

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.09.1202

• 短篇论著 •

高效液相色谱法测定白龙解郁颗粒中橙皮苷和甘草苷的含量

陈小玲, 蔺红伟, 江春霞, 朴淑娟, 陆文铨*

第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003

[摘要] **目的** 采用高效液相色谱法(HPLC)测定白龙解郁颗粒中橙皮苷和甘草苷的含量。**方法** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,使用 Agilent SB-ZOBAX C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)行 HPLC。橙皮苷的测定:乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)为流动相,柱温 30℃,检测波长为 283 nm,进样量 10 μL;甘草苷的测定:乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82)为流动相,柱温 30℃,检测波长为 276 nm,进样量 10 μL。**结果** HPLC 测定橙皮苷和甘草苷的精密度、重复性、稳定性的范围均符合相关规定;橙皮苷在 35.64~178.20 μg/mL 范围内线性关系良好($r=0.999\ 8$),甘草苷在 13.55~216.80 μg/mL 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$);加样回收率分别为:橙皮苷 99.30%,RSD 为 1.0%($n=9$);甘草苷 98.60%,RSD 为 1.5%($n=9$)。**结论** HPLC 快捷、简单、稳定可靠,可用于白龙解郁颗粒的质量控制。

[关键词] 橙皮苷;甘草苷;高压液相色谱法;白龙解郁颗粒

[中图分类号] R 286.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)09-1202-04

Determination of hesperidin and liquiritin in Bailong Jieyu granule by high-performance liquid chromatography

CHEN Xiao-ling, LIN Hong-wei, JIANG Chun-xia, PIAO Shu-juan, LU Wen-quan*

Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To determine the contents of the hesperidin and liquiritin in *Bailong Jieyu* granule with high-performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** HPLC was performed with octadecylsilane chemically bonded silica as filler using the Agilent SB-ZOBAX C₁₈ Column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Hesperidin was detected with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% of phosphoric acid solution (22:78), with column temperature being 30℃, the detection wavelength being 283 nm, and the injection volume being 10 μL. Liquiritin was determined with acetonitrile-0.1% of phosphoric acid solution (18:82) as mobile phase, with column temperature being 30℃, the detection wavelength being 276 nm, and the injection volume being 10 μL. **Results** Accuracy, repeatability and stability of HPLC for determination of hesperidin and liquiritin were in line with the relevant requirements. The linear relationship of hesperidin was good within the range of 35.64-178.20 μg/mL ($r=0.999\ 8$), with the average recovery rate being 99.30%, and relative standard deviation (RSD) being 1.0% ($n=9$). The good linear range of liquiritin was 13.55-216.80 μg/mL ($r=0.999\ 9$), with the average recovery rate being 98.60% and RSD being 1.5% ($n=9$). **Conclusion** HPLC method was fast, simple, stable and reliable, and it can be used for the quality control of *Bailong Jieyu* granule.

[Key words] hesperidin; liquiritin; high-pressure liquid chromatography; *Bailong Jieyu* granule

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(9): 1202-1205]

白龙解郁颗粒为本院自有制剂,具有镇静安神、除烦解郁、清热泻火的功效,主要用于治疗心烦意

乱、情绪低沉、悲忧欲哭、善感多愁、躺而不寐、眠而不实或自觉全身不适、头目昏重、口燥咽干、重病焦

[收稿日期] 2017-03-29 **[接受日期]** 2017-06-29

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ04-1),上海市临床药学重点专科建设项目(2016-40044-002),上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2016ZB0303). Supported by Special Project for Improving of Preparation Quality Standard of Military Medical Institutions (14ZJZ04-1), Key Special Project of Clinical Pharmacy of Shanghai (2016-40044-002), and Important Weak Subject Construction Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2016ZB0303).

[作者简介] 陈小玲,药师. E-mail: ddchen0626@163.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-65492766, E-mail: lwqp@163.com

虑等症状,临床疗效良好。法半夏为本方君药^[1],陈皮为臣药,炙甘草为使药,本研究主要是针对后两味药物。陈皮味苦、辛、温,能理气健脾,燥湿化痰。陈皮中主要含有挥发油、黄酮类、有机胺类及微量元素等成分^[2],其中橙皮苷属黄酮类,为陈皮的有效成分。《中华人民共和国药典》(2015 版)一部以橙皮苷作为陈皮^[3]药材含量的测定指标成分。本品处方为《局方》逍遥散合二陈汤加味而成,《中华人民共和国药典》(2015 版)一部规定了二陈丸^[3]的质量标准,其中在含量测定项下采用橙皮苷作为含量测定指标。茯苓、白术(炒)、薄荷、黄连、大黄(酒制)、牡蛎(煅)、龙骨(煅)为本方佐药,炙甘草为本方便药,除龙骨外,《中华人民共和国药典》(2015 版)一部对上述各药材均有收载,其中薄荷、黄连、大黄、牡蛎、炙甘草均规定了含量测定项。有文献^[4-5]报道甘草苷具有抗抑郁作用,因此,选择甘草苷作为本制剂的含量测定指标之一。

1 仪器和试药

1.1 仪器 Agilent 1200 型液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Agilent SB-ZOBAX C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);梅特勒-托利多 XA205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司);SB2200 超声仪[必能信超声(上海)有限公司];WL-901 型旋涡振荡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 试药 乙腈(德国默克公司,608-001-00-3)、磷酸(德国默克公司,603-001-00-X)、橙皮苷(中国食品药品检定所,110721-201316)、甘草苷(中国食品药品检定所,110721-201316)。白龙解郁颗粒,由本

院制剂室制备,规格:12 g/袋,批号:151211、160527、161107;阴性对照颗粒由上海药谷药业有限公司制剂室制备;水为注射用水,实验室自制。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品储备液 橙皮苷对照品溶液:精密称定橙皮苷对照品 8.91 mg,置 50 mL 量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀(浓度 178.2 μg/mL),作为橙皮苷对照品储备液;甘草苷对照品溶液:精密称定甘草苷对照品 10.84 mg,置 50 mL 量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀(浓度 216.8 μg/mL),作为甘草苷对照品储备液。

2.1.2 样品溶液 取白龙解郁颗粒 12 g,研细过 5 号筛,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声(功率 200 W,频率 40 kHz)处理 25 min,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液备用。

2.1.3 空白溶液 取 12 g 阴性对照颗粒,制法同“样品溶液”制备项。

2.2 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;选用 Agilent SB-ZOBAX C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。橙皮苷的检测方法:乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)为流动相,柱温 30 ℃,检测波长为 283 nm,进样量 10 μL。甘草苷的检测方法:乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82)为流动相,柱温 30 ℃,检测波长为 276 nm,进样量 10 μL。理论塔板数按橙皮苷或甘草苷峰计算应不低于 10 000,目标峰与相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。检测图谱见图 1。

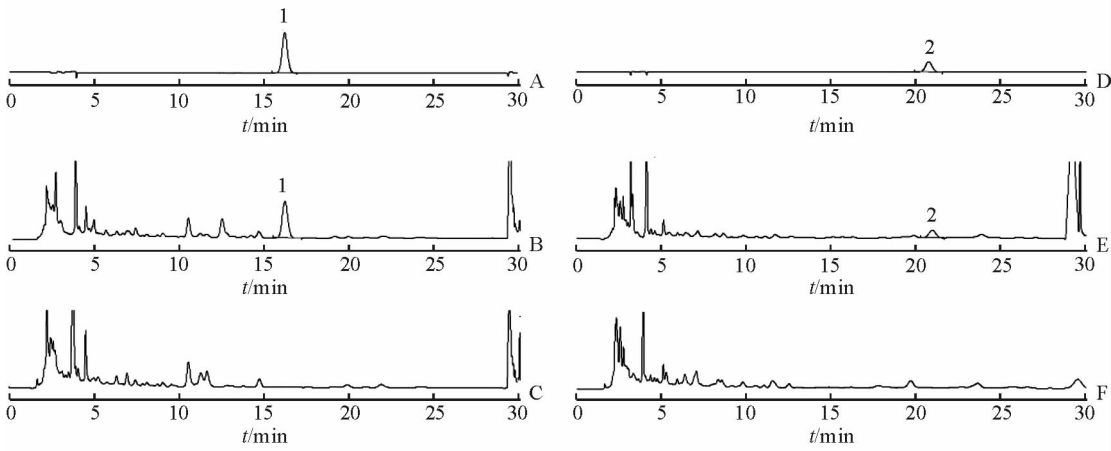


图 1 橙皮苷和甘草苷检测的 HPLC 图谱

A: 橙皮苷对照品溶液; B: 橙皮苷检测样品溶液; C: 缺陈皮空白对照溶液; D: 甘草苷对照品溶液; E: 甘草苷检测样品溶液; F: 缺甘草空白对照溶液. 1: 橙皮苷; 2: 甘草苷. HPLC: 高效液相色谱

2.3 方法学考察

2.3.1 线形范围 橙皮苷:精密量取橙皮苷的对照品储备溶液(浓度 178.2 μg/mL) 2、4、6、8 mL,分别置于 4 个 10 mL 量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为 35.64、71.28、106.92、142.56 μg/mL 的橙皮苷溶液。精密量取上述 5 种浓度的溶液各 10 μL 进样,记录色谱图,结果表明当橙皮苷的浓度为 35.64~178.20 μg/mL 时,橙皮苷的峰面积与浓度呈良好的线性关系,回归方程为: $C=0.058A-1.0229$ ($r=0.9998, n=6$)。

甘草苷:精密量取甘草苷的对照品储备溶液(浓度 216.8 μg/mL) 5 mL,置于 10 mL 量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀(浓度 108.4 μg/mL);同法逐一倍比稀释,得浓度分别为 54.2、27.1、13.55 μg/mL 的甘草苷溶液。精密量取上述 5 种浓度的溶液各 10 μL 进样,记录色谱图,结果表明当甘草苷的浓度为 13.55~216.80 μg/mL 时,甘草苷的峰面积与浓度呈良好的线性关系,回归方程为: $C=0.0607A+0.1876$ ($r=0.9999, n=6$)。以上结果满足含量测定要求。

2.3.2 精密度 分别取浓度为 106.92 μg/mL 橙皮苷对照品溶液、浓度为 54.2 μg/mL 的甘草苷对照品溶液,连续重复进样 5 次,经计算色谱峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 1.4%、1.1%,结果满足含量测定要求。

2.3.3 稳定性 按 2.1.2 项下方法制备 1 份供试品溶液,分别于 0、1、4、8、24 h 时进样分析,结果橙皮苷峰面积的 RSD 为 0.7%,甘草苷峰面积的 RSD 为 0.9%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性 取白龙解郁颗粒 10 袋(批号 161107),研细,过 5 号筛,分别取 6 份 1 g 样品,按 2.1.2 项下方法配制供试品溶液。另取 71.28 μg/mL 橙皮苷对照品溶液和 27.1 μg/mL 甘草苷对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,在 2.2 项色谱条件进样分析,结果橙皮苷含量测定 RSD 为 1.6%;甘草苷含量测定 RSD 为 1.1%,均满足含量测定要求。

2.3.5 回收率 取已知含量的样品粉末 9 份(橙皮苷含量 1.707 1 mg/g),每份 0.5 g,精密称定,置于 9 个具塞锥形瓶中。另精密称取橙皮苷对照品 21.4 mg 至 5 mL 容量瓶中(溶剂为稀乙醇),分别精

密度取 0.8、1.0、1.2 mL,置于 25 mL 容量瓶中制成浓度分别为 136.8、171.2、204.4 μg/mL 的橙皮苷对照品溶液。分别精密量取 5 mL 各 3 份,加入上述 9 个具塞锥形瓶中,再分别精密加入稀乙醇 20 mL,密塞,按 2.1.2 项下方法配制供试品溶液。分别精密吸取浓度为 70 μg/mL 的对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 进样,按 2.2 项色谱条件进样分析,计算得平均加样回收率为 99.30%,RSD 为 1.0%。

分别精密吸取甘草苷对照品溶液(216.8 μg/mL) 5、6、7 mL,置于 3 个 25 mL 量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为 43.360、52.032、60.704 μg/mL 的甘草苷对照品溶液。另取已知含量样品粉末 9 份(甘草苷含量 0.513 mg/g),每份 0.5 g,精密称定,置于 9 个具塞锥形瓶中,分别精密吸取上述 3 个浓度的甘草苷对照品溶液 5 mL 各 3 份(约相当于样品含量的 80%、100%、120%),分别加入上述 9 个具塞锥形瓶中,再精密加入稀乙醇 20 mL,密塞,按 2.1.2 项下方法配制供试品溶液。分别精密吸取浓度为 20 μg/mL 的对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 进样,在 2.2 项色谱条件下分析,计算得平均加样回收率为 98.60%,RSD 为 1.5%。

2.3.6 检测限及定量限 当信噪比(S/N)为 3 时,橙皮苷和甘草苷的最低检测限分别为 3.373、13.55 ng;当信噪比(S/N)为 10 时,橙皮苷和甘草苷的最低定量限分别为 6.747、40.65 ng。

2.4 样品测定 按 2.1.2 项下方法制备样品溶液(批号分别为 151211、160527、161107),在 2.2 项下色谱条件进样分析,根据标准曲线方程计算样品含量,结果见表 1。

表 1 3 批白龙解郁颗粒中橙皮苷、甘草苷的含量
 $w_B/(mg \cdot g^{-1}), n=3, \bar{x} \pm s$

批号	橙皮苷	甘草苷
151211	1.707±0.003	0.512±0.008
160527	1.723±0.010	0.518±0.002
161107	1.696±0.006	0.508±0.003

3 讨论

3.1 检测波长的选择 橙皮苷、甘草苷在流动相中的紫外光谱分别见图 2A、2B。紫外图谱表明,橙皮苷和甘草苷的最大吸收波长分别为 283、276 nm,所以选择作为检测波长。

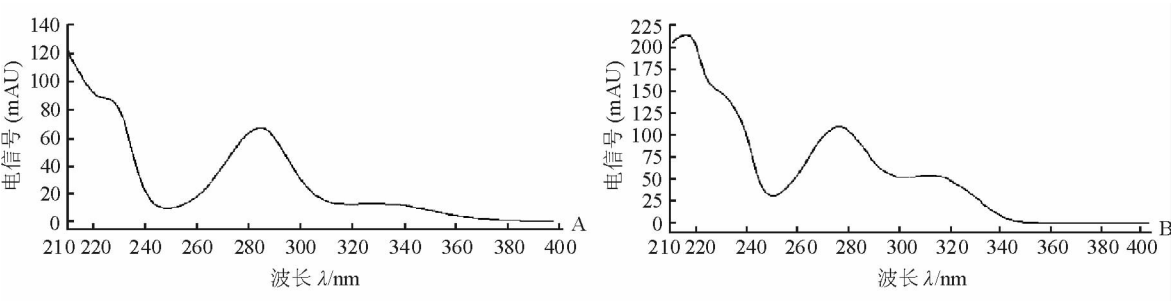


图 2 橙皮苷(A)、甘草苷(B)的紫外光谱图

3.2 提取方法的选择 参考文献[6],对橙皮苷的提取方法进行了优化,分别考察了不同溶剂(甲醇、70%甲醇、稀乙醇)和不同超声处理时间(10、20、30 min)对橙皮苷提取效率的影响。实验结果表明,以稀乙醇为溶剂,超声 25 min 可以将样品中的橙皮苷提取完全。以稀乙醇为溶剂,分别考察了不同超声处理时间(15、25、35 min)对甘草苷提取效率的影响,实验结果表明,超声 25 min 可以将样品中的甘草苷提取完全。

本实验采用 HPLC 对白龙解郁颗粒中的橙皮苷和甘草苷分别进行了含量测定,方法学考察表明其精密度、重复性、稳定性、加样回收率均符合相关规定。本实验建立的方法简单、快捷、稳定可靠,为白龙解郁颗粒的质量控制提供了依据。

[参考文献]

[1] 许腊英,夏荃,刘先琼,毛维伦. 半夏化学成分及饮片的现代研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15:441-443.

[2] 张志海,王彩云,杨天鸣,周继兵,黄耀兵. 陈皮的化学

成分及药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志,2005,20:47-48.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:191,438.

[4] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,周东丰. 甘草苷对抑郁模型大鼠体重及行为学的影响[J]. 中国心理卫生杂志,2006,20:787-790.

[5] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,管振全,周东丰. 甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用[J]. 中国临床康复,2006,10:69-72.

[6] 季倩,高守红,张汉明,张磊. HPLC 法测定各沪产地龙和广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶、尿苷的含量[J]. 第二军医大学学报,2015,36:443-446.

JI Q, GAO S H, ZHANG H M, ZHANG L. HPLC in determination of hypoxanthine, xanthine, uridine and uracil in Shanghai Pheretima and Pheretima aspergillum (E. Perrier)[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36: 443-446.

[本文编辑] 尹 茶