

HPLC 同时测定利胆片中绿原酸和黄芩苷的含量

孟姝^{1*}, 林玉莲², 都述虎³

(1. 盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224005; 2. 江苏省盐城药品检验所, 江苏 盐城 224002;
3. 南京医科大学, 南京 210029)

[摘要] 目的:建立了高效液相色谱法同时测定利胆片中黄芩苷和绿原酸含量的方法。方法:采用 Capcell Pak C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.3%磷酸水(B)梯度洗脱(0~8 min, 87% A; 8~9 min, 87%~67% A; 9~15 min, 67% A; 15~16 min, 67%~87% A; 16~20 min, 87% A),检测波长 315 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:利胆片中黄芩苷和绿原酸两种成分均达到基线分离,黄芩苷在 0.001 0~0.049 9 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) 线性关系良好,平均回收率 98.62% (RSD 1.1%);绿原酸在 0.005 3~0.026 7 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 3$) 线性关系良好,平均回收率 98.98% (RSD 0.3%)。结论:该测定方法快速,结果准确、可靠,可用于利胆片中黄芩苷和绿原酸的含量测定。

[关键词] 利胆片; 绿原酸; 黄芩苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0077-03

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2015100077

Simultaneous Determination of Baicalin and Chlorogenic Acid in Lidan Tablets by HPLC MENG Shu^{1*}, LIN Yu-lian², DU Shu-hu³ (1. *Yancheng Health Vocational Technical College, Yancheng 224005, China*; 2. *Yancheng Institute for Drug Control of Jiangsu Province, Yancheng 224002, China*; 3. *Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*)

[Abstract] **Objective:** The contents of baicalin and chlorogenic acid in Lidan tablets were simultaneously determined by HPLC. **Method:** The sample were separated on Capcell Pak C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column, which eluted with acetonitrile (A) and 0.3% phosphoric acid (B). The ratio of acetonitrile and water increased from 87:13 to 67:33 in 20 min with detected wavelength at 315 nm, flow rate at 1 mL·min⁻¹, column temperature at 30 °C and injection volume was 10 μL. **Result:** The result showed that two compounds reach the baseline separation, the linear range of baicalin and chlorogenic acid was 0.001 0-0.049 9 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) and 0.005 3-0.026 7 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 3$), respectively, and the average recovery of baicalin and chlorogenic acid was 98.62% (RSD 1.1%) and 98.98% (RSD 0.3%), respectively. **Conclusion:** The method is rapid, precise and practical that it can be used to determine the two components in Lidan tablets.

[Key words] Lidan tablets; chlorogenic acid; baicalin; HPLC

利胆片是《中国药典》(2010年版)一部新增增收的品种,也是江苏省基本药物目录增收的品种,主要由大黄、金银花、金钱草、木香、知母、大青叶、柴胡、白芍、黄芩、芒硝、茵陈 11 味药材组成,具有清热止痛的作用。用于胆道疾患,胁肋及胃腹部疼痛,按之痛剧,小便短黄,身热头痛,呕吐不食等^[1]。现行质量标准只有粉末显微鉴别和大青叶薄层鉴别^[2]等定性分析,没有对利胆片的主要指标成分进行定量分析。该处方中黄芩主要有清热燥湿、泻火解

毒^[2]的功效,多用于湿热痞满、泻痢、黄疸等。已有报道采用 HPLC 测定中药材和中药制剂中黄芩苷的含量^[3-5]。该处方中金银花主要功能是清热解毒、凉散风热^[2];茵陈主要功效是清湿热、退黄疸^[2],对其利胆退黄的贡献是很大的,且这两味药材中均含有绿原酸,已有报道采用 HPLC 测定中药材和成药制剂中绿原酸的含量^[6-8]。本课题通过高效液相色谱法同时测定利胆片中黄芩苷和绿原酸的含量,为利胆片的质量控制提供试验依据的补充。

[收稿日期] 20141110(005)

[通讯作者] * 孟姝, 讲师, 硕士, 从事药物分析研究, Tel:13770020681, E-mail:mengshu1985@163.com

1 材料

1200 系列 HPLC (美国 Agilent), BP211D 型 1/10万电子天平(德国 Sartorius)。

市售利胆片(B厂6个样品,3个批号(55100002,55100003,55090009);C厂,8个样品,5个批号080417,091009,091003,090902,100103);黄芩苷(批号110715-201016),绿原酸对照品(批号110753-200413)均购自中国食品药品检定研究院。所用试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

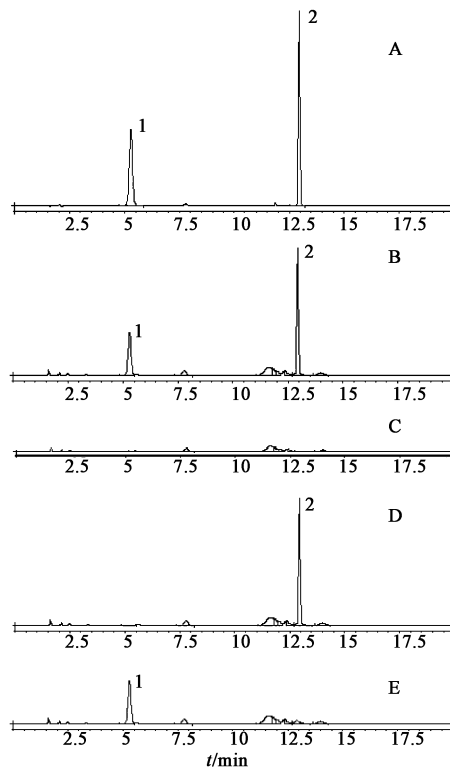
2.1 色谱条件 Capcell Pak C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.3%磷酸水(B)梯度洗脱(0~8 min, 87% A;8~9 min, 87%~67% A;9~15 min, 67% A;15~16 min, 67%~87% A;16~20 min, 87% A),柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹检测波长 315 nm,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 准确称取绿原酸对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得绿原酸对照品储备液;精密量取对照品储备溶液 1 mL,至 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.01 g·L⁻¹的绿原酸对照品溶液 A。另取黄芩苷对照品 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得黄芩苷对照品储备液;精密量取对照品储备溶液 1 mL,至 10 mL 的量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.01 g·L⁻¹黄芩苷对照品溶液 B。

2.3 供试品溶液制备 取本品 10 片除去包衣,研细,取约 0.35 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,准确加入 50% 乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 按处方和工艺分别制备不含金银花、茵陈、黄芩的阴性样品,再按 2.3 项下的方法制备阴性样品溶液。

2.5 专属性试验 分别精密量取对照品溶液、供试品溶液和 2 份阴性样品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,结果显示,供试品与混合对照品在 5.3 min 和 12.5 min 时均有相应的色谱峰,而其缺黄芩、金银花、茵陈的阴性对照品在此两处未出峰,缺金银花、茵陈的阴性对照品在 12.5 min 处有相应的色谱峰,但是在 5.3 min 处未出峰,而缺黄芩的阴性对照品在 5.3 min 处有相应的色谱峰,但是在 12.5 min 处未出峰。见图 1。



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 阴性对照(缺黄芩、金银花、茵陈);
D. 阴性对照(缺金银花、茵陈);E. 阴性对照(缺黄芩);1. 绿原酸;
2. 黄芩苷

图1 利胆片高效液相色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of Lidan tablet

2.6 线性关系考察 精密量取 2.2 项下绿原酸对照品储备溶液(0.106 8 g·L⁻¹) 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 分别置 10 mL 量瓶中,再精密量取黄芩苷对照品储备溶液(0.099 8 g·L⁻¹) 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 分别置上述对应的量瓶中,加 70% 甲醇稀释至刻度,照上述色谱条件测定,以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,绘制回归曲线 $Y_{\text{绿原酸}} = 2000.2X + 590.61 (r = 0.9993)$, $Y_{\text{黄芩苷}} = 1802.9X + 59.795 (r = 0.9999)$ 。结果表明绿原酸、黄芩苷分别在 0.005 3 ~ 0.026 7, 0.001 0 ~ 0.049 9 g·L⁻¹线性关系良好。

2.7 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,按照 2.1 项下色谱条件测定,绿原酸、黄芩苷对照品峰面积积分值的 RSD 分别为 0.9%, 0.3%。结果表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取上述供试品溶液在放置 0,3,6,12,24 h 后,分别进样,记录绿原酸和黄芩苷的峰面积。绿原酸、黄芩苷对照品峰面积积分值的 RSD 分别为 0.8%, 0.5%, 结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取利胆片(批号 091003)按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,测定。结果绿原酸、黄芩苷对照品质量分数分别为 0.65,0.78 mg/片, RSD 分别为 1.3%,1.9%,符合规定。

2.10 加样回收率试验 称取 6 份已测定的样品(批号 091003,平均片重为 0.232 2 g)约 0.2 g,按低、中、高 3 个浓度分别加入绿原酸对照品储备液 4,5,6 mL,黄芩苷对照品储备液 5.5,7,8.5 mL。按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 利胆片中两种成分的加样回收率测定

Table 1 Recovery test of Lidan tablet

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
绿原酸	0.201 5	0.564	0.452	1.009	98.45	98.98	0.3
	0.205 2	0.574	0.452	1.022	99.12		
	0.198 8	0.556	0.452	1.004	99.12		
	0.200 9	0.562	0.565	1.121	98.94		
	0.203 2	0.569	0.565	1.128	98.95		
	0.202 8	0.567	0.565	1.126	98.94		
	0.203 5	0.569	0.678	1.243	99.41		
	0.202 5	0.567	0.678	1.239	99.12		
	0.202 7	0.567	0.678	1.237	98.82		
	0.212 1	0.711	0.560	1.258	97.68		
0.211 8	0.711	0.560	1.256	97.32			
0.211 6	0.711	0.560	1.255	97.14			
0.212 5	0.714	0.700	1.402	98.28			
0.212 3	0.713	0.700	1.406	99.00			
0.212 7	0.714	0.700	1.408	99.14			
0.213 2	0.716	0.840	1.552	99.52			
0.212 2	0.713	0.840	1.548	99.40			
0.212 9	0.715	0.840	1.556	100.12			

2.11 样品含量测定 取不同批次的利胆片按 2.3 项下方法制备,以外标法计算结果 B 厂绿原酸含量分别为 0.30,0.56,0.30,0.32,0.32,0.31 mg/片,黄芩苷含量分别为 1.11,0.71,0.57,0.54,0.53,0.78 mg/片。C 厂绿原酸含量分别为 0.72,0.65,0.71,0.68,0.60,0.62,0.62,0.59 mg/片,黄芩苷含量分别为 0.91,0.78,0.60,0.75,0.74,0.78,0.76,0.85 mg/片。

3 讨论与小结

3.1 波长的选择 分别取黄芩苷和绿原酸对照品适量,在 200~400 nm 波长扫描,结果发现黄芩苷在 215,245,278,315 nm,绿原酸在 218,244,333 nm 处均有较大吸收。215,218 nm 存在末端吸收;244,245 nm 均是谷峰处的小馒头峰,用于测定也不稳

定;经过比较分析,发现 315 nm 是黄芩苷的最大吸收波长,对绿原酸也有较好的吸收。

3.2 提取方法的选择 本试验曾采用 50%,25% 甲醇,50%,20% 乙醇等作为提取溶剂对样品中黄芩苷和绿原酸进行提取,结果表明以 50% 的甲醇为溶剂的超声方法提取效率高。

3.3 流动相的选择 采用不同比例的乙腈-0.05% 磷酸水,甲醇-0.05% 磷酸水,乙腈-0.3% 磷酸水作为流动相梯度洗脱,根据分离情况及出峰时间等综合分析,选择乙腈-0.3% 磷酸水进行梯度洗脱,分离度较好。

3.4 不同生产厂家利胆片中绿原酸和黄芩苷的含量分析 不同厂家生产的利胆片中绿原酸和黄芩苷的含量差异较大。C 厂生产的利胆片平均含绿原酸 0.65 mg/片,该企业生产的所有批号的利胆片含量比较平稳,说明 C 厂对方剂中金银花和茵陈的投料及其质量控制的比较好。B 厂生产的利胆片平均含绿原酸只有 0.35 mg/片,B 厂不同批次的利胆片中绿原酸的含量差异也比较大,很可能是和那一阶段购进的原药材质量有关。

利胆片中黄芩苷含量差异也很大,平均含量最高含黄芩苷 1.11 mg/片;最低含黄芩苷只有 0.53 mg/片,且均为 B 厂生产。这与每批的投料量及原药材的质量都有着直接的关联。C 厂生产的利胆片中黄芩苷的平均含量为 0.77 mg/片,与 B 厂的差异也比较大,说明除了各生产厂家的生产工艺影响黄芩苷的含量,中药材原料的质量及其投料量对其影响也很显著。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂. 第一册[S]. 1989:88.
- [2] 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,2010:16.
- [3] 匡菊香,刘远文,张倩茹,等. 舌莲胃康胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房,2012,23(3):248-250.
- [4] 金美花,刘汇. 高效液相色谱法测定小儿治哮喘片中黄芩苷含量[J]. 中国药业,2011,20(23):28-29.
- [5] 龙月红,邢朝斌,劳凤云,等. 高效液相色谱测定不同生境黄芩中的黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):97-100.
- [6] 何建雄,赖小平,魏刚,等. HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):48-50.

[责任编辑 顾雪竹]