doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.15.022

高效液相色谱法测定养阴合剂中哈巴俄苷含量*

丁家昱[1]，车坷科[1△]，申丽莎[2]，杨 堃[3]
（1. 重庆市人民医院·中国科学院大学重庆医院，重庆 400015；2. 重庆市中药研究院，重庆 400061；
3. 重庆市食品药品检验检测研究院，重庆 401121）

摘要：目的 建立测定养阴合剂中哈巴俄苷含量的高效液相色谱（HPLC）法。**方法** 色谱柱采用Waters SunFire C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈－0.1%磷酸溶液（55∶45，*V*/*V*），流速为1.2 mL/min，柱温为30 ℃，检测波长为280 nm，进样量为10 μL。**结果** 哈巴俄苷进样量在0.044 72～0.894 50 μg范围内与峰面积线性关系良好（r=0.999 9）；平均加样回收率为97.35%，*RSD*为0.44%（n=6）。**结论** 该方法简便快速，重复性好，可作为养阴合剂的质量控制方法。

关键词：高效液相色谱法；养阴合剂；哈巴俄苷；含量测定
中图分类号：R932；R284.1；R286.0 **文献标识码：**A **文章编号：**1006－4931(2020)15－0082－03

Content Determination of Harpagoside in Yangyin Mixture by HPLC

DING Jiayu[1], *CHE Keke*[1], *SHEN Lisha*[2], *YANG Kun*[3]
(*1. Chongqing General Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Chongqing, China 400015; 2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, China 400061; 3. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121*)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of harpagoside in Yangyin Mixture. **Methods** A Waters SunFire C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile－0.1% phosphoric acid (55∶45, *V*/*V*) at the flow rate of 1.2 mL/min. The column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was set at 280 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** Harpagoside showed good linear relationship with the peak area in the range of 0.044 72－0.894 5 μg (r=0.999 9). The average recovery was 97.35% with *RSD* of 0.44% (n=6). **Conclusion** This method is simple, rapid, and reproducible, which can be used for the quality control of Yangyin Mixture.

Key words: high performance liquid chromatography; Yangyin Mixture; harpagoside; content determination

养阴合剂为20世纪50年代重庆市人民医院耳鼻喉科老中医的祖传验方，由连翘、玄参、黄芩、地黄、麦冬、桔梗、大青叶7味药材经水煎煮提取制成，具有滋阴凉血、清热解毒功效，主要用于治疗咽炎、咽喉肿痛等症，效果良好。目前收载于重庆市食品监督管理局编制的2008年版《重庆市医疗机构制剂规范》，由于该药组分复杂，现有质量标准中仅收载有制法、性状和相对密度检查，以及合剂制剂通则检查，可控性较差，其质量标准有待提高、完善。方中玄参具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的功效，主要成分为哈巴苷和哈巴俄苷。参考文献[1－11]，本研究中建立了测定养阴合剂中玄参活性成分哈巴俄苷含量的高效液相色谱（HPLC）法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪（美国Waters公司）；BP211S型电子天平（北京赛多利斯仪器有限公司，精度为十万分之一）；Simplicity－185型超纯水机（美国Millipore公司）。

1.2 试药

哈巴俄苷对照品（中国食品药品检定研究院，批号为111730－201307，含量为97.1%）；养阴合剂（重庆市人民医院，批号分别为190410，190612，190813，规格为每瓶250 mL）；乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

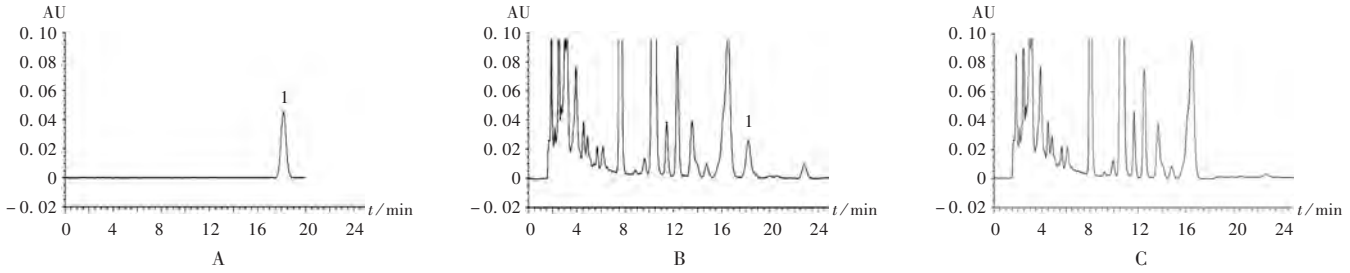
2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Waters SunFire C_{18}柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈－0.1%磷酸溶液（55∶45，*V*/*V*）；流速：1.2 mL/min；检测波长：280 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。在此色谱条件下，供试品溶液色谱中哈巴俄苷峰分离度大于1.5，理论板数大于15 000。色谱图见图1。

2.2 溶液制备

取哈巴俄苷对照品22.50 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品贮备液；精密量取对照品贮备液2 mL，置10 mL容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液。精密量取样品2 mL，置25 mL容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，静置1 h，取上清液，用微孔滤膜（0.45 μm）滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按处方比例和制备工艺制备缺玄参的阴性样品，按供试品制备方法制备阴性对照品溶液。

*基金项目：重庆市人民医院医学科技创新基金[2016MSXM06]。
第一作者：丁家昱，女，硕士研究生，主管药师，研究方向为医院制剂分析、药物新剂型的质量标准，（电子信箱）dingjiayu0929@163.com。
△通信作者：车坷科，男，博士研究生，副主任药师，研究方向为医院制剂、药物新剂型与新技术，（电子信箱）beayerchoe@163.com。



1. 哈巴俄苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

2.3 方法学考察

专属性试验：精密量取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL，按拟订色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，哈巴俄苷与其他杂质峰均能达到基线分离；阴性对照品溶液色谱图中，哈巴俄苷对照品溶液色谱峰相应位置上无色谱峰出现，表明杂质及阴性对照品溶液对测定均无干扰，方法专属性良好。色谱图见图 1。

线性关系考察：取哈巴俄苷对照品 23.03 mg，精密称定，依法制备对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 1，5，10，15，20 μL，按拟订色谱条件进样测定，记录峰面积。以进样量（X，μg）为横坐标、峰面积积分值（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y=2\times10^6X-11\,787$，$r=0.999\,9$（$n=5$）。结果表明，哈巴俄苷进样量在 0.044 72～0.894 50 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：精密吸取同一对照品溶液 10 μL，连续进样测定 5 次，记录峰面积。结果表明，哈巴俄苷峰面积的 *RSD* 为 0.72%（$n=5$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：按 2.2 项下方法制备供试品溶液，分别于 0，2，4，8，12 h 时进样 10 μL，记录峰面积，结果哈巴俄苷峰面积的 *RSD* 为 1.12%（$n=6$），表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。依法制备对照品溶液，分别于 0，1，2，3 d 时进样 10 μL，记录峰面积，结果哈巴俄苷峰面积的 *RSD* 为 0.91%（$n=6$），表明对照品溶液在室温下放置 3 d 稳定性良好。

重复性试验：取同一批（批号为 190612）样品适量，精密称定，混匀，依法制备供试品溶液，共 6 份，按拟订色谱条件进样测定哈巴俄苷的含量。结果平均含量为 0.394 1 mg/mL，*RSD* 为 1.63%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：精密量取已知含量的同一批（批号为 190612）样品 1 mL，共 6 份，分别置 25 mL 容量瓶中，精密加入上述对照品溶液（质量浓度为 0.044 72 mg/mL）10 mL，依法制备供试品溶液，进样测定，并计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 哈巴俄苷加样回收试验结果（$n=6$）

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
0.394 1	0.447 2	0.828 8	97.20		
0.394 1	0.447 2	0.827 0	96.80		
0.394 1	0.447 2	0.828 8	97.20	97.35	0.44
0.394 1	0.447 2	0.831 0	97.69		
0.394 1	0.447 2	0.828 8	97.20		
0.394 1	0.447 2	0.832 4	98.01		

2.4 样品含量测定

按拟订方法测定批号分别为 190410，190612，190813 的 3 批养阴合剂中哈巴俄苷的含量，结果分别为 0.344 9，0.394 1，0.352 7 mg/mL。

3 讨论

3.1 活性成分及色谱条件选择

2015 年版《中国药典（一部）》中玄参项下采用乙腈－0.03% 磷酸溶液梯度洗脱测定哈巴苷和哈巴俄苷的含量，检测波长为 210 nm。在此条件下，养阴合剂中杂质峰严重干扰哈巴苷色谱峰，使其未能得到有效分离。参考文献[1－10]，中药复方制剂中哈巴苷与哈巴俄苷/哈巴俄苷的含量测定均采用 HPLC 法，经试验考察，养阴合剂中哈巴苷色谱峰均受杂质峰干扰，不能有效分离。最终参考 2015 年版《中国药典（一部）》收载的玄麦甘桔系列制剂[11]（含片、胶囊、颗粒）中的含量（以哈巴俄苷为控制指标）测定方法，测定养阴合剂成分玄参中含量较高的哈巴俄苷以控制产品质量。色谱条件中流动相为乙腈－0.1% 磷酸溶液（55∶45，V/V），检测波长为 280 nm。结果显示，养阴合剂样品中哈巴俄苷色谱峰分离良好，阴性对照无干扰，检测灵敏度较高。经二极管阵列检测器（DAD）检测，样品中哈巴俄苷色谱峰与哈巴俄苷对照品色谱峰 UV 光谱一致。

3.2 溶剂选择

分别采用 50% 甲醇和甲醇稀释样品进行试验，发现两者均能起到醇沉作用，除去样品中部分杂质，静置 1 h 后取上清液经滤过后进样，色谱峰分离情况均较好，其中甲醇的杂质峰更少，故最终选择甲醇作为溶剂。

3.3 色谱柱考察

对 3 支不同品牌的色谱柱对供试品溶液进行了检测，结果样品中哈巴俄苷色谱峰均达到基线分离，哈巴