

# HPLC法测定双参消癥颗粒中哈巴俄苷和二苯乙烯苷的含量<sup>Δ</sup>

周婧<sup>1,2\*</sup>, 黄维洁<sup>3</sup>, 杨苏蓓<sup>4</sup>, 张如松<sup>1#</sup>(1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.杭州市西溪医院, 杭州 310023; 3.温州市中西医结合医院, 浙江温州 325000; 4.浙江中药研究所有限公司, 杭州 310023)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4255-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.28

**摘要** 目的:建立测定双参消癥颗粒中哈巴俄苷和二苯乙烯苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。测定哈巴俄苷含量的色谱柱为Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-1%醋酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为278 nm,柱温为25℃,进样量为20 μl;测定二苯乙烯苷含量的色谱柱为Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(19:81, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为320 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:哈巴俄苷、二苯乙烯苷检测进样量线性范围分别为0.555 8~8.893 4 μg( $r=0.999\ 9$ )、0.010 6~0.340 2 mg( $r=0.999\ 6$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.80%;加样回收率分别为97.30%~101.35%、96.67%~100.83%,RSD分别为1.43%、1.48%( $n=6$ )。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于双参消癥颗粒中哈巴俄苷和二苯乙烯苷的含量测定。

**关键词** 高效液相色谱法;双参消癥颗粒;哈巴俄苷;二苯乙烯苷;含量测定

## Contents Determination of Harpagoside and Stilbene Glycoside in Shuangshen Xiaolong Granule by HPLC

ZHOU Jing, HUANG Wei-jie, YANG Su-bei, ZHANG Ru-song (1.College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China; 3.Hospital of Chinese Traditional and Western Medicine of Wenzhou City, Zhejiang Wenzhou 325000, China; 4.Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of harpagoside and stilbene glycoside in Shuangshen xiaolong granule. METHODS: HPLC of harpagoside was performed on the column of Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-1% acetic acid solution (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 278 nm, column temperature was 25℃ and volume injection was 20 μl. HPLC of stilbene glycoside was performed on the column of Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-water(19:81, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 320 nm, column temperature was 25℃ and volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.555 8-8.893 4 μg for harpagoside( $r=0.999\ 9$ ) and 0.010 6-0.340 2 mg for stilbene glycoside( $r=0.999\ 6$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.80%; recoveries were 97.30%-101.35% (RSD=1.43%,  $n=6$ ) and 96.67%-100.83% (RSD=1.48%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the contents determination of harpagoside and stilbene glycoside in Shuangshen xiaolong granule.

**KEYWORDS** HPLC; Shuangshen xiaolong granules; Harpagoside; Stilbene glycoside; Content determination

双参消癥颗粒是由玄参、淫羊藿、丹参、何首乌等中药组成的中药制剂,其中玄参、淫羊藿为君药,丹参、何首乌为臣药。玄参具有凉血滋阴、泻火解毒的功效<sup>[1]</sup>;淫羊藿具有补肾壮阳、强壮筋骨、祛风除湿的功效<sup>[2]</sup>;丹参具有活血通络、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦等功效<sup>[3]</sup>;何首乌可养血益肝、固精益肾、健筋骨、乌髭发,为滋补良药<sup>[4]</sup>;各药共奏,可补肾滋阴,活血化瘀。目前对双参消癥颗粒中有效成分检测的报道不多,因此本研究建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定双参消癥颗粒中哈巴俄苷、二苯乙烯苷含量的方法,旨在为该制剂的质量控制提供试验依据。

<sup>Δ</sup>基金项目:浙江省中药现代化项目(No.浙经信医化[2011]54号-9)

\*药师,硕士研究生。研究方向:中药药剂。电话:0571-86481623。E-mail:amt16888@163.com

#通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质与创新药物研发。电话:0571-86613798。E-mail:zrs789@126.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2996型二极管阵列检测器(美国Waters公司);AB104-N型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

双参消癥颗粒(浙江中医药大学中药资源工程重点实验室自制,批号:2012220、2012320、2012420,规格:10 g/袋);哈巴俄苷对照品(批号:111730-200604,纯度:97.8%)、二苯乙烯苷对照品(批号:110844-200606,纯度:96.9%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,乙醇、乙酸、甲酸为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 哈巴俄苷的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 4.5 μm);流动相:乙腈(A)-1%醋酸溶液

(B), 梯度洗脱(0~8 min, 20%→30% A; 8~15 min, 30%→45% A; 15~20 min, 45%→50% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 278 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μl。在上述色谱条件下, 理论板数以哈巴俄苷峰计算应不少于 5 000, 分离度 > 1.5, 各成分基线分离良好, 详见图 1。

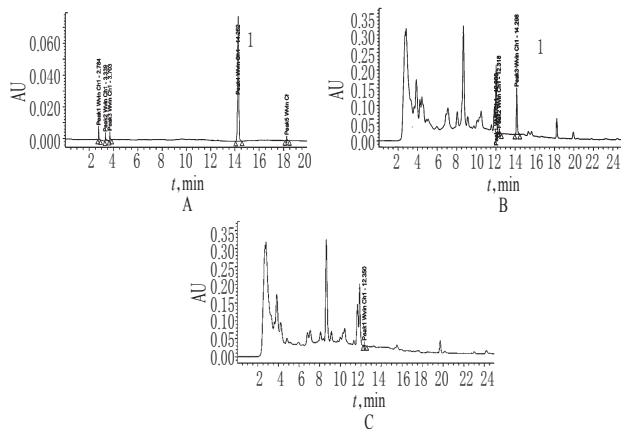


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 哈巴俄苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. harpagoside

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取哈巴俄苷对照品 6.25 mg, 置于 25 ml 量瓶中, 用 30% 甲醇溶解并定容, 摇匀, 得质量浓度为 0.25 mg/ml 的哈巴俄苷对照品贮备溶液。精密吸取该贮备溶液 1.00 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 用 30% 甲醇定容, 摇匀, 制成每 1 ml 含 10.00 μg 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取样品约 1.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50 倍量 30% 甲醇, 密塞, 称定质量, 浸泡 1 h, 超声(功率: 160 W, 频率: 40 kHz)处理 40 min, 放冷, 再次称定质量, 用 30% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液再次滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按照双参消癆颗粒的处方和制备工艺制备缺玄参的阴性样品, 取适量按“2.1.3”项下方法操作, 即得阴性对照溶液。

2.1.5 线性关系考察 精密称取哈巴俄苷对照品 11.58 mg, 置于 25 ml 量瓶中, 加 30% 甲醇溶解并定容, 分别精密吸取 0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加 30% 甲醇定容, 摇匀, 制成系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各 20 μl, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以对照品进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为  $y = 275\ 346x - 736.45 (r = 0.999\ 9)$ 。结果表明, 哈巴俄苷检测进样量线性范围为 0.555 8~8.893 4 μg。

2.1.6 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定, 记录峰面积。结果, 哈巴俄苷峰面积的 RSD 为 0.75% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号: 2012220)适量, 分别于放置 0、2、4、8、12 h 时进样测定, 记录峰面积。结果, 哈巴俄苷峰面积的 RSD 为 1.73% ( $n = 5$ ), 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.1.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号: 2012220)适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 共 5 份, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 哈巴俄苷峰面积的

RSD 为 0.42% ( $n = 5$ ), 表明本方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取样品(批号: 2012220)适量, 共 6 份, 分别加入适量对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 哈巴俄苷加样回收率试验结果( $n = 6$ )

Tab 1 Results of recovery test for harpagoside( $n = 6$ )

称样量, g	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, %
0.500 1	0.74	0.74	1.47	98.65		
0.500 3	0.74	0.74	1.48	100.00		
0.500 2	0.74	0.74	1.46	97.30	99.33	1.43
0.500 0	0.74	0.74	1.47	98.65		
0.500 0	0.74	0.74	1.49	101.35		
0.500 3	0.74	0.74	1.48	100.00		

2.1.10 样品含量测定 取 3 批样品各适量, 分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定并计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品中哈巴俄苷的含量测定结果( $n = 3$ )

Tab 2 Content determination results of harpagoside in the sample( $n = 3$ )

批号	哈巴俄苷含量, mg/g
2012210	1.44
2012220	1.48
2012302	1.54

## 2.2 二苯乙烯苷的含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Kromasil 100-5  $C_{18}$  (250 mm×4.6 mm, 4.5 μm); 流动相: 乙腈-水(19:81, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 320 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μl。在上述色谱条件下, 理论板数以二苯乙烯苷峰计算应不少于 2 000, 分离度 > 1.5, 各成分基线分离良好, 详见图 2。

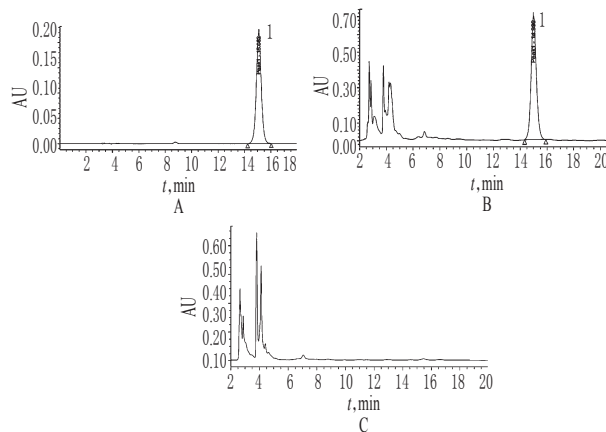


图 2 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 二苯乙烯苷

Fig 2 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. stilbene glycoside

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取二苯乙烯苷对照品 10.63 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并定容, 摇匀, 得质量浓度为 1.063 mg/ml 的二苯乙烯苷对照品贮备溶液。精密吸取该贮备溶液 2.00 ml 至 10 ml 量瓶中, 加入 50% 乙醇定容, 摇匀, 制成每 1 ml 含 0.21 mg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品约 0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 25 ml 50%乙醇,密塞,称定质量,加热回流 40 min,放冷,再称定质量,用 50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液再次滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按照双参消癥颗粒的处方和制备工艺制备缺何首乌的阴性样品,取适量按“2.2.3”项下方法操作,即得阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下对照品贮备溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 ml 于 10 ml 量瓶中,加入 50%乙醇定容,制成系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各 10  $\mu$ l,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品进样量(x,mg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=52\ 897\ 248x-268\ 687$ ( $r=0.999\ 6$ )。结果表明,二苯乙烯苷检测进样量线性范围为 0.010 6~0.340 2 mg。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定,记录峰面积。结果,二苯乙烯苷峰面积的 RSD 为 0.25% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:2012220)适量,分别于放置 0、2、4、8、12 h 时进样测定。结果,二苯乙烯苷峰面积的 RSD 为 0.72% ( $n=5$ ),表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:2012220)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共 5 份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,二苯乙烯苷峰面积的 RSD 为 1.80% ( $n=5$ ),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取样品(批号:2012220)适量,共 6 份,分别精密加入对照品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表 3。

表 3 二苯乙烯苷加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 3 Results of recovery test for stilbene glycoside( $n=6$ )

称样量/g	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/%
0.250 8	1.20	1.20	2.39	99.17		
0.250 0	1.20	1.20	2.36	96.67		
0.250 3	1.20	1.20	2.38	98.33		
0.250 3	1.20	1.20	2.39	99.17	98.61	1.48
0.250 4	1.20	1.20	2.41	100.83		
0.250 0	1.20	1.20	2.37	97.50		

2.2.10 样品含量测定 取 3 批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表 4。

### 3 讨论

本品中玄参为君药,何首乌为臣药,该二味药是本制剂功能主治的主要物质基础。哈巴俄苷为玄参中含量较高的成分<sup>[5]</sup>,且 2010 年版《中国药典》(一部)<sup>[6]</sup>中玄参以哈巴俄苷及哈

表 4 样品中二苯乙烯苷含量测定结果( $n=3$ )

Tab 4 Results of stilbene glycoside content determination in the sample( $n=3$ )

批号	二苯乙烯苷含量/mg/g
2012210	5.18
2012220	4.88
2012302	5.38

巴俄苷含量作为质量控制标准;二苯乙烯苷为何首乌中的主要水溶性成分<sup>[7]</sup>,且 2010 年版《中国药典》(一部)<sup>[6]</sup>中何首乌以二苯乙烯苷含量作为质量控制标准。故本研究以哈巴俄苷和二苯乙烯苷的含量测定作为该制剂的定量控制指标具有重要意义。

本研究中哈巴俄苷含量测定参照 2010 年版《中国药典》(一部)<sup>[6]</sup>玄参中哈巴俄苷的含量测定方法。在供试品溶液的制备中采用超声提取方法,分别考察了提取溶剂、溶剂用量及超声时间对哈巴俄苷含量的影响。结果表明,选用 50 ml 30% 甲醇作为提取溶剂、超声提取 40 min 可使哈巴俄苷提取完全。二苯乙烯苷含量测定参照 2010 年版《中国药典》(一部)<sup>[6]</sup>何首乌中二苯乙烯苷的含量测定方法。在供试品溶液的制备中采用回流提取法,考察了提取溶剂用量和回流时间对二苯乙烯苷含量的影响。结果表明,加入 25 ml 50%乙醇回流提取 40 min 可使二苯乙烯苷提取完全。

在哈巴俄苷的含量测定中,笔者曾对流动相的溶剂系统组成和比例进行了比较,最终发现以乙腈-1%醋酸溶液进行梯度洗脱,能使供试品溶液中的哈巴俄苷峰与杂质峰得到良好分离,出峰时间适当、峰形对称。

综上所述,该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于双参消癥颗粒中哈巴俄苷、二苯乙烯苷的含量测定。

### 参考文献

- [1] 韩建军,宁娜.玄参药理作用的研究概述[J].海峡药学,2014,26(12):97.
- [2] 高孟婷,马芳芳,吴少辉,等.淫羊藿苷的药理作用研究进展[J].安徽农业科技,2012,40(18):9 623.
- [3] 柳丽,张洪泉.丹参活性成分的现代中药药理研究进展[J].中国野生植物资源,2003,22(6):1.
- [4] 张进,黄进,徐志伟.何首乌补肾作用的相关药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2009,20(5):496.
- [5] 黄滔敏,陈念祖,王东蕾,等.红外光辅助萃取-HPLC 法测定玄参中肉桂酸和哈巴俄苷的含量[J].中国药房,2011,22(19):1 796.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010 年版.北京:中国医药科技出版社,2010:108.
- [7] 兰婷,王宝龙,李明华,等.HPLC 法测定何首乌中二苯乙烯苷的含量[J].中国药师,2014,17(10):1 774.

(收稿日期:2015-03-26 修回日期:2015-07-02)

(编辑:张 静)