

HPLC 法同时测定野木瓜片中 木通苯乙醇苷 B 和绿原酸的含量

何积芬^{1,2}, 黄国健², 符滇海², 谢炯², 吕冠欣^{1,2*}

(1. 国家药品监督管理局药物代谢研究与评价重点实验室, 广州 510515;

2. 佛山市顺德区药品检验所, 广东 佛山 528300)

摘要 目的: 建立同时测定野木瓜片中木通苯乙醇苷 B 和绿原酸含量的高效液相色谱法。方法: 采用 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温为 35 °C; 以甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 327 nm; 进样体积为 10 μL。结果: 木通苯乙醇苷 B 和绿原酸分别在 0.51 ~ 20.60 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$) 和 0.52 ~ 20.63 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$) 内呈良好线性关系; 平均回收率分别为 100.3% (RSD 为 1.1%) 和 105.9% (RSD 为 1.4%)。测定 5 批次样品, 木通苯乙醇苷 B 和绿原酸含量分别为 0.083 ~ 1.115 mg · g⁻¹ 和 0.161 ~ 1.204 mg · g⁻¹。结论: 本法可为野木瓜片的质量评价标准提高提供依据。

关键词: 野木瓜片; 高效液相色谱法; 木通苯乙醇苷 B; 绿原酸; 含量测定

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)01-0090-04

doi: 10.19778/j.chp.2024.01.015

Simultaneous determination of calceolarioside B and chlorogenic acid in *Caulis Stauntoniae Chinensis* tablets by HPLC

HE Jifen^{1,2}, HUANG Guojian², FU Dianhai², XIE Jiong², LÜ Guanxin^{1,2*}

(1. NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Drug Metabolism, Guangzhou 510515, China;

2. Foshan Shunde District Institute for Drug Control, Foshan 528300, China)

Abstract Objective: To establish a method for simultaneous determination of calceolarioside B and chlorogenic acid in *Caulis Stauntoniae Chinensis* tablets by HPLC. **Methods:** The analysis was performed on a Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) maintained at 35 °C. The mobile phase was consisted of methanol and 0.1% phosphoric acid solution, and gradient eluted with a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 327 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results:** The linear ranges of calceolarioside B and chlorogenic acid were 0.51 – 20.60 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$) and 0.52 – 20.63 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$), respectively. The average recoveries were 100.3% with RSD as 1.1% and 105.9% with RSD as 1.4%, respectively. The content results of 5 batches of *Caulis Stauntoniae Chinensis* tablets were 0.083 – 1.115 mg · g⁻¹ for calceolarioside B and 0.161 – 1.204 mg · g⁻¹ for chlorogenic acid. **Conclusion:** The method can be used for improving the quality evaluation standard of *Caulis Stauntoniae Chinensis* tablets.

第一作者简介: 何积芬, 主管药师; 研究方向: 药品质量标准研究及风险评价。Tel: 0757-22207280; E-mail: 342339891@qq.com

* 通讯作者简介: 吕冠欣, 主任药师; 研究方向: 药品质量标准研究及中药检定。Tel: 0757-22231130; E-mail: 596962547@qq.com

Key words: Caulis Stauntoniae Chinensis tablets; HPLC; calceolarioside B; chlorogenic acid; content determination

野木瓜片是木通科植物野木瓜 *Stauntonia chinensis* DC. 的干燥带叶茎枝经水煎煮、浓缩、干燥成干浸膏后加辅料压制而成的片剂。野木瓜片具有祛风止痛、舒经活络的功效,临床上常与其他药物联合应用于三叉神经痛、坐骨神经痛、风湿关节痛等的治疗^[1-4]。野木瓜片全国共有 13 个批准文号,涉及 11 个生产厂家,其现行标准为《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第十四册、国家药监局散件标准以及注册标准。各标准均只对黄酮类成分进行显色鉴别、采用野木瓜对照药材进行薄层鉴别,以及片剂通则检查项。本文在相关标准和文献研究的基础上,首次建立了同时测定野木瓜片中木通苯乙醇苷 B 和绿原酸含量的高效液相色谱(HPLC)法,可为进一步完善野木瓜片的质量标准提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

赛默飞 U-3000 高效液相色谱仪、梅特勒 AG-204 万分之一电子天平、赛多利斯 BT 125D 十万分之一电子天平、上海科导 SK5210LHC 超声波清洗器。

1.2 试药与试剂

对照品木通苯乙醇苷 B(批号:111910-201604,含量以 98.2% 计)和绿原酸(批号:110753-202119,含量以 96.3% 计)购于中国食品药品检定研究院;5 批市售野木瓜片规格均为每片含野木瓜干浸膏 0.4 g,涉及 4 个生产厂家,分别为 A(批号 220912)、B(批号 220801)、C(批号 221102)、D(批号 220913 和 221110);色谱纯甲醇,分析纯磷酸等试剂,以纯化水作为实验用水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

赛默飞 U-3000 高效液相色谱仪,配备二极管阵列检测器。Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温为 35 °C,甲醇(A)和 0.1% 磷酸水溶液(B)为流动相,流速为 1.0 mL · min⁻¹;梯度洗脱(0 ~ 10 min, 12% A → 33% A; 10 ~ 20 min, 33% A; 20 ~ 22 min, 33% A → 80% A; 22 ~ 27 min, 80% A; 27 ~ 30 min, 80% A → 12% A; 30 ~ 35 min, 12% A);检测波长为 327 nm;进样体积

为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取木通苯乙醇苷 B 对照品和绿原酸对照品适量置量瓶中,加甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.412 mg 的木通苯乙醇苷 B 储备液和每 1 mL 含 0.206 mg 的绿原酸储备液。精密量取木通苯乙醇苷 B 储备液 1.0 mL 和绿原酸储备液 2.0 mL,置同一 20 mL 量瓶中,加甲醇稀释制成每 1 mL 中含木通苯乙醇苷 B 20.60 μg、绿原酸 20.63 μg 的混合对照品溶液。精密量取木通苯乙醇苷 B 储备液 2.5 mL 和绿原酸储备液 5.0 mL,置同一 20 mL 量瓶中,加甲醇稀释制成每 1 mL 中含木通苯乙醇苷 B 51.49 μg、绿原酸 51.57 μg 的回收率考察溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品 20 片,除去包衣,精密称定,研细,取约 0.2 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,超声(功率 200 W,频率 35 kHz)处理 40 min,取出,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

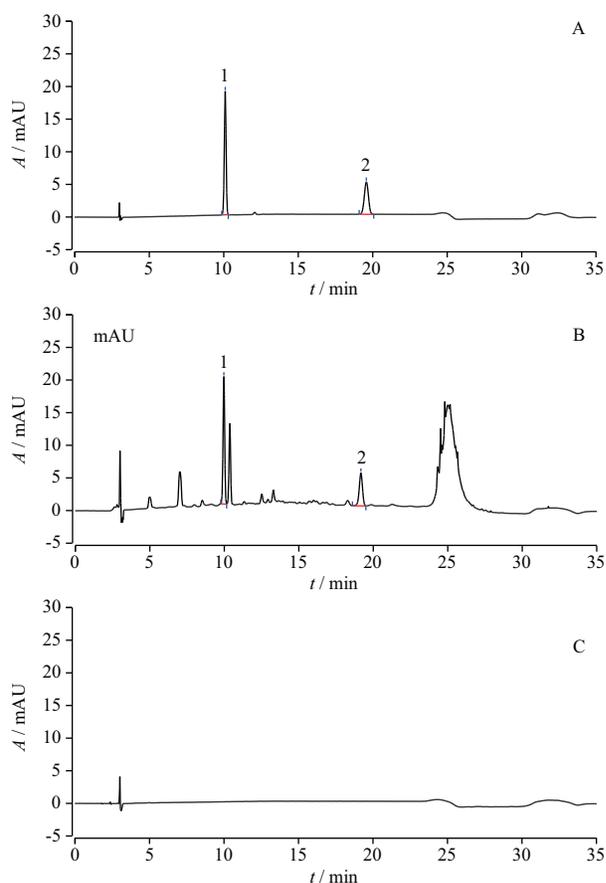
2.2.3 阴性对照溶液 根据处方中的比例及工艺,制备缺野木瓜的阴性样品,照“2.2.2”供试品溶液制备方法同法制成缺野木瓜的阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液照“2.1”项下的色谱条件进样分析,供试品色谱图表明,2 种待测组分色谱峰峰形良好,均能与相邻色谱峰实现分离,理论塔板数均大于 30 000。取“2.2.1”项下的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次,计算 2 种待测组分峰面积的 RSD。结果显示,木通苯乙醇苷 B 色谱峰平均峰面积为 1.612, RSD 为 0.6% ($n=5$);绿原酸色谱峰平均峰面积为 2.716, RSD 为 0.8% ($n=5$),表明色谱系统连续进样时的重复性良好。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 精密量取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液和空白溶剂各 10 μL,注入液相色谱仪,照“2.1”项下的色谱条件进样分析,记录色谱图。结果表明,阴性对照溶液和空白溶剂在木通苯乙醇苷 B 和绿原酸对照品色谱峰保留时间处无色谱峰,阴性对照物和溶剂对测定无干扰,方法专属性良好,色谱图见图 1。



1. 绿原酸(chlorogenic acid) 2. 木通苯乙醇苷 B(calceolarioside B)

图1 对照品(A)、供试品(B)和阴性样品(C)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance(A), test sample(B) and negative sample(C)

2.4.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 0.5 mL 置于 20 mL 量瓶中、1.0 mL 置于 20 mL 量瓶中、1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中、5.0 mL 置于 20 mL 量瓶中、5.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 2 种待测组分浓度分别约为 0.5、1.0、2.0、5.0、10 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合系列溶液,精密量取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪。分别以绿原酸和木通苯乙醇苷 B 的质量浓度(X)为横坐标,以相应峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,计算绿原酸和木通苯乙醇苷 B 的回归方程:

$$Y = 0.5220X - 0.01170 \quad r = 1.000$$

$$Y = 0.3129X + 0.004800 \quad r = 1.000$$

表明绿原酸在 $0.52 \sim 20.63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、木通苯乙醇苷 B 在 $0.51 \sim 20.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批次的供试品(厂家 D,批号 220913),按“2.2.2”项下方法平行制备供

试品溶液 6 份,照“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,带入回归方程计算,绿原酸平均含量为 $574.47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 1.4% ($n=6$);木通苯乙醇苷 B 平均含量为 $433.59 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 1.3% ($n=6$),结果表明本方法的重复性良好。

2.4.4 回收率试验 精密称取供试品(厂家 D,批号 220913,绿原酸含量 $574.47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,木通苯乙醇苷 B 含量 $433.59 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 0.1 g,共 6 份,分别精密加入“2.2.1”项下的回收率考察溶液(绿原酸浓度 $51.57 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,木通苯乙醇苷 B 浓度 $51.49 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.0 mL,照“2.2.2”项方法平行制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,分别计算绿原酸和木通苯乙醇苷 B 的平均回收率、RSD,结果见表 1。结果表明,两组分的加样回收率良好,本方法测定结果准确可靠。

2.4.5 检测限和定量限考察 取“2.2.1”项下的混合对照品溶液适量,稀释后进样,以信噪比 $S/N=3$ 时的溶液浓度计算方法的检测限(LOD),以信噪比 $S/N=10$ 时的溶液浓度计算方法的定量限(LOQ),结果绿原酸和木通苯乙醇苷 B 的 LOD 分别为 12.89 、 $12.87 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,LOQ 分别为 32.23 、 $32.18 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.4.6 稳定性试验 取“2.2.2”项下制备的供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录两组分峰面积。结果显示,绿原酸平均峰面积为 2.445,RSD 为 0.90% ($n=6$);木通苯乙醇苷 B 平均峰面积为 1.104,RSD 为 1.0% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 样品测定

取 4 家生产企业共 5 批次样品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,分别计算绿原酸和木通苯乙醇苷 B 的含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

野木瓜片是将药材野木瓜加水煎煮,浓缩干燥成干浸膏后加辅料压片而成,处方单一且制法简单。根据《中华人民共和国药典》2020 年版一部^[5] 收载的中药材野木瓜薄层色谱鉴别及含量测定项下的指标成分,选择木通苯乙醇苷 B 作为本试验的目标检测成分。同时,参考相关文献[6],增加绿原酸为指标成分,建立了同时测定野木瓜片中木通苯乙醇苷 B 和绿原酸的 HPLC 方法。

表 1 回收率试验结果

Tab. 1 The results of recovery test

组分 (compound)	编号 (No.)	称样量 (weight)/ g	组分含量 (content)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (measured)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
绿原酸 (chlorogenic acid)	1	0.102 0	2.34	2.06	4.51	105.22	105.9	1.4
	2	0.102 8	2.36		4.57	107.07		
	3	0.104 8	2.41		4.56	104.55		
	4	0.103 5	2.38		4.53	104.07		
	5	0.104 4	2.40		4.60	106.54		
	6	0.105 0	2.41		4.64	107.85		
木通苯乙醇苷 B (calceolarioside B)	1	0.102 0	1.77	2.06	3.85	100.85	100.3	1.1
	2	0.102 8	1.78		3.87	101.13		
	3	0.104 8	1.82		3.87	99.62		
	4	0.103 5	1.80		3.83	98.86		
	5	0.104 4	1.81		3.86	99.61		
	6	0.105 0	1.82		3.92	101.78		

表 2 样品含量测定结果/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab. 2 The results of content determination of samples

厂家 (manufacturer)	批号 (batch No.)	绿原酸 (chlorogenic acid)	木通苯乙醇苷 B (calceolarioside B)
A	220912	1.204	1.115
B	220801	0.329	0.102
C	221102	0.161	0.083
D	220913	0.602	0.507
	221110	0.683	0.352

3.2 提取条件的选择

提取溶剂分别比较了甲醇、50% 甲醇水和水的提取效果。实验发现甲醇对木通苯乙醇苷 B 的提取效率最高,而 50% 甲醇水对绿原酸的提取效率略高于甲醇。考虑到野木瓜片中木通苯乙醇苷 B 的含量低于绿原酸,故优先选择甲醇作为提取溶剂。进一步对提取方式(超声、回流)、提取时间(20、30、40、60 min)以及超声频率(28、35、53 kHz)等因素进行了考察。最终确定甲醇超声处理(功率 200 W,频率 35 kHz)40 min 为供试品提取条件。

3.3 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器分别对木通苯乙醇苷 B 和绿原酸对照品溶液在 190 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描。结果显示,木通苯乙醇苷 B 在 193.9 nm 和 327.1 nm 波长处有最大吸收,绿原酸在 217.6 nm 和 326.9 nm 波长处有最大吸收。两组分均在 327 nm 波长附近有最大吸收,同时空白溶剂和辅料在此波长处均无干扰,因此,最终确定检测波长为 327 nm。

4 结论

野木瓜片的现行标准简单且质控指标少,不能全面有效地反映出药品的真实质量情况。本研究建立了野木瓜片中 2 种指标成分的同时测定方法,结果准确、可靠且操作简单,对涉及 4 厂家的 5 批市售野木瓜片进行了含量测定。各厂家产品中木通苯乙醇苷 B 含量在 0.083 ~ 1.115 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,绿原酸含量在 0.161 ~ 1.204 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,质量差异较大。提示野木瓜片的质量标准亟待提高,以利于对药品质量进行更好的监督。

参考文献

- [1] 孙婷婷,刘炜. 野木瓜片联合苯妥英钠治疗三叉神经痛的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7):1394.
SUN TT, LIU W. Clinical study on Yemugua Tablets combined with phenytoin in treatment of trigeminal neuralgia [J]. Drugs Clin, 2020, 35(7):1394.
- [2] 于立,马忠金. 野木瓜片治疗急性特发性面神经炎的疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2016, 25(3):365.
YU L, MA ZJ. Observation of curative effect of caulis stauntoniae chinensis tablets on acute idiopathic facial neuritis [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2016, 25(3):365.
- [3] 张孝友,谭毓治,赵诗云. 野木瓜片镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 广东药学院学报, 1998, 14(3):195.
- [4] 何健民. 链霉素与野木瓜片结合治疗三叉神经痛[J]. 甘肃科技, 1998, 14(1):48.
- [5] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020:327.
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:327.
- [6] 李国强,周本宏,吴国秋,等. 野木瓜片中绿原酸的含量测定[J]. 中国当代医药, 2010, 17(10):114.
LI GQ, ZHOU BH, WU GQ, et al. Determination of chlorogenic acid in Caulis stauntoniae chinensis tablet [J]. China Mod Med, 2010, 17(10):114.

(收稿日期:2023-06-12)