

HPLC同时测定黄栀花口服液中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量

周蓬^{1*}, 马帅¹, 张叶², 刘宏明^{1,3}

(1. 淄博市食品药品检验所, 山东 淄博 255086; 2. 淄博职业学院, 山东 淄博 255314;
3. 淄博市药品不良反应监测中心, 山东 淄博 255000)

[摘要] **目的:**建立同时测定黄栀花口服液(金银花、栀子、黄芩等)中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素与汉黄芩素含量的方法。**方法:**采用HPLC法, Agilent SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.1%的磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 流速1.0 mL·min⁻¹; 检测波长(0~13 min, 327 nm; 13~15 min, 238 nm; 15~45 min, 280 nm)。**结果:**根据回归方程, 5种成分线性范围分别为绿原酸 $4.096 \times 10^{-3} \sim 1.2288 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ ($r=0.9993$); 栀子苷 $4.204 \times 10^{-3} \sim 1.2612 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ ($r=0.9999$); 黄芩苷 $0.1175 \sim 3.525 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$); 黄芩素 $4.152 \times 10^{-3} \sim 1.2456 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ ($r=0.9999$); 汉黄芩素 $4.256 \times 10^{-4} \sim 1.2768 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ ($r=0.9994$); 平均回收率分别为绿原酸99.31%, RSD 0.8%, 栀子苷99.62%, RSD 0.5%, 黄芩苷99.94%, RSD 1.3%, 黄芩素99.64%, RSD 0.8%, 汉黄芩素100.1%, RSD 1.2%。**结论:**该方法操作简便、准确、重复性好, 可用于黄栀花口服液的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱; 黄栀花口服液; 绿原酸; 栀子苷; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0064-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160064

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Geniposide, Baicalin, Baicalein and Wogonin in Huangzhihua Oral Liquid by HPLC ZHOU Peng^{1*}, MA Shuai¹, ZHANG Ye², LIU Hong-ming^{1,3} (1. Zibo Food and Drug Inspection Testing Center, Zibo 255086, China 2. Zibo Vocational Institute, Zibo 255314, China; 3. Zibo Center for ADR Monitoring, Zibo 255000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneously determining chlorogenic acid, geniposide, baicalin, baicalein and wogonin in Huangzhihua oral liquid (Lonicerae Japonicae Flos, Gardeniae Fructus, Scutellariae Radix, et al). **Method:** The determination was performed by HPLC on Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The mobile phase was acetonitrile (solvent A) -0.1% phosphoric acid (solvent B). The detection wavelength was respectively set at 327 nm in the range of 0-13 min, 238 nm in the range of 13-15 min and 280 nm in the range of 15-45 min. **Result:** According to the regression equation, the linear range for chlorogenic acid was $4.096 \times 10^{-3} - 1.2288 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ ($r=0.9993$); the linear range for geniposide was $4.204 \times 10^{-3} - 1.2612 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ ($r=0.9999$); the linear range for baicalin was $0.1175 - 3.525 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$); the linear range for baicalein was $4.152 \times 10^{-3} - 1.2456 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ ($r=0.9999$); and the linear range for wogonin was $0.4256 \times 10^{-3} - 1.2768 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ ($r=0.9994$). The average recoveries of the above five components were 99.31% (RSD 0.8%); 99.62% (RSD 0.5%); 99.94% (RSD 1.3%); 99.64% (RSD 0.8%); 100.1% (RSD 1.2%) respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and highly reproducible and so can be applied in the quality control of Huangzhihua oral liquid

[Key words] HPLC; Huangzhihua oral liquid; chlorogenic acid; geniposide; baicalin; baicalein; wogonin

黄栀花口服液是由黄芩、栀子、金银花、大黄4味中药提取加工制成。具有清肺泻热的功效。用于小儿外感热证,小儿上呼吸道感染引起的发热、头痛等。该制剂处方中黄芩苷、栀子苷、绿原酸等多种成分都具有清热解毒的功效。现行质量标准,只测定黄芩苷一种成分的含量,难以全面有效反应制剂质量。建立一种同时测定多种成分的方法,符合中药多成分协同作用的特点,是该中药制剂质量控制的新的探索。越来越多的研究表明,中药多指标成分的检测在中药质量控制中是非常重要的和必要的^[1-3]。为了更好地控制黄栀花口服液的质量,本实验选择绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素为检测对象,建立了同时测定黄栀花口服液中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素5种成分含量的HPLC测定方法。为全面的控制该制剂质量提供了依据。

1 仪器与试剂

LC-20 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 LC-20ATVP 泵, SPD-20AVP 紫外检测器, CTO-20A 柱温箱, SIL-20A 自动进样器)。AE 240 型天平(瑞士 Mettler)。

绿原酸(批号 110753-201314), 栀子苷(批号 110749-201115), 黄芩苷(批号 110715-201016), 黄芩素(批号 111595-200503), 汉黄芩素(批号 111514-200403)对照品, 中国食品药品检定研究院提供;黄栀花口服液为市售(吉林黄栀花药业有限公司,批号 20130508, 20130703, 20130705), 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 按梯度洗脱(0~6 min, 10% A; 6~12 min, 10%~20% A; 12~13 min, 20%~30% A; 13~25 min, 30%~65% A; 25~35 min, 65%~70% A; 36~45 min, 10% A); 检测波长 0~13 min, 327 nm; 13~15 min, 238 nm; 15~45 min, 280 nm。在此色谱条件下, 理论塔板数按绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素计算均不低于4 000, 分离度均>1.5。

2.2 溶液的制备

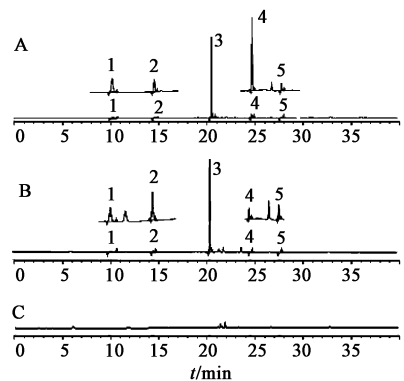
2.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对照品适量, 加甲醇分别制成绿原酸(0.204 8 g·L⁻¹), 栀子苷(0.210 2 g·L⁻¹), 黄芩苷(0.293 7 g·L⁻¹), 黄芩素(0.207 6 g·

L⁻¹), 汉黄芩素(0.021 28 g·L⁻¹) 对照品贮备液。再分别精密量取绿原酸对照品储备液 1 mL, 栀子苷对照品贮备液 1 mL, 黄芩苷对照品贮备液 20 mL, 黄芩素对照品储备液 1 mL, 汉黄芩素对照品储备液 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇制成 4.096, 4.204, 0.1175, 4.152, 4.256 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇约 80 mL, 超声处理 10 min, 放冷, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方中药味的比例分别制成不含金银花、黄芩与栀子的阴性样品, 然后按 2.2.2 项下方法分别制成金银花阴性样品溶液、栀子阴性样品溶液、黄芩阴性样品溶液。

精密吸取混合对照品溶液供试品溶液及阴性供试品溶液各 5 μL, 分别注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果表明, 供试品色谱中与绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品保留时间相应的色谱峰, 阴性供试品溶液无干扰。见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; C. 阴性样品; 1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 黄芩苷; 4. 黄芩素; 5. 汉黄芩素

图1 黄栀花口服液 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of Huangzhihua oral liquid

2.3 线性关系试验 分别精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 20, 30 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 进样量(μg)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程。将各对照品储备液进行一系列稀释, 注入液相色谱仪, 测定, 以信噪比 3:1 为检测限, 结果见表 1。

2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL, 重复进样 6 次, 测定峰面积。结果, 绿原酸 RSD 0.2%, 栀子苷 RSD 0.2%, 黄芩苷 RSD 0.2%, 黄芩素 RSD 0.3%, 汉黄芩素 RSD 0.7%。表明仪器精

表 1 5 个化合物线性关系试验

Table 1 The linear results of five compounds

化合物	线性方程	线性范围/mg	r	检测限/ng
绿原酸	$Y = 2\ 721\ 797X + 3\ 312$	4.096 ~ 122.88	0.999 3	0.06
栀子苷	$Y = 1\ 598\ 204X - 103$	4.204 ~ 126.12	0.999 9	0.63
黄芩苷	$Y = 3\ 655\ 879X - 21\ 504$	117.5 ~ 3525	0.999 9	0.03
黄芩素	$Y = 6\ 106\ 907X - 854$	4.152 ~ 124.56	0.999 9	0.93
汉黄芩素	$Y = 6\ 769\ 482X + 631$	0.425 6 ~ 12.768	0.999 7	0.51

密度良好。

2.5 重复性试验 取同一批黄栀花口服液(批号 20130508)样品 6 份,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,并进行测定。结果样品中绿原酸质量分数 $0.408\ 7\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 0.9%; 栀子苷质量分数 $0.998\ 7\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 1.1%; 黄芩苷质量分数 $14.729\ 7\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 0.5%; 黄芩素质量分数 $0.157\ 9\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 1.2%; 汉黄芩素质量分数 $0.080\ 43\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 1.3%。表明本方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 将 2.5 项下第一份供试品溶液,置室温下分别放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, 各进样 $5\ \mu\text{L}$ 测定峰面积。结果样品中绿原酸 RSD 0.9%, 栀子苷 RSD 1.1%, 黄芩苷 RSD 1.0%, 黄芩素 RSD 1.2%, 汉黄芩素 RSD 1.4%。表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的同一批号(批号 20130508)样品适量,精密量取 6 份,每份 0.5 mL,分别精密加入绿原酸对照品贮备液 1 mL, 栀子苷对照品贮备液 2 mL, 黄芩苷对照品 6.28 mg, 黄芩素对照品贮备液 0.5 mL, 汉黄芩素对照品贮备液 3 mL,按 2.2.2 项下方法,制备供试品溶液,进样量均为 $5\ \mu\text{L}$,测定峰面积,计算,结果见表 2。

2.8 样品的测定 取黄栀花口服液样品 3 批,按 2.2.2 项下方法提取,进行含量测定。结果见表 3。

3 讨论

中药复方制剂的特点是多途径,多靶点发挥疗效,配伍中讲究“相须相使”,即臣药、使药能协助君药发挥更好的疗效。处方中黄芩作为君药,含有的黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素具有抗菌、抗病毒^[4-5]的作用,栀子、金银花作为臣药和使药,栀子苷具有抗炎、解热^[6]的功效,绿原酸亦有抗菌、抗病毒及免疫调节^[7]的作用,这几种成分均为该制剂的有效成分。从 3 批样品的测定结果发现,原质量标准中列出的黄芩苷的含量,数据较为稳定,而其他的几个成分含量差异较大,所以有必要建立实验方法,来全面

表 2 黄栀花口服液中 5 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery tests of Huangzhihua oral liquid

名称	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
绿原酸	0.204 4	0.204 8	0.409 1	99.95	99.31	0.8
	0.204 4	0.204 8	0.405 8	98.34		
	0.204 4	0.204 8	0.408 2	99.51		
	0.204 4	0.204 8	0.407 5	99.17		
	0.204 4	0.204 8	0.406 5	98.68		
	0.204 4	0.204 8	0.409 6	100.2		
栀子苷	0.499 4	0.420 4	0.920 8	100.2	99.62	0.5
	0.499 4	0.420 4	0.916 9	99.31		
	0.499 4	0.420 4	0.920 1	100.1		
	0.499 4	0.420 4	0.918 6	99.71		
	0.499 4	0.420 4	0.917 7	99.50		
	0.499 4	0.420 4	0.915 2	98.91		
黄芩苷	7.364 8	6.28	13.632 6	99.81	99.94	1.3
	7.364 8	6.16	13.515 9	99.86		
	7.364 8	6.23	13.628 9	100.5		
	7.364 8	6.11	13.592 6	101.9		
	7.364 8	6.09	13.416 2	99.37		
	7.364 8	6.17	13.424 7	98.22		
黄芩素	0.078 95	0.103 8	0.183 4	100.6	99.64	0.8
	0.078 95	0.103 8	0.182 2	99.47		
	0.078 95	0.103 8	0.183 1	100.3		
	0.078 95	0.103 8	0.182 6	99.86		
	0.078 95	0.103 8	0.181 6	98.89		
	0.078 95	0.103 8	0.181 4	98.70		
汉黄芩素	0.046 25	0.063 84	0.109 2	98.61	100.1	1.2
	0.046 25	0.063 84	0.109 8	99.55		
	0.046 25	0.063 84	0.110 5	100.6		
	0.046 25	0.063 84	0.111 3	101.9		
	0.046 25	0.063 84	0.110 4	100.5		
	0.046 25	0.063 84	0.109 7	99.39		

表3 黄栀花口服液样品5种成分含量测定(n=3)

Table 3 Results of content determination of samples(n=3) g·L⁻¹

批号	绿原酸	栀子苷	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
20130508	0.408 7	0.998 7	14.729 7	0.157 9	0.080 43
20130703	0.121 1	0.878 8	14.775 7	0.148 1	0.105 3
20130705	0.179 4	0.687 8	14.297 5	0.134 9	0.101 1

反应制剂质量。本实验采用 HPLC 同时测定绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量。本方法简便、准确、重复性好、精密度高,可用于该制剂的质量控制。

本品的剂型为口服液,含有糖类等水溶性的成分,在甲醇中易析出沉淀,影响实验结果,样品中分别加入 30% 甲醇,50% 甲醇,70% 甲醇等溶剂,比较实验结果,50% 甲醇提取效果较好。取本品适量,加甲醇超声处理 10,20,30 min,发现超声 10 min,提取已经较为完全,与其他较长时间超声处理的结果差别不大。故选择 50% 甲醇作为提取溶剂,超声 10 min 作为样品的提取方法。

吸收波长的选择参照《中国药典》2010 年版一部^[8],绿原酸的吸收波长为 327 nm,栀子苷的吸收波长为 238 nm,黄芩苷的吸收波长为 280 nm。采用切换波长的方法满足各个测定成分在最大吸收波长处测定,提高检测的灵敏度,减少误差。

参考相关文献^[9-11],经过实验分析,进行了色谱条件的摸索与优化,最终确定了本实验中的乙腈-0.1% 的磷酸溶液梯度洗脱的方法,在良好分离的情

况下,出峰时间适中。

[参考文献]

[1] 张萍,杨燕,鄢丹,等.多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J].中华中医药杂志,2010,25(1):120-123.

[2] 李靖,刘汉清,孙小芬.丹参注射液多成分含量测定和指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(4):553-556.

[3] 施建南,杨奕樱,刘艳洁.多波长反相高效液相色谱法对止痛方中几种有效成分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):136-138.

[4] 刘效恭,张李.黄芩素的药理学研究概况[J].中国药理学通报,2001,17(6):711-713.

[5] 文敏,李雪,付守廷.黄芩苷药理作用研究新进展[J].沈阳药科大学学报,2008,25(2):158-162.

[6] 那莎,郭国田.栀子及其有效成分药理研究进展[J].中国中医药信息杂志,2005,12(1):90-92.

[7] 刘颖,郭明晔,白根本.绿原酸的研究进展[J].中药材,2012,35(7):1180-1185.

[8] 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,2010:205-282.

[9] 徐强.HPLC法同时测定茵栀黄分散片、颗粒、胶囊中绿原酸、栀子苷与黄芩苷[J].中成药,2013,35(5):967-970.

[10] 安益强,汤道权,印晓星,等.HPLC法同时测定双黄连颗粒中9种成分[J].中草药,2012,43(1):91-93.

[11] 杜英峰,张兰桐,靳怡然,等.多波长 RP-HPLC 法测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸和连翘苷[J].中成药,2009,31(9):1368-1371.

[责任编辑 顾雪竹]