090907	0.201	0.96
20101201	0.195	0.73
20110604	0.158	0.63

### 3 讨论

**3.1 检测成分考察** 支扩养阴颗粒含小蓟、麦冬和侧柏叶等药材,这些成分中有丰富的黄酮类属物成分,笔者曾经检测出二氢黄酮类<sup>[1]</sup>;有报道可检测小蓟中芦丁<sup>[4]</sup>,含小蓟的制剂文献报道也以芦丁为测定指标<sup>[3]</sup>,而在笔者的实验研究中,用紫外光谱法和 HPLC 法均未测出。不同批次支扩养阴颗粒中蒙花苷含量比较接近,说明小蓟中富含的黄酮是蒙花苷,且含量比较稳定,可以将蒙花苷作为本制剂质量控制定量指标之一。中国药典一部 2010 年版与 2005 版比较,在薄层色谱鉴别中将芦丁<sup>[4]</sup>修订为蒙花苷<sup>[4]</sup>,含量测定项增订高效液相色谱法测定蒙花苷<sup>[4]</sup>,笔者研究验证了这次增修订是正确、可行的。

**3.2 提取溶剂与提取方法选择** 曾经采用石油醚(60~90℃)脱脂或不脱脂,以甲醇或 65% 乙醇为提取溶剂,索氏提取器回流或超声提取,分别考察所制取的供试品溶液的色谱结果,实验表明经石油醚回流脱脂,甲醇回流提取,所得供试品溶液与流动相有良好的互溶性,色谱杂峰少,且提取最完全。

**3.3 流动相选择** 考察了甲醇-水-冰醋酸(55:45:0.3),(45:54.5:0.5)<sup>[4]</sup>,(52:46:2)<sup>[4]</sup>和(55:44:2)等数组溶剂系统,结果前 3 组蒙花苷

色谱峰峰形欠佳,测定中有理论板数较低,经多次试验,以甲醇-水-冰醋酸(55:44:2)为流动相,不仅峰保留时间适宜、分离度好,而且理论板数最高,峰形相对最好。

**3.3 检测波长选择** 比较了蒙花苷 HPLC 检测波长 326 nm<sup>[4]</sup>和 334 nm<sup>[4,5]</sup>处测得的峰面积,结果以 326 nm 为检测波长峰面积大,故选择测定波长为 326 nm。

### 【参考文献】

- [1] 吴文飞,李玉平. 紫外分光光度法测定支扩养阴颗粒中二氢黄酮的含量[J]. 中国药房,2011,22(43):4083.
- [2] 崔敬浩,杨星昊,丁安伟,等. 小蓟、小蓟炭中黄酮类成分的含量测定和薄层鉴别[J]. 四川中医,2006,24(3):32.
- [3] 祝德秋,罗启剑,崔 岚,等. 连钱草-小蓟混合粉中总黄酮的含量测定[J]. 华西药学杂志,2003,18(6):477.
- [4] 中国药典 2005 版. 一部[S]. 2005:32,45,308,295.
- [5] 柯 睿,朱恩圆,俞桂新. 小蓟的质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(7):1662.

[收稿日期]2011-12-03

[修回日期]2011-12-31

(上接第 290 页)

表 1 样品含量测定结果及转移率(n=3)

批号	黄芩药材(mg/g)	中间品(mg/g)/转移率(%)	成品(mg/g)/转移率(%)
110919	124.5	21.44/17.2	16.87/78.7
110926	124.5	23.65/19.0	18.74/79.2
111010	124.5	22.38/18.0	17.77/79.4

转移率(%) = 黄芩苷实测含量/溶液理论含量 × 100%

### 3 讨论

**3.1 采用 HPLC 法测定黄芩苷含量的报道较多**,以甲醇-水-磷酸的流动相体系较为多见<sup>[3-5]</sup>。经本研究比较发现,采用甲醇-水-冰醋酸作为流动相体系,可以降低磷酸引起的基线波动,较好完成黄芩药材、扁咽口服液中间品和成品中黄芩苷的检测。另外,通过比较 2%、1% 和 0.5% 等不同浓度冰醋酸对分离的影响,发现 0.5% 冰醋酸即能取得满意的分离效果。

**3.2 中药制剂在生产中按照既定的工艺进行制备**,药材中成分的转移率一般较为固定。从测定结果可以看出,黄芩苷在黄芩药材制成中间品的过程中转移率为 17.2%~19.0%,从中间品到成品过程中,由于添加了壳聚糖进行澄清处理,造成黄芩苷的进

一步损失,但其转移率也能够达到 78.7%~79.4%。由此可以判定,尽管黄芩苷的转移率较低,但其波动范围不大,说明扁咽口服液的生产工艺是稳定适用的。

**3.3 尽管黄芩苷在扁咽口服液的生产过程中转移率较为稳定**,但从药效成分的角度评价则相对偏低。因此,根据黄芩苷的化学性质,可以采用其他适宜的提取溶剂,提高黄芩苷的转移率和含量,可以考虑将扁咽口服液开发成药效更好、用量更小、使用更方便的颗粒剂的新剂型。

### 【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 年版. 一部[S]. 2010: 283.
- [2] 雷 芳. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2010, 19(15): 87.
- [3] 李玲玲,赵兰芬. 清开灵不同制剂中黄芩苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 950.
- [4] 宋宗华,王 鹏,陈晓辉,等. 中药黄芩和一清颗粒中黄芩苷 HPLC 定量分析方法学验证参数限度考察[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1140.
- [5] 张 捷,谭生建,王 欢,等. 高效液相色谱法测定小儿润肺止咳口服液中橙皮苷和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1451.

[收稿日期]2012-01-03

[修回日期]2012-04-05