

RP-HPLC法同时测定消炎利胆片中咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的含量

张小梅*(湖北省中西医结合医院药学部,武汉 430015)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2582-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.45

摘要 目的:建立同时测定消炎利胆片中咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为334 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的检测进样量线性范围分别为0.10~2.81、0.20~5.63、0.10~2.63 μg($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为96.3%~100.4%(RSD=1.59%, $n=9$)、97.3%~101.2%(RSD=1.28%, $n=9$)、96.6%~100.6%(RSD=1.39%, $n=9$)。结论:该方法简单灵敏、准确可靠、重复性好,可用于同时测定消炎利胆片中咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的含量。

关键词 反相高效液相色谱法;消炎利胆片;咖啡酸;异夏佛塔苷;夏佛塔苷;含量测定

Simultaneous Determination of Caffeic Acid, Isoschaftoside and Schaftoside in Xiaoyan Lidan Tablet by RP-HPLC

ZHANG Xiaomei(Dept. of Pharmacy, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Hubei Province, Wuhan 430015, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of caffeic acid, isoschaftoside and schaftoside in Xiaoyan lidan tablet. METHODS: RP-HPLC was performed on the column of Phenomenex C₁₈ with mobile phase of methanol - 0.1% phosphate acid (gradient elution) at flow rate of 0.8 ml/min, the detection wavelength was 334 nm, column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.10-2.81 μg for caffeic acid($r=0.999\ 9$), 0.20-5.63 μg for isoschaftoside ($r=0.999\ 9$) and 0.10-2.63 μg for schaftoside($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recoveries were 96.3%-100.4%(RSD=1.59%, $n=9$), 97.3%-101.2% (RSD=1.28%, $n=9$) and 96.6%-100.6%(RSD=1.39%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate, reliable and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of caffeic acid, isoschaftoside and schaftoside in Xiaoyan lidan tablet the quality control of Xiaoyan lidan tablet.

KEYWORDS RP-HPLC; Xiaoyan lidan tablet; Caffeic acid; Isoschaftoside; Schaftoside; Content determination

优化是整个色谱条件摸索过程中的难点,需要从不同的角度进行筛选。笔者分别考察了有机相种类、缓冲盐种类、缓冲盐浓度、流动相比比例等。在考察缓冲盐浓度时,笔者分别考察了2、5、8 mmol/L 乙酸铵水溶液为缓冲盐溶液,随着缓冲盐浓度的增加,主峰的峰面积也随着增加,同时峰形也会发生变化,最终确定5 mmol/L 为最佳缓冲盐溶液浓度。

综上所述,本方法操作简便,稳定性和重复性好,可用于印度獐牙菜中5种吡啶类化合物含量的同时测定。

参考文献

[1] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草:藏药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2002:145.
[2] Shi GF. Isolation and crystal structure of xanthone from Swertia chirayita[J]. *Chin J Struct Chem*, 2004, 23(10): 1164.

[3] 史高峰,杨军英,鲁润华,等.1,5,8-三羟基-3-甲基吡啶对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J].*中国药理学通报*,2005,21(2):206.
[4] 靳有才,魏立新,林蓉香,等.印度獐牙菜化学成分和药理作用研究进展[J].*中国生物化学杂志*,2010,31(6):431.
[5] 周永福,黄琼俭,吴明珠.吡啶类化合物在獐牙菜属植物中的研究进展[J].*广州化工*,2014,42(11):9.
[6] 茅晓寅,张梦琪,周沁逸,等.液相色谱-串联质谱法测定晚期实体瘤患者静脉滴注紫杉醇胶束后的药理学[J].*中国新药与临床杂志*,2015,34(11):869.
[7] 李红军,王增绘,李文涛,等.UPLC-Q-TOF/MS法分析款冬花蜜炙前后的化学成分变化[J].*中国药房*,2015,26(6):792.

(收稿日期:2016-01-10 修回日期:2016-03-18)

(编辑:张静)

* 主管药师。研究方向:中药质量。电话:027-65600839。
E-mail:journalarticle@sohu.com

消炎利胆片由穿心莲、溪黄草和苦木等3味中药材按1:1:1的比例制成,具有清热、祛湿、利胆的功效,适用于肝胆湿热所致的肋痛、口苦、急性胆囊炎、胆管炎等^[1]。《中国药典》2015年版(一部)质量标准中,对消炎利胆片采用薄层色谱分别对穿心莲、溪黄草、苦木进行定性鉴别;含量测定项只对穿心莲中的穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯做了含量测定,未对溪黄草中的黄酮类和苦木中的生物碱类成分进行含量测定。溪黄草的化学成分主要包括二萜类、三萜类、黄酮类、酚酸类^[2-3],其中异夏佛塔苷、夏佛塔苷等黄酮类成分具有保胆、抗炎作用,咖啡酸具有抗肿瘤、抗炎作用;且咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷均是溪黄草药材的主要活性成分^[4],也是对溪黄草及其制剂进行质量控制的主要成分。虽已有高效液相色谱(HPLC)法测定消炎利胆片中穿心莲内酯类和苦木生物碱类成分含量的报道^[5],但尚未有测定消炎利胆片中溪黄草水溶性黄酮类和酚酸类成分含量的报道。因此,本研究采用HPLC法同时测定消炎利胆片中咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的含量,以为完善现行的消炎利胆片质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括Chemstation工作站、1315D型检测器(美国Agilent公司);BP110s型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);HK-5096型超声波清洗器(苏州欧亚超声波设备有限公司,功率:360 W,频率:250 kHz)。

1.2 药品与试剂

消炎利胆片(广州白云山和记黄埔中药有限公司,批号:A4A007、A4A010、A4A201、E4A009、E4A020,规格:薄膜衣片,0.25 g/片;广东万年青制药有限公司,批号:141006、141123、150412、150508、150822,规格:糖衣片,0.25 g/片);咖啡酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110885-200102,纯度≥98.0%);异夏佛塔苷对照品(自制,纯度>98%)、夏佛塔苷对照品(自制,纯度>98%)均由广州中医药大学新药开发研究中心提供;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);检测波长:334 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %	流速, ml/min
0	25	75	0.8
25	32	68	0.8
40	32	68	0.8
45	25	75	0.8

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取咖啡酸对照品、异夏佛塔苷对照品、夏佛塔苷对照品各适量,加50%乙醇制成每1 ml溶液中含咖啡酸11.25 μg、异夏佛塔苷22.50 μg、夏佛塔苷10.50 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品10片,去除包衣,研细,取细粉约0.5 g,精密称定,置于50 ml具塞锥形瓶中,加50%乙醇20 ml,超声处理30 min,提取2次,滤过,合并滤液定容至50 ml,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按消炎利胆片处方比例和工艺制备缺溪黄草的阴性样品,再按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

分别精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可见,咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷均可达到基线分离,分离度均>1.5,理论板数均>10 000。结果表明,其他成分对测定无干扰。

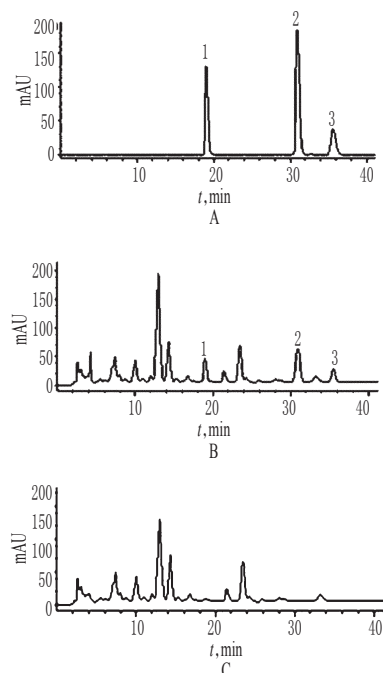


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.咖啡酸;2.异夏佛塔苷;3.夏佛塔苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference; B. test samples; C. negative control; 1. caffeic acid; 2. isoschaftoside; 3. schaftoside

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、5、10、15、20、25 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围(n=3)

Tab 2 Regression equation and linear ranges (n=3)

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
咖啡酸	y=1 926x+1.52	0.999 9	0.10~2.81
异夏佛塔苷	y=686.89x+12.68	0.999 9	0.20~5.63
夏佛塔苷	y=566.55x-3.33	0.999 9	0.10~2.63

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷峰面积的RSD分别为1.7%、0.85%、0.56%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:A4A010)适量,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷峰面积的RSD分别

为1.45%、1.54%、2.01% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

分别称取同一批样品(批号:A4A010)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的平均含量分别为0.072 5、0.220 0、0.145 0 mg/片,RSD分别为1.52%、0.57%、1.73% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:A4A010)9份,每份0.25 g,精密称定,分别精密加入一定量的咖啡酸对照品、异夏佛塔苷对照品、夏佛塔苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 3 Results of recovery tests ($n=9$)

待测成分	称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
咖啡酸	0.250 2	72.56	72.0	141.95	96.4	98.1	1.59
	0.251 5	72.94	72.0	142.24	96.3		
	0.252 2	73.14	72.0	143.24	97.4		
	0.253 1	73.40	81.0	153.00	98.3		
	0.252 1	73.11	81.0	151.55	96.8		
	0.250 9	72.76	81.0	152.23	98.1		
	0.250 2	72.56	90.0	162.92	100.4		
	0.251 6	72.96	90.0	163.04	100.1		
	0.250 1	72.53	90.0	162.02	99.4		
	异夏佛塔苷	0.250 2	220.18	234.0	455.06		
0.251 5		221.32	234.0	458.20	101.2		
0.252 2		221.94	234.0	449.72	97.3		
0.253 1		222.73	243.0	464.39	99.1		
0.252 1		221.85	243.0	465.96	100.5		
0.250 9		220.79	243.0	461.58	99.1		
0.250 2		220.18	252.0	468.21	98.4		
0.251 6		221.41	252.0	468.76	98.2		
0.250 1		220.09	252.0	472.53	100.2		
夏佛塔苷		0.250 2	145.12	147.0	289.94	98.5	98.3
	0.251 5	145.87	147.0	287.91	96.6		
	0.252 2	146.28	147.0	288.60	96.8		
	0.253 1	146.80	151.2	293.45	97.0		
	0.252 1	146.22	151.2	295.08	98.5		
	0.250 9	145.52	151.2	293.37	97.8		
	0.250 2	145.12	155.4	298.48	98.7		
	0.251 6	145.93	155.4	301.18	99.9		
	0.250 1	145.06	155.4	301.33	100.6		

2.9 样品含量测定

取10批消炎利胆片样品粉末各3份,每份0.5 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$, mg/片)

Tab 4 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/tablet)

规格	批号	咖啡酸	异夏佛塔苷	夏佛塔苷
薄膜衣片	A4A007	0.081 3	0.230 1	0.146 6
	A4A010	0.072 5	0.220 0	0.145 0
	A4A201	0.102 6	0.185 9	0.018 8
	E4A009	0.092 4	0.250 1	0.132 2
	E4A020	0.105 5	0.243 3	0.145 3
糖衣片	141006	0.022 3	0.201 6	0.085 6
	141123	0.081 2	0.032 5	0.092 7
	150412	0.102 4	0.152 2	0.088 2
	150508	0.102 9	0.228 4	0.162 8
	150822	0.241 4	0.283 1	0.105 0

3 讨论

溪黄草是组成消炎利胆片的3味中药材之一,水溶性酚酸类和黄酮类成分是溪黄草药材中的特征性成分,也是其活性成分。笔者对10批不同来源、不同规格的样品进行含量分析,结果表明各样品均可检出咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷。10批消炎利胆片中咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的含量范围分别为0.022 3~0.241 4、0.032 5~0.283 1、0.018 8~0.162 8 mg/片。薄膜衣片中咖啡酸的平均含量比糖衣片中咖啡酸的平均含量低,而糖衣片中异夏佛塔苷和夏佛塔苷的平均含量均低于薄膜衣片,这表明不同生产厂家生产的消炎利胆片质量不统一,其原因可能与各生产厂家的溪黄草原料来源及药用部位、生产制备工艺等有关,因此有必要对消炎利胆片中溪黄草的咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷进行质量控制。

综上所述,本方法简单灵敏、准确可靠,重复性好,可用于同时测定消炎利胆片中咖啡酸、异夏佛塔苷、夏佛塔苷的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1 416.
- [2] 唐海明,陈建南,徐香琴.狭基线纹香茶菜水溶性成分及其抗肿瘤活性研究[J].中草药,2014,45(22):3 219.
- [3] 郑琴,崔炯谟,傅宏征.溪黄草的化学成分研究[J].中国中药杂志,2011,36(16):2 203.
- [4] 张扬,唐海明,黎爱,等.狭基线纹香茶菜水溶性总黄酮中6种碳苷黄酮的含量测定和抗肿瘤活性研究[J].中国中药杂志,2015,40(8):1 543.
- [5] 林青,匡艳辉,黄琳,等.一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分[J].中草药,2012,43(12):2 406.

(收稿日期:2015-08-10 修回日期:2015-10-24)

(编辑:刘 柳)

《中国药房》杂志——中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)收录期刊,欢迎投稿、订阅