

# HPLC 同时测定茵栀黄颗粒中 4 个环烯醚萜苷类成分

范建伟, 李艳芳, 闫光军, 刘武占\*, 苏瑞强, 赵志全, 王永刚  
(鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室,  
山东省中药制药新技术重点实验室, 山东 临沂 276006)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC 同时测定茵栀黄颗粒中栀子苷、山栀苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯和京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷 4 个环烯醚萜苷类成分含量的方法。方法: Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-0.05% 三氟乙酸溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 5%~6% A; 15~23 min, 6%~10% A; 23~35 min, 10%~22% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 238 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C。结果: 栀子苷、山栀苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯和京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷进样量分别在 0.334~3.344, 0.041 5~0.415, 0.046 6~0.466, 0.093 1~0.931  $\mu$ g 与峰面积呈良好线性关系, 平均回收率分别为 97.3%, 99.6%, 97.6%, 99.2%, RSD 分别为 1.6%, 2.7%, 2.3%, 2.2%。结论: 该分析方法简便、准确, 可用于完善茵栀黄颗粒的定量分析方法, 以提高该制剂的质量标准。

**[关键词]** 茵栀黄颗粒; 栀子苷; 山栀苷; 去乙酰车叶草苷酸甲酯; 京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷; 含量测定; 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(2013)20-0046-04

**[doi]** 10.11653/syfyj2013200046

## Simultaneous Determination of Four Iridoid Glycosides in Yinzhihuang Granules by HPLC

FAN Jian-wei, LI Yan-fang, YAN Guang-jun, LIU Wu-zhan\*,  
SU Rui-qiang, ZHAO Zhi-quan, WANG Yong-gang

(Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd, State Key Laboratory of Generic Pharmaceutical  
Technology for Chinese Medicine, Shandong Province Key Laboratory of New  
Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine, Linyi 276006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of four iridoid glycosides (geniposide, shanzhiside, deacetyl asperulosidic acid methyl ester and genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside) in Yinzhihuang granules. **Method:** Chromatographic conditions were as follows: Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase of acetonitrile (A) -0.05% trifluoroacetic acid solution (B) with gradient elution program (0-15 min, 5% -6% A; 15-23 min, 6% -10% A; 23-35 min, 10% -22% A), flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength 238 nm, column temperature at 30  $^{\circ}$ C. **Result:** The linear ranges of geniposide, shanzhiside, deacetyl asperulosidic acid methyl ester and genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside were 0.334 4-3.344 0, 0.041 5-0.415 2, 0.046 6-0.466 4, 0.093 1-0.931 2  $\mu$ g, respectively; Average recoveries of these four ingredients were 97.3% (RSD 1.6%), 99.6% (RSD 2.7%), 97.6% (RSD 2.3%) and 99.2% (RSD 2.2%), respectively. **Conclusion:** This method was convenient and accurate, it could be used to improve quality standard of Yinzhihuang granules.

**[收稿日期]** 20130326(003)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展 973 项目(2012CB724001)

**[第一作者]** 范建伟, 硕士, 从事中药新药研发与质量控制, Tel:13573947373, E-mail:vanvitamin@163.com

**[通讯作者]** \* 刘武占, 学士, 从事中药新药研发与质量控制, Tel:0539-8336639, E-mail:liuwuzhan@163.com

**[Key words]** Yinzhihuang granules; geniposide; shanzhiside; deacetyl asperulosidic acid methyl ester; genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside; determination; HPLC

茵栀黄颗粒收录于2012年版《国家基本药物目录》,由茵陈、栀子、黄芩、金银花4味药材的提取物制成,具清热解毒、利湿退黄之功效,具有退黄疸、降低谷丙转氨酶的药理活性,临床用于湿热毒邪内蕴所致急性、慢性肝炎和重症肝炎(I型)及其他型重症肝炎的综合治疗<sup>[1]</sup>。方中栀子提取物主要含有栀子苷、山栀苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷等环烯醚萜苷类成分,具有保肝、利胆等药理活性<sup>[2]</sup>,与该制剂功能主治相一致<sup>[3]</sup>。目前标准仅对该栀子提取物中栀子苷的含量进行测定,故本实验采用HPLC同时测定茵栀黄颗粒中栀子苷、山栀苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯和京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷4个环烯醚萜苷类成分的含量,为更全面控制该制剂的质量提供参考依据。

## 1 材料

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),AG285型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号110749-201115),山栀苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷对照品(自制,经HPLC面积归一化法测定纯度均>98%),茵栀黄颗粒(规格3g/袋,鲁南厚普制药有限公司,批号分别为00912024,00912026,00912030),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** Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈(A)-0.05%三氟乙酸溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 5%~6% A; 15~23 min, 6%~10% A; 23~35 min, 10%~22% A),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长238 nm,柱温30  $^{\circ}$ C。

### 2.2 溶液的制备

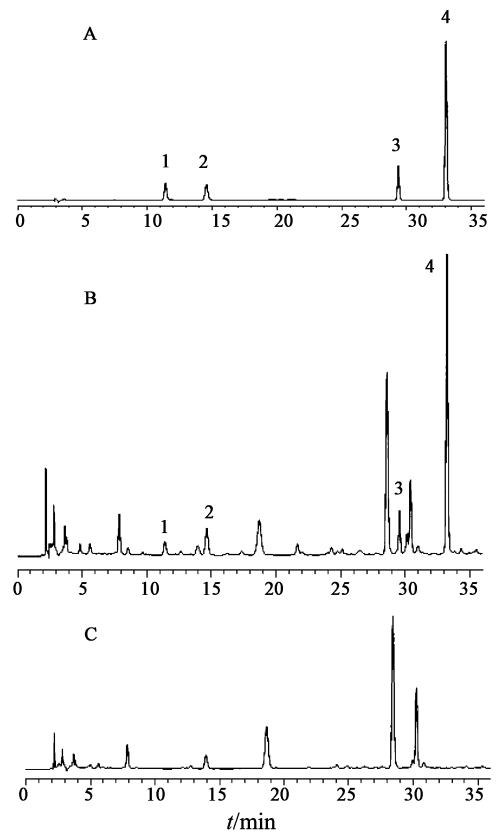
**2.2.1 对照品溶液** 精密称取栀子苷、山栀苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷对照品适量,分别置于50 mL量瓶中,加30%甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得各对照品储备液。依次精密吸取各储备液适量于同一50 mL量瓶中,用30%甲醇定容至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为334.4, 41.52, 46.64, 93.12 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取茵栀黄颗粒2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇10 mL,称

定质量,水浴加热30 min,取出,放冷,用50%甲醇补足失重,摇匀,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液适量,经0.45  $\mu$ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.2.3 阴性样品溶液** 取缺栀子提取物的阴性样品适量,按2.2.2项下方法操作,即得。

**2.3 系统适应性及专属性试验** 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各5  $\mu$ L,按2.1项下色谱条件进行测定,结果4个指标成分与相邻色谱峰的分度均>1.5,对称因子均在0.90~1.10,理论塔板数以各色谱峰计均>20 000,茵栀黄颗粒中其他组分不干扰4个成分的测定,方法专属性良好,见图1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品;

1. 山栀苷; 2. 去乙酰车叶草苷酸甲酯;

3. 京尼平-1- $\beta$ -D-龙胆二糖苷; 4. 栀子苷

图1 茵栀黄颗粒HPLC

**2.4 线性关系考察** 精密吸取2.2.1项下混合对照品溶液1, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ L, 分别注入液相色谱仪, 按2.1项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得栀子苷、山栀苷、去乙酰车叶草苷酸

甲酯、京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷回归方程分别为  $Y = 1\ 365X - 3.997$  ( $r = 0.999\ 9$ ),  $Y = 1\ 446X + 1.670$  ( $r = 0.999\ 5$ ),  $Y = 1\ 438X + 0.950\ 9$  ( $r = 0.999\ 8$ ),  $Y = 1\ 006X + 0.592\ 3$  ( $r = 0.999\ 7$ ), 线性范围分别为 0.334 4 ~ 3.344, 0.041 5 ~ 0.415, 0.046 6 ~ 0.466, 0.093 1 ~ 0.931 μg。

**2.5 精密度试验** 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 5 μL, 按 2.1 项下色谱条件于同一天和 3 d 内重复进样, 测定梔子苷、山梔苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯和京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷的峰面积, 结果各成分峰面积的日内精密度 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 0.11%, 0.43%, 0.33%, 0.25%, 日间精密度 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 0.14%, 0.41%, 0.52%, 0.26%。

**2.6 重复性试验** 取同一批样品 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行

测定, 结果梔子苷、山梔苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯及京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷的平均质量分数分别为 1.736, 0.102 3, 0.234 8, 0.349 6 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.1%, 1.6%, 1.1%, 1.2%, 表明该方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液适量, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进行测定, 测得梔子苷、山梔苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯和京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.4%, 1.0%, 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的茵梔黄颗粒 1.0 g, 共 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液 4.0 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 4 个环烯醚萜苷类成分加样回收率试验

成分	称样量/g	样品中质量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
梔子苷	1.001 8	1.739 1	1.337 6	3.021 7	95.89	97.3	1.6
	1.000 6	1.737 0		3.065 5	99.32		
	1.001 3	1.738 3		3.057 3	98.61		
	1.010 7	1.754 6		3.032 3	95.52		
	1.011 0	1.755 1		3.049 0	96.73		
	1.001 1	1.737 9		3.046 9	97.86		
山梔苷	1.001 8	0.102 5	0.166 1	0.271 6	101.81	99.6	2.7
	1.000 6	0.102 4		0.269 2	100.42		
	1.001 3	0.102 4		0.261 7	95.91		
	1.010 7	0.103 4		0.264 8	97.17		
	1.011 0	0.103 4		0.274 3	102.89		
	1.001 1	0.102 4		0.267 0	99.10		
去乙酰车叶草苷酸甲酯	1.001 8	0.235 2	0.186 6	0.413 6	95.61	97.6	2.3
	1.000 6	0.234 9		0.421 3	99.89		
	1.001 3	0.235 2		0.422 9	100.59		
	1.010 7	0.237 3		0.417 4	96.52		
	1.011 0	0.237 4		0.419 0	97.32		
	1.001 1	0.235 0		0.413 0	95.39		
京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷	1.001 8	0.350 2	0.372 5	0.727 2	101.21	99.2	2.2
	1.000 6	0.349 8		0.722 2	99.97		
	1.001 3	0.350 0		0.719 1	99.09		
	1.010 7	0.353 3		0.720 6	98.60		
	1.011 0	0.353 4		0.707 9	95.17		
	1.001 1	0.350 0		0.726 6	101.10		

**2.9 样品测定** 称取3批茵栀黄颗粒适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,结果栀子苷质量分数分别为2.03,2.00,1.74 mg·g<sup>-1</sup>,山栀苷分别为0.112,0.108,0.102 mg·g<sup>-1</sup>,去乙酰车叶草苷酸甲酯分别为0.259,0.251,0.235 mg·g<sup>-1</sup>,京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷依次为0.411,0.413,0.350 mg·g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

选择乙腈-0.05%三氟乙酸系统作为流动相<sup>[4]</sup>,比较了该系统下等度洗脱与梯度洗脱2种方式,结果等度洗脱分析时间较长,且各成分分离不佳;梯度洗脱35 min内可完成对栀子苷等4个成分的分,分离度良好且峰型较佳,故选择梯度洗脱方式。

以栀子苷含量为指标,分别考察了甲醇、50%甲醇、乙醇3种提取溶剂,结果表明50%甲醇提取效果最好,与文献报道相一致<sup>[5]</sup>。以栀子苷等4个成分为指标,考察了超声提取和水浴提取2种方式,结果超声提取因制剂所用辅料(糊精)影响了4个成分的溶出,而水浴则未受影响;同时考察了水浴提取时间,结果发现30 min即可保证4个成分提取完全。

茵栀黄颗粒系中药复方制剂,成分复杂。相关文献仅就制剂中某1个成分进行定量检测,如栀子苷、黄芩苷、木樨草苷等<sup>[6-8]</sup>,亦有文献同时测定了茵栀黄颗粒中黄芩苷、栀子苷、绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素等7种成分含量<sup>[9]</sup>,能较为有效地用于茵栀黄颗粒的质量控制。本实验首次采用

HPLC同时对茵栀黄颗粒中4个环烯醚萜苷类成分进行测定,显示该方法稳定可靠,可对茵栀黄颗粒的多指标成分测定进行补充。

### [参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局药品标准[S]. WS-1017(Z-264)-2002-2011Z,2012.
- [2] 张海燕, 邹伟魁, 李芳, 等. 栀子保肝利胆作用及其肝毒性研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2610.
- [3] 李贵海, 朱建伟, 吴丽丽. 茵栀黄颗粒的保肝作用研究[J]. 中药材, 2001, 24(5): 353.
- [4] 刘武占, 范建伟, 高艳红, 等. HPLC同时测定栀子中8个环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16): 2417.
- [5] 雷朋, 刘韶, 李新中, 等. 对《中国药典》2005年版一部栀子药材中栀子苷含量测定方法的探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 225.
- [6] 席文胜, 张艳玲. 二元梯度洗脱反相高效液相色谱法测定茵栀黄颗粒中栀子苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(2): 148.
- [7] 徐晓光, 程仁刚, 于晓蕾. HPLC法测定茵栀黄颗粒中黄芩苷的含量[J]. 齐鲁药事, 2004, 23(6): 29.
- [8] 王瑞芬. HPLC测定茵栀黄颗粒中木樨草苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(3): 389.
- [9] 陈永刚, 马传学, 黄成琼, 等. 高效液相色谱-波长切换法同时测定茵栀黄颗粒中的7种有效成分[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(11): 894.

[责任编辑 全燕]