

HPLC 同时测定芎菊上清片中 5 种成分的含量

郝乘仪^{*}, 郭淑英, 冯波

(吉林医药学院 药学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:建立同时测定芎菊上清片中5种成分(绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法,DIKMA Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温30℃,流动相甲醇-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长分别为327 nm(绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷),210 nm(齐墩果酸、熊果酸),流速1 mL·min⁻¹。结果:芎菊上清片中的绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸5种成分的线性范围分别为0.03~0.6,0.011 4~0.228,0.025~0.5,0.1~2,0.03~0.6 μg,平均加样回收率分别为99.57%(RSD 1.3%),99.19%(RSD 0.8%),99.14%(RSD 0.6%),99.38%(RSD 1.2%),98.92%(RSD 0.7%)。结论:该法检测简便,稳定,可靠,是芎菊上清片质量控制的一个快捷有效的方法。

[关键词] 高效液相色谱; 芎菊上清片; 绿原酸; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 齐墩果酸; 熊果酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0074-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240074

Simultaneous Determination of Five Compounds in Xiongju Shangqing Tablets by HPLC

HAO Cheng-yi^{*}, GUO Shu-ying, FENG Bo

(College of Pharmacy, Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, berberine, baicalin, oleanolic acid and ursolic acid in Xiongju Shangqing tablets. **Method:** The separation was performed on a DIKMA Platisil ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with gradient elution using methanol and 0.1% H₃PO₄ aqueous solution as mobile phase. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the detection wavelengths were 327 nm for chlorogenic acid, berberine and baicalin; 210 nm for oleanolic acid and ursolic acid, respectively. **Result:** Linear ranges of chlorogenic acid, berberine, baicalin, oleanolic acid and ursolic acid were 0.03-0.6, 0.011 4-0.228, 0.025-0.5, 0.1-2, 0.03-0.6 μg, respectively. Their average recoveries were 99.57% (RSD 1.3%), 99.19% (RSD 0.8%), 99.14% (RSD 0.6%), 99.38% (RSD 1.2%), 98.92% (RSD 0.7%), respectively. **Conclusion:** The established HPLC method can be used to determine the contents of chlorogenic acid, berberine, baicalin, oleanolic acid and ursolic acid in Xiongju Shangqing tablets. The method can also be used as the standard for the quality control of Xiongju Shangqing tablets.

[Key words] HPLC; Xiongju Shangqing tablets; chlorogenic acid; berberine; baicalin; oleanolic acid; ursolic acid

芎菊上清片为2010年版《中国药典》收录品种,具有清热解毒、散风止痛的功效,其中菊花、黄芩、栀子为主药,绿原酸是菊花的主要有效成分,黄

芩苷、盐酸小檗碱是《中国药典》中测定的成分,齐墩果酸、熊果酸为栀子中的成分,具有清热解表的作用,与本药的作用类似。2010年版《中国药典》^[1]中

[收稿日期] 20140123(013)

[通讯作者] ^{*} 郝乘仪, 硕士, 实验师, 从事中药质量标准研究, Tel:0432-64560319, E-mail:yuleilei120@163.com

除了收录芎菊上清片,还收录了芎菊上清丸,但是两种制剂中规定测定的成分不同,芎菊上清片利用高效液相色谱测定的是黄芩苷的含量,而丸剂利用薄层色谱测定的是盐酸小檗碱的含量,测定的成分不同,这样就造成了同一种中药的不同剂型的含量测定不统一,不利于控制其制剂的质量。芎菊上清片为2010年版《中国药典》新收录的中药制剂,其质量标准还有完善的余地,为了更好的控制制剂质量,本文建立了高效液相色谱法同时测定其中5种成分的含量,这对于芎菊上清片的质量控制改进提供了一定的理论依据。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪,(包括SPD-20A紫外检测器,SIL-20A自动进样器,LC-solution工作站,日本岛津),Synergy185型超纯水仪(MILLIPORE)。

绿原酸(批号0900-200103)、盐酸小檗碱(批号110713-200923)、黄芩苷(批号110715-200514)、齐墩果酸(批号080921)、熊果酸(批号081019)对照品均购自中国食品药品鉴定研究院,芎菊上清片(承德燕峰药业有限责任公司,批号:12902003,11602003,10302003)。甲醇(色谱纯,Fisher公司),水为超纯化水,其他试剂均为分析纯。

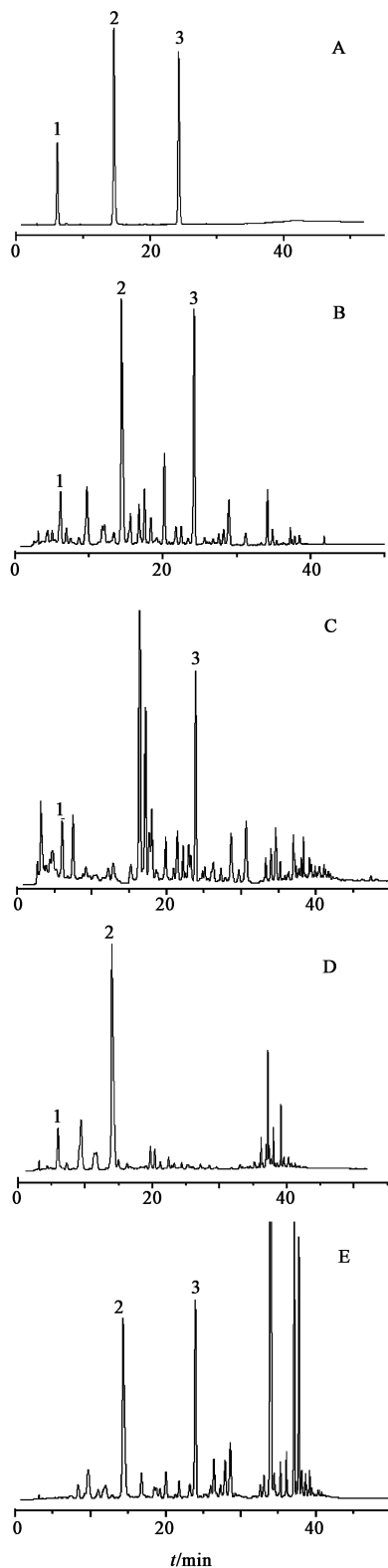
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸和熊果酸适量,精密称定,置于同一10 mL量瓶中,用甲醇定容并混匀,制成含绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸为0.03,0.011 4,0.025,0.1,0.03 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取芎菊上清片样品研细,过四号筛,准确称取0.28 g溶于20 mL甲醇中,称定质量,超声提取30 min取出、放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀、滤过。取续滤液经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

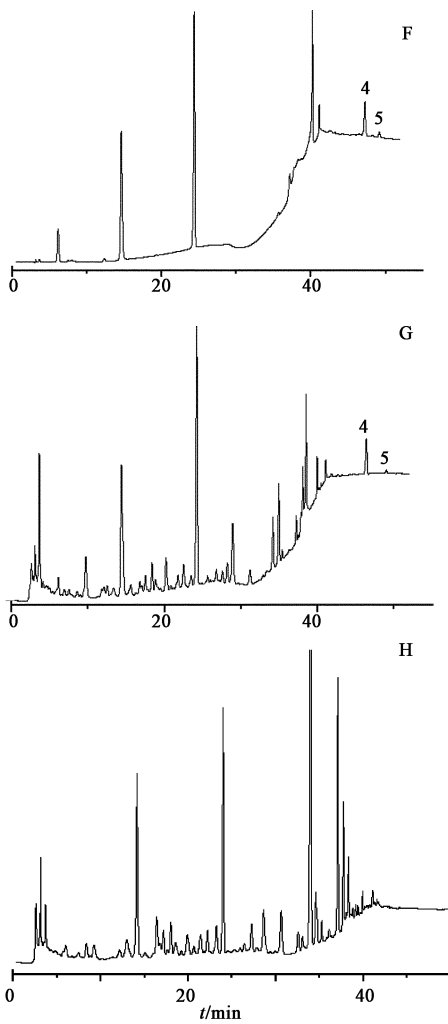
2.3 色谱条件 DIKMA Platisil ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,40% A;5~20 min,40%~60% A;20~25 min,60% A;25~35 min,60%~95% A;35~52 min,95% A),流速1 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长327 nm(绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷)、210 nm(齐墩果酸、熊果酸),进样10 μL,各待测组分分离度均大于1.5、理论塔板数均大于5 000。混合对照品溶液及样品溶液色谱图

见图1,2。



1. 绿原酸;2. 盐酸小檗碱;3. 黄芩苷
A. 混合对照品;B. 样品;C. 不含盐酸小檗碱的阴性样品;
D. 不含黄芩苷的阴性样品;E. 不含绿原酸的阴性样品

图1 芎菊上清片在327 nm HPLC



4. 齐墩果酸;5. 熊果酸

F. 混合对照品;G. 样品;H. 不含齐墩果酸和熊果酸的阴性样品

图2 芎菊上清片在210 nm处HPLC

2.4 线性考察 精密吸取混合对照品溶液1,5,8,10,15,20 μL分别注入HPLC以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标进行线性回归,得绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸的线性回归方程为 $Y = 97\ 099 X + 786$ ($r = 0.999\ 9$, $Y = 332\ 967 X - 2\ 892.3$ ($r = 1$), $Y = 97\ 347 X - 586.77$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 58\ 095 X + 6\ 164.6$ ($r = 0.999\ 9$); $Y = 4\ 794.9 X - 6\ 041$ ($r = 0.999\ 7$)。结果表明绿原

酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸分别在0.03~0.6,0.011 4~0.228,0.025~0.5,0.1~2,0.03~0.6 μg与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液,按2.4项下色谱条件连续进样6次,测得混合对照品中绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸的峰面积的RSD分别为0.5%,0.3%,0.2%,0.4%,0.4%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放置,分别于0,2,4,6,12,24 h进行测定,测得绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸的峰面积的RSD分别为0.8%,0.7%,0.6%,0.5%,0.9%,表明供试品溶液在常温下24 h内稳定。

2.7 重复性试验 取芎菊上清片样品,按2.2项下供试品溶液配制方法平行制备6份供试品溶液,以2.4项下色谱条件进行测定,得绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸的平均含量分别为2.498,1.709,11.907,3.151,2.27 mg·g⁻¹;RSD分别为0.74%,0.62%,0.68%,0.99%,1.2%。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量样品约0.14 g,分别加入一定量的绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸、熊果酸对照品,按照2.2项下方法制备溶液,进样10 μL进行测定,结果见表1。

表1 芎菊上清片中5种成分的加样回收率(n=6)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
绿原酸	0.350 6	0.300 0	0.649 3	99.57	1.30
盐酸小檗碱	0.239 9	0.200 0	0.438 3	99.19	0.81
黄芩苷	1.671 3	1.600 0	3.257 6	99.14	0.65
齐墩果酸	0.442 3	0.400 0	0.839 8	99.38	1.17
熊果酸	0.318 6	0.300 0	0.615 4	98.92	0.74

注:称样量均为0.140 4 g。

2.9 样品含量测定 取3批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.4项下进行分析,结果见表2。

表2 3批芎菊上清片样品中5种成分的含量测定(n=3)

批号	绿原酸		盐酸小檗碱		黄芩苷		齐墩果酸		熊果酸	
	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%
12902003	2.479	0.9	1.711	0.8	11.909	0.8	3.161	1.1	2.266	1.1
11602003	2.500	1.0	1.719	0.6	11.889	1.0	3.154	1.1	2.281	1.2
10302003	2.495	0.8	1.698	0.9	11.912	0.7	3.152	0.8	2.270	0.9

3 讨论

在流动相的选择上,已有报道此种中药制剂多是单组分测定^[2-8],多选择乙腈-水系统,本文考察了乙腈-水、甲醇-水,结果发现采用乙腈-水洗脱时,绿原酸和栀子苷分不开,其余的目标物的峰也多和杂质峰重合,这是由于各个目标物出峰过快,而此种中药含有10多味中药,成分复杂,难以分离。采用甲醇-水等度洗脱^[1],只有黄芩苷符合分离要求,所以考虑梯度洗脱。由于齐墩果酸和熊果酸出峰较晚,所以调高有机相比例,但是齐墩果酸和熊果酸的最大吸收波长在210 nm,基线漂移比较严重,所以在调高有机相比例时需要缓慢变化流动相的浓度。

在波长的选择上,绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、齐墩果酸和熊果酸最大吸收波长分别为327,345,278,210,210 nm。如果选择345,278 nm波长时,绿原酸分离不符合要求。选择327 nm时,虽然盐酸小檗碱、黄芩苷不是最大吸收波长,但是由于此两种成分含量较高,采用327 nm作为测定波长能够达到方法学考察的要求,故选择327 nm作为绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷的检测波长。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:676.
- [2] 王杰,魏超,吕曙华. HPLC法测定芎菊上清丸中绿原酸[J]. 中草药,2006,37(7):1032.
- [3] 冯波,施春玲,郝乘仪. RP-HPLC法测定芎菊上清丸中黄芩苷的含量[J]. 中草药,2009,40(5):743.
- [4] 王强,郝乘仪,冯波. RP-HPLC法测定芎菊上清丸中绿原酸的含量[J]. 吉林医药学院学报,2009,30(4):187.
- [5] 肖丽和,黄晓炜,熊英. 芎菊上清丸质量标准研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(4):322.
- [6] 邵凤香,梁艳. 高效液相色谱法测定芎菊上清丸中栀子苷含量[J]. 中国药业,2012,21(23):14.
- [7] 郝乘仪,郭淑英,冯波,等. RP-HPLC法同时测定芎菊上清丸中绿原酸 盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(1):193.
- [8] 王永伟,赵万顺,宋新波,等. 芎菊上清丸质量控制的研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(5):178.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于1995年10月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,242页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。