

HPLC法同时测定桑菊感冒颗粒中5种有效成分的含量^Δ

崔佰吉*,张宏梅,朱鹤云,冯波[#](吉林医药学院药学院,吉林 吉林 132013)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)12-1609-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.12.06

摘要 目的:建立同时测定桑菊感冒颗粒中绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Wondasil™-C₁₈,流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,柱温为30℃,检测波长为254 nm,进样量为5 μL。结果:绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸的检测进样量线性范围分别为0.014~0.560 μg($r=0.999\ 2$)、0.022~0.880 μg($r=0.999\ 6$)、0.010~0.400 μg($r=0.999\ 9$)、0.016~0.640 μg($r=0.999\ 9$)、0.011~0.440 μg($r=0.999\ 1$);定量限分别为0.752、0.647、0.483、0.372、0.242 mg/L,检测限分别为0.253、0.185、0.157、0.162、0.098 mg/L;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%;加样回收率分别为97.4%~100.9%(RSD=1.4%, $n=6$)、95.7%~99.0%(RSD=1.1%, $n=6$)、95.1%~98.1%(RSD=1.3%, $n=6$)、96.4%~99.8%(RSD=1.4%, $n=6$)、97.8%~100.4%(RSD=1.0%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于桑菊感冒颗粒中绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸含量的同时测定。

关键词 桑菊感冒颗粒;高效液相色谱法;绿原酸;芦丁;连翘苷;槲皮素;甘草酸;含量测定

Simultaneous Determination of 5 Effective Components in Sangju Ganmao Granules by HPLC

CUI Baiji, ZHANG Hongmei, ZHU Heyun, FENG Bo (School of Pharmacy, Jilin Medical College, Jilin Jilin 132013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of chlorogenic acid, rutin, phillyrin, quercetin and glycyrrhizic acid in Sangju ganmao granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Wondasil™-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and the detection wavelength was set at 254 nm. The sample size was 5 μL. RESULTS: The linear range of chlorogenic acid, rutin, phillyrin, quercetin and glycyrrhizic acid were 0.014-0.560 μg ($r=0.999\ 2$), 0.022-0.880 μg ($r=0.999\ 6$), 0.010-0.400 μg ($r=0.999\ 9$), 0.016-0.640 μg ($r=0.999\ 9$), 0.011-0.440 μg ($r=0.999\ 1$), respectively. The limits of quantitation were 0.752, 0.647, 0.483, 0.372, 0.242 mg/L; the limits of detection were 0.253, 0.185, 0.157, 0.162, 0.098 mg/L. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries were 97.4%-100.9% (RSD=1.4%, $n=6$), 95.7%-99.0% (RSD=1.1%, $n=6$), 95.1%-98.1% (RSD=1.3%, $n=6$), 96.4%-99.8% (RSD=1.4%, $n=6$), 97.8%-100.4% (RSD=1.0%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, phillyrin, quercetin and glycyrrhizic acid in Sangju ganmao granules.

KEYWORDS Sangju ganmao granules; HPLC; Chlorogenic acid; Rutin; Phillyrin; Quercetin; Glycyrrhizic acid; Content determination

桑菊感冒颗粒收载于《中药成方制剂》(第二册),执行标准为WS₃-B-0397-90^[1]。该方由菊花、桑叶、连翘、芦根、甘草、苦杏仁、薄荷、桔梗等8味中药材组成。方中菊花平肝火、疏散风热,可辅助治疗感冒、头痛等^[2],桑叶滋阴补血、清肺润燥、清热疏风、清肝明目^[3],二者合用具有清肺止咳、疏散上焦风热等功效^[4];连翘俗称“一串金”,有消肿散结、清热解毒、疏散风热的功效^[5-6];芦根可用于治疗热病烦渴、胃热呕吐、肺热咳嗽、肺痈吐脓、热淋涩痛等症^[7];甘草可用于治疗痈疽疮疡、咽喉肿痛、气

喘咳嗽、脾胃气虚等症^[8];苦杏仁有润肠通便、平喘镇咳、镇痛抗炎等功效^[9-10];薄荷为辛凉性发汗解热药,内服可用于治疗流行性感、咽喉肿痛、头疼、目赤、身热、牙床肿痛等症,外用可用于治疗神经痛、皮肤瘙痒、皮疹和湿疹等症^[11];桔梗具有宣肺排脓、镇咳祛痰、消炎等功效^[12]。

目前,该药的执行标准未对方中有效成分进行含量控制,同时2015年版《中国药典》(一部)^[13]中收载的桑菊感冒片仅对方中的连翘苷进行含量测定。鉴于此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了桑菊感冒颗粒中绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素、甘草酸的含量,以期为该药的质量评价和相关标准完善提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括LC20AT二元高压梯度

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81703683);吉林省中医药科技项目(No.2017105)

* 高级实验师,硕士。研究方向:中药新剂型与新技术。电话:0432-64561063。E-mail:8031538@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药新药研发。电话:0432-64560316。E-mail:fengbo2@sina.com

泵、SPDM20A 二极管阵列检测器、SIL20A 自动进样器、LC-Solution 色谱工作站(日本岛津公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

绿原酸对照品(批号:071229,纯度:98.3%)、芦丁对照品(批号:080526,纯度:99.5%)、连翘苷对照品(批号:090106,纯度:99.0%)均由上海融禾医药科技发展有限公司提供;槲皮素对照品(批号:100081-200907,纯度:98.9%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-201317,纯度:99.4%)均由中国食品药品检定研究院提供;桑菊感冒颗粒(吉林医药学院药物制剂研究室按标准 WS₃-B-0397-90 自制,批号:160401、160402、160403,规格:10 g/袋);糊精(天津市瑞金特化学品有限公司,批号:20100712);蔗糖(天津市瑞金特化学品有限公司,批号:20120510);乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:WondasilTM-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 0→83% B; 8~35 min, 83%→30% B);流速:0.8 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:254 nm;进样量:5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸铵对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加乙腈定容,摇匀,即得质量浓度分别为 0.635、0.326、0.310、0.317、0.639 mg/mL 的单一对照品贮备液。分别精密量取上述单一对照品贮备液各适量,置于同一 10 mL 量瓶中,加乙腈稀释并定容,摇匀,即得混合对照品溶液(含绿原酸 0.014 mg/mL、芦丁 0.022 mg/mL、连翘苷 0.010 mg/mL、槲皮素 0.016 mg/mL、甘草酸 0.011 mg/mL)。

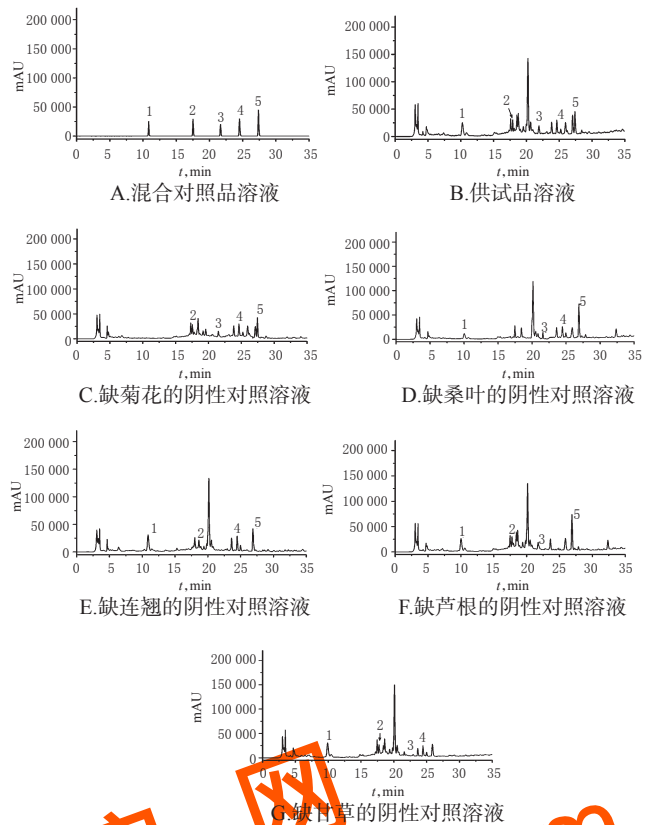
2.2.2 供试品溶液 取样品适量,研细,精密称取粉末 2.0 g,置于 50 mL 量瓶中,加乙腈 40 mL,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取 20 min,放冷至室温,加乙腈定容,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按标准 WS₃-B-0397-90 中桑菊感冒颗粒处方分别制备缺菊花、桑叶、连翘、芦根、甘草的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备各阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、各阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,混合对照品各待测成分色谱峰分离良好,供试品各待测成分色谱峰与相邻色谱峰分离度均大于 1.5,且在相同位置上阴性对照无干扰峰出现。

2.4 线性关系考察



注:1.绿原酸;2.芦丁;3.连翘苷;4.槲皮素;5.甘草酸
Note: 1. chlorogenic acid; 2. rutin; 3. phillyrin; 4. quercetin; 5. glycyrrhizic acid

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、5、10、20、40 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 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
绿原酸	$y=2.0 \times 10^4 x - 114\ 795$	0.999 2	0.014~0.560
芦丁	$y=1.0 \times 10^6 x - 8\ 772$	0.999 6	0.022~0.880
连翘苷	$y=7.0 \times 10^6 x - 4\ 245$	0.999 9	0.010~0.400
槲皮素	$y=1.0 \times 10^6 x + 342$	0.999 9	0.016~0.640
甘草酸	$y=3.0 \times 10^6 x - 23\ 025$	0.999 1	0.011~0.440

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下各单一对照品贮备液适量,分别按照一定的比例进行稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得定量限;当信噪比为 3:1 时,得检测限。结果,绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸的定量限分别为 0.752、0.647、0.483、0.372、0.242 mg/L;检测限分别为 0.253、0.185、0.157、0.162、0.098 mg/L。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,绿

原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸峰面积的RSD分别为0.55%、0.09%、0.15%、0.19%、0.15% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160401)适量,分别于室温避光环境下放置0、4、6、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸峰面积的RSD分别为0.38%、1.13%、0.53%、0.54%、0.70% ($n=5$),表明供试品溶液室温避光环境下放置10 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

取样品(批号:160401)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各待测成分含量。结果,绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸的平均含量分别为0.318、0.516、0.237、0.392、0.254 mg/mL, RSD 分别为0.86%、1.32%、0.94%、1.30%、1.07% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品细粉(批号:160401)6份,每份1.0 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,分别加入一定量的单一对照品贮备液适量,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2。

2.10 样品含量测定

取3批样品细粉各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液各3份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

本试验中,通过结合二极管阵列检测器上得到的紫外吸收光谱图,确定了各待测成分的最佳检测波长分别为325 nm(绿原酸)、355 nm(芦丁)、276 nm(连翘苷)、375 nm(槲皮素)、250 nm(甘草酸),但考虑到便于试验操作,且各待测成分在254 nm波长处均有较好的吸收,故选择254 nm作为本研究的检测波长。

3.2 流动相的选择

本研究分别采用乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.3%磷酸溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液以及甲醇-0.4%磷酸溶液5种流动相体系进行梯度洗脱。结果表明,采用乙腈-0.4%磷酸溶液作为流动相体系时的分离效果较好,且基线较稳定,故选择乙腈-0.4%磷酸溶液作为本研究的流动相体系。

3.3 有效成分的选择

桑菊感冒颗粒收载于《中药成方制剂》(第二册)^[1],原标准中没有对有关成分进行含量测定。桑菊感冒片收载于2015年版《中国药典》(一部),且规定连翘苷含量的最低限度为0.16 mg/g^[3]。本试验中测得样品中连翘

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.325 4	0.352 0	0.673 0	98.7	98.2	1.4
	0.350 5	0.352 0	0.694 0	97.6		
	0.338 8	0.352 0	0.694 0	100.9		
	0.329 1	0.352 0	0.672 0	97.4		
	0.335 3	0.352 0	0.678 0	97.4		
	0.341 1	0.352 0	0.684 0	97.4		
芦丁	0.528 1	0.564 0	1.068 0	95.7	97.8	1.1
	0.568 7	0.564 0	1.121 0	97.9		
	0.549 8	0.564 0	1.108 0	99.0		
	0.534 0	0.564 0	1.088 0	98.2		
	0.544 0	0.564 0	1.096 0	97.9		
	0.553 4	0.564 0	1.105 0	97.8		
连翘苷	0.242 5	0.256 0	0.487 0	95.5	96.4	1.3
	0.261 2	0.256 0	0.506 0	95.6		
	0.252 5	0.256 0	0.496 0	95.1		
	0.245 2	0.256 0	0.496 0	98.0		
	0.249 9	0.256 0	0.501 0	98.1		
	0.254 2	0.256 0	0.501 0	96.4		
槲皮素	0.401 2	0.410 0	0.808 0	99.2	98.2	1.4
	0.432 1	0.410 0	0.832 0	97.5		
	0.417 7	0.410 0	0.813 0	96.4		
	0.405 6	0.410 0	0.815 0	99.8		
	0.413 3	0.410 0	0.811 0	97.0		
	0.420 4	0.410 0	0.826 0	98.9		
甘草酸	0.259 9	0.288 0	0.543 0	98.3	98.8	1.0
	0.280 0	0.288 0	0.566 0	99.3		
	0.270 6	0.288 0	0.553 0	98.0		
	0.262 5	0.288 0	0.547 0	98.7		
	0.267 8	0.288 0	0.557 0	100.4		
	0.272 4	0.288 0	0.554 0	97.8		

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3$, mg/g)

批号	绿原酸	芦丁	连翘苷	槲皮素	甘草酸
160401	0.325	0.511	0.246	0.384	0.267
160402	0.318	0.506	0.211	0.394	0.279
160403	0.304	0.554	0.204	0.361	0.232
平均值	0.316	0.524	0.220	0.380	0.259

苷的平均含量为0.220 mg/g,符合2015年版《中国药典》(一部)规定的标准。为更好地控制本制剂的内在质量,本试验增加了绿原酸、芦丁、槲皮素和甘草酸的含量测定,且5种待测成分在同一色谱条件下可同时测定。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于桑菊感冒颗粒中绿原酸、芦丁、连翘苷、槲皮素和甘草酸含量的同时测定。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准: 中药成方制剂: 第2册[S]. 1998: 119-119.
- [2] 瞿璐, 王涛, 董勇喆, 等. 菊花化学成分与药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 98-104.
- [3] 欧阳臻, 陈钧. 桑叶的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 江苏大学学报: 自然科学版, 2003, 24(6): 39-44.

微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定倍丙酯氯化钠注射液中8种金属元素的含量^Δ

钟振华*,涂明珠,万 星,夏红英,程奇珍[#](江西省药品检验检测研究院/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心,南昌 330029)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)12-1612-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.12.07

摘要 目的:建立测定倍丙酯氯化钠注射液中8种金属元素含量的方法。方法:采用微波消解-电感耦合等离子体质谱法。射频功率为1 530 W,冷却温度为4 ℃,碰撞气为氦气,载气为氩气,载气流量为1.08 L/min,积分时间为0.3 s,等离子气流量为15 L/min,四级杆真空度为 3.04×10^{-4} Pa,采样锥孔径为1.0 mm,截取锥孔径为0.4 mm,进样速度为0.3 rps,数据采集重复3次;微波消解功率为1 600 W,升温程序为30 min内由室温升温至160 ℃,保持5 min,再以5 ℃/min的速度升温至190 ℃,保持45 min。结果:镁、铝检测质量浓度线性范围均为1~250 ng/mL,铬、锰、铁、铜、锌、镉检测质量浓度线性范围均为1~100 ng/mL(r 均不小于0.999 0);检测限为0.063 6~1.785 0 ng/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于4%;加样回收率为89.65%~105.60%(RSD为1.57%~3.98%, $n=9$);耐用性试验的RSD均小于12%。结论:该方法操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性、耐用性好,可用于测定倍丙酯氯化钠注射液中8种金属元素的含量。

关键词 倍丙酯氯化钠注射液;微波消解-电感耦合等离子体质谱法;金属元素

Content Determination of 8 Metal Elements in Propylgacate and Sodium Chloride Injection by Microwave Digestion-inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

ZHONG Zhenhua, TU Mingzhu, WAN Xing, XIA Hongying, CHENG Qizhen (Jiangxi Institute for Drug Control/Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of 8 metal elements in Propylgacate and sodium chloride injection. METHODS: Microwave digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was adopted. Radiofrequency power was 1 530 W; cooling temperature was 4 ℃; collision gas was He gas; carrier gas was argon; flow rate of carrier gas was 1.08 L/min; integration time was 0.3 s; plasma gas flow rate was 15 L/min; the vacuum degree of quadrupole was 3.04×10^{-4} Pa; sampling cone aperture was 1.0 mm; interception cone aperture was 0.4 mm; the speed of sampling was 0.3 rps; data collection was repeated for 3 times. The microwave digestion power is 1 600 W, and the heating process is heated to 160 ℃ at room temperature for 30 min, and maintained at 5 min, and then heated to 190 ℃ at a temperature of 5 ℃/min and maintained 45 min. RESULTS: The linear range of Mg and Al were 1-250 ng/mL; the linear range of Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd were 1-100 ng/

- [4] 茅纯,郑娟,邹耀华. 高效液相色谱法同时测定桑菊感冒片中绿原酸、木犀草苷和3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸含量[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(1): 193-195.
- [5] 吴国友. 连翘药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2013, 28(10): 1508-1509.
- [6] 胡静,马琳,张坚,等. 连翘的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(10): 760-764.
- [7] 潘春燕,陈静,杭太俊,等. HPLC法同时测定芦根中对香豆酸和阿魏酸含量[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(2): 219-223.
- [8] 张友波,徐崑,杨秀伟,等. RP-HPLC法同时测定不同产地甘草中9个主要成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 214-219.
- [9] 范学辉,张清安,刘梅,等. 苦杏仁脱苦方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 396-399.
- [10] 郑润生,徐晖,王文丽,等. 苦杏仁中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的液质联用检测分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3534-3538.
- [11] 徐凌玉,李振麟,蔡芷辰,等. 薄荷化学成分的研究[J]. 中草药, 2013, 44(20): 2798-2802.
- [12] 郭丽,张村,李丽,等. 中药桔梗的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 181-186.
- [13] 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, 2015:1464-1465.

^Δ 基金项目:国家药品抽检项目(2015);江西省食品药品监督管理局科研项目(No.2016YP16)

* 工程师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:0791-88158656。E-mail:zhongzhenhua_510@sina.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:药物分析。电话:0791-88158656。E-mail:cqz1110@sina.com

(收稿日期:2018-01-11 修回日期:2018-04-26)

(编辑:陈 宏)