

# HPLC法同时测定疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的含量

李 昂<sup>1\*</sup>, 阚红玉<sup>2</sup>, 张 因<sup>1</sup>(1.天津市儿童医院,天津 300134;2.天士力制药集团股份有限公司,天津 300193)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3872-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.43

**摘要** 目的:建立同时测定疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为SAGA Tri-Sal C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.5%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为320 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的检测质量浓度线性范围分别为2.463~240.5 μg/ml( $r=0.999\ 9$ )、6.577~642.3 μg/ml( $r=0.999\ 8$ )、1.708~166.8 μg/ml( $r=0.999\ 8$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.8%;加样回收率分别为97.02%~102.40%(RSD=1.9%, $n=6$ )、96.55%~100.20%(RSD=1.6%, $n=6$ )、97.51%~100.70%(RSD=1.2%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便,结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷含量的同时测定。

**关键词** 疏表灵颗粒;绿原酸;橙皮苷;黄芩苷;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Hesperidin and Baicalin in Shubiaoling Granule by HPLC

LI Ang<sup>1</sup>, KAN Hongyu<sup>2</sup>, ZHANG Nan<sup>1</sup>(1.Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China; 2.Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, hesperidin and baicalin in Shubiaoling granule. METHODS: HPLC was performed on the column of SAGA Tri-Sal C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile - 0.5% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 320 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 2.463-240.5 μg/ml for chlorogenic acid ( $r=0.999\ 9$ ), 6.577-642.3 μg/ml for hesperidin ( $r=0.999\ 8$ ) and 1.708-166.8 μg/ml for baicalin ( $r=0.999\ 8$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.8%; recoveries were 97.02% -102.40% (RSD=1.9%,  $n=6$ ), 96.55% -100.20% (RSD=1.6%,  $n=6$ ) and 97.51% -100.70% (RSD=1.2%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate with high sensitivity and good reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of chlorogenic acid, hesperidin and baicalin in Shubiaoling granule.

**KEYWORDS** Shubiaoling granule; Chlorogenic acid; Hesperidin; Baicalin; HPLC

取时色谱峰杂质较少,分离度更佳。因此,本试验选用50%乙醇为提取溶剂。

### 3.2 流动相的选择

文献报道采用HPLC法测定中药复方制剂中芍药苷和丹皮酚的流动相系统有甲醇-1.5%冰乙酸<sup>[4]</sup>、甲醇-0.05%磷酸<sup>[5]</sup>、乙腈-0.1%磷酸<sup>[6-8]</sup>、乙腈-1%冰乙酸<sup>[9]</sup>、乙腈-水<sup>[10]</sup>、甲醇-水等,本试验比较了几种流动相的检测情况,结果以乙腈-0.1%磷酸为流动相时,样品中芍药苷和丹皮酚的色谱峰能达到基线分离,峰形良好,阴性对照无干扰;而采用其他流动相,样品分离度均不够理想。因此,本试验选用乙腈-0.1%磷酸为流动相。

综上所述,本方法操作简便、重复性好、灵敏度高,可用于同时测定跌打丸中芍药苷和丹皮酚的含量。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1 590、172.
- [2] 杨琪伟,杨莉,熊爱珍,等.赤芍和白芍抗炎作用的UPLC-MS代谢组学初步研究[J].中国中药杂志,2011,36(3):694.
- [3] 孟庆焕,祖元刚,王化.牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的优

化提取工艺[J].安徽农业科学,2015,43(7):68.

- [4] 赵佳丽,肖国栋,徐宏祥,等.HPLC法测定咽炎片中的黄芩苷、芍药苷和丹皮酚[J].华西药学杂志,2014,29(4):476.
- [5] 李向阳,屠万倩.HPLC法测定六味地黄丸中丹皮酚、芍药苷和乌苏酸[J].中成药,2012,34(2):277.
- [6] 毛晓敏,张晓波,陈小青,等.HPLC法测定十二乌鸡白凤丸中芍药苷、阿魏酸和丹皮酚含量[J].中成药,2008,30(5):678.
- [7] 冯发青,王恩源,伍庆,等.HPLC法同时测定麦味地黄胶囊中马钱苷、芍药苷和丹皮酚含量[J].中成药,2012,34(12):2 339.
- [8] 李智慧,吴素香,石森林,等.HPLC法测定不同厂家桂枝茯苓丸中丹皮酚及芍药苷[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(9):121.
- [9] 徐灿辉,何维为,何云飞.HPLC法测定六味地黄胶囊毛蕊花糖苷、马钱苷和丹皮酚[J].药物评价研究,2014,37(3):257.
- [10] 杜蓉,张孟佑.HPLC法测定加味逍遥丸中芍药苷与甘草苷的含量[J].中国药房,2015,26(18):2 571.

\*主管药师,硕士。研究方向:药物制剂。电话:022-87199759。  
E-mail:andyli100@sina.com

(收稿日期:2015-11-13 修回日期:2016-07-07)

(编辑:刘 柳)

疏表灵颗粒由淡豆豉、天花粉、陈皮、金银花、玄参、白茅根、黄芩等20种药味组成,具有散风解表、解肌透疹、清热解毒的作用,适用于小儿呼吸道感染、流感、麻疹、风疹、幼儿急疹等,临床应用广泛,疗效显著<sup>[1]</sup>。疏表灵颗粒为天津市儿童医院的院内制剂,其质量标准采用天津市卫生和计划生育委员会批准的院内制剂标准,标准中不包括含量测定项。为更有效地控制疏表灵颗粒的内在质量,本试验通过参考相关文献<sup>[2-5]</sup>,选取绿原酸、橙皮苷、黄芩苷3种成分作为质量控制指标,建立了同时测定3种成分含量的高效液相色谱法(HPLC),并进行了方法学验证。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC20A系统,包含紫外双波长检测器、自动进样器、柱温箱、LC solution色谱工作站(日本岛津公司);AX205十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司);BP121S万分之一天平(德国塞多利斯公司)。

### 1.2 药品与试剂

疏表灵颗粒(天津市儿童医院制剂室提供,批号:20150402、20150601);绿原酸对照品(批号:110753-201314,纯度:96.3%)、橙皮苷对照品(批号:110721-201115,纯度:96.3%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201318,纯度:93.3%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:SAGA Tri-Sal C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 3 μm);流动相:乙腈-0.5%磷酸,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:320 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	0.5%磷酸,%	乙腈,%
0~5	5~8	95~92
5~10	8~10	92~90
10~15	10~15	90~85
15~25	15~22	85~78
25~35	22~40	78~60

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取绿原酸、橙皮苷、黄芩苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇稀释溶解,制成每1 ml含绿原酸15.54 μg、橙皮苷41.44 μg、黄芩苷10.77 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取疏表灵颗粒约1.0 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,加50%甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:120 W,频率:40 kHz,下同)30 min,取出后放冷,加50%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 以缺金银花、陈皮、黄芩的原方,按样品制备工艺进行制备,得缺金银花、陈皮、黄芩的阴性制剂。取阴性制剂1 g,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以绿原酸、橙皮苷、黄芩苷峰计均

>4 000;保留时间分别为14.208 min、30.003 min、33.315 min。阴性对照色谱图中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷对应的保留时间处无其他色谱峰出现,表明其他成分对测定无干扰。

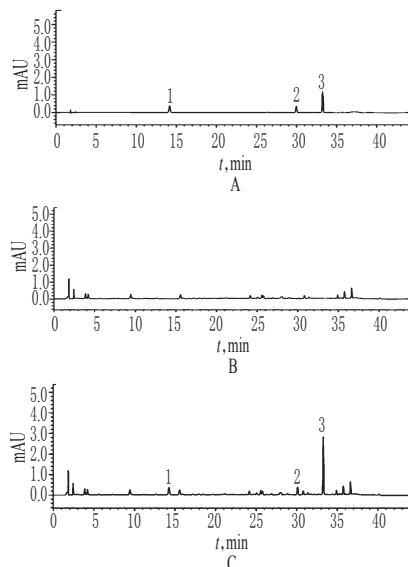


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.阴性对照;C.供试品;1.绿原酸;2.橙皮苷;3.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.negative control; C.test sample; 1.chlorogenic acid; 2.hesperidin; 3.baicalin

### 2.4 线性关系考察

精密称取绿原酸、橙皮苷、黄芩苷对照品适量,置于100 ml量瓶中,加50%甲醇稀释溶解,制成每1 ml含绿原酸242.8 μg/ml、橙皮苷647.5 μg/ml、黄芩苷168.3 μg/ml的混合对照品贮备液,再逐步稀释制成绿原酸质量浓度为240.5、96.20、38.48、15.39、6.157、2.463 μg/ml;橙皮苷质量浓度为642.3、256.9、102.8、41.11、16.44、6.577 μg/ml;黄芩苷质量浓度为166.8、66.72、26.69、10.68、4.270、1.708 μg/ml的系列对照品混合溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
绿原酸	$y=27\ 684x-9\ 021$	2.463~240.5	0.999 9
橙皮苷	$y=7\ 968.2x-21\ 989$	6.577~642.3	0.999 8
黄芩苷	$y=194\ 702x+174\ 549$	1.708~166.8	0.999 8

### 2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按照“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸、橙皮苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为1.6%、1.5%、1.1%(n=6),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

称取样品(批号:20150601)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、9、12、16、20、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、橙皮苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为1.5%、1.8%、1.5%(n=9),表明供试品溶液在室温放置24 h稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

称取同一批样品(批号:20150601)适量,按“2.2.2”项下方

法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的平均含量分别为0.748 8、1.957 9、0.433 9 mg/g, RSD分别为1.4%、1.2%、1.2% (n=6),表明本方法重复性较好。

## 2.8 加样回收率试验

取同批样品6份(批号:20150601),每份约0.5 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,分别加入绿原酸质量浓度为96.20 μg/ml、橙皮苷质量浓度为256.9 μg/ml、黄芩苷质量浓度为66.72 μg/ml的混合对照品溶液3.5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.502 2	0.376 0	0.336 7	0.702 7	97.02	99.51	1.9
	0.505 8	0.378 7	0.336 7	0.714 7	99.78		
	0.498 8	0.373 5	0.336 7	0.718 2	102.40		
	0.495 6	0.371 1	0.336 7	0.706 5	99.61		
	0.498 7	0.373 4	0.336 7	0.711 7	100.50		
	0.508 0	0.380 4	0.336 7	0.709 8	97.83		
橙皮苷	0.502 2	0.983 3	0.899 2	1.866 4	98.21	98.47	1.6
	0.505 8	0.990 3	0.899 2	1.858 5	96.55		
	0.498 8	0.976 6	0.899 2	1.877 8	100.20		
	0.495 6	0.970 3	0.899 2	1.859 8	98.92		
	0.498 7	0.976 4	0.899 2	1.875 5	99.99		
	0.508 0	0.994 6	0.899 2	1.866 2	96.93		
黄芩苷	0.502 2	0.217 9	0.233 5	0.445 6	97.51	99.28	1.2
	0.505 8	0.219 5	0.233 5	0.451 6	99.41		
	0.498 8	0.216 4	0.233 5	0.450 3	100.20		
	0.495 6	0.215 0	0.233 5	0.447 7	99.64		
	0.498 7	0.216 4	0.233 5	0.445 9	98.29		
	0.508 0	0.220 4	0.233 5	0.455 5	100.70		

## 2.9 样品含量测定

取样品(批号:20150402、20150601)约1.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=2, mg/g)

Tab 4 Results of contents determination of sample (n=2, mg/g)

制剂批号	绿原酸	橙皮苷	黄芩苷
20150402	0.705 7	1.885 2	0.461 3
	0.700 4	1.890 3	0.452 2
20150601	0.753 6	1.978 0	0.436 4
	0.748 9	1.957 8	0.442 5

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的选择

3.1.1 流动相考察 参考2015版《中国药典》记载的金银花、陈皮、黄芩药材的流动相条件<sup>[6]</sup>,本试验考察了流动相为甲醇-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-水及乙腈-磷酸溶液4种系统。结果发现,在乙腈-磷酸溶液系统下,出峰最快。在此基础上,笔者又进一步考察了乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.5%磷酸及乙腈-1%

磷酸的色谱效果,结果发现在乙腈-0.5%磷酸条件下,色谱峰峰形最好。由此,确定本试验流动相为乙腈-0.5%磷酸。同时,笔者还对流动相的梯度洗脱比例进行了系统的考察优化,保证了绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的分离度。

3.1.2 检测波长的选择 参考2015年版《中国药典》记载的金银花、陈皮、黄芩药材的检测波长<sup>[6]</sup>,并参照相关文献<sup>[7-9]</sup>,本试验最终确定检测波长为320 nm。

3.1.3 色谱柱选择 笔者比较了Agilent-ZORBAX C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)与SAGA Tri-Sal C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 3 μm)色谱柱的分离行为,在保证绿原酸、橙皮苷、黄芩苷分离度的基础上,后者出峰更快、时间更短。因此,最终选择SAGA Tri-Sal C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 3 μm)为色谱柱。

### 3.2 样品处理方法的选择

笔者比较了加热回流和超声处理两种方法。结果显示,超声法的提取效果与加热回流法相当,由于超声处理的操作更简单,因此本试验最终采用超声法处理样品。此外,笔者还对超声溶剂甲醇的质量分数(100%、70%、50%、30%)、溶剂用量(30 ml、50 ml、100 ml)以及超声时间(20 min、30 min、40 min)的提取效果进行了考察,最终确定采用50 ml 50%甲醇、超声提取30 min的样品处理条件。

综上所述,本方法操作简便,结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的含量测定。

### 参考文献

- [1] 刘丽,蒋志宏,褚婕.清降丸和疏表灵的体外抗菌活性试验[J].职业与健康,2004,20(11):135.
- [2] 姚帅,杨跃华,刘岩,等.RP-HPLC同时测定大卫颗粒中绿原酸、黄芩苷、连翘苷、黄芩素和汉黄芩素的含量[J].药物分析杂志,2012,32(7):1 253.
- [3] 张囡,钱宇坤,李维超.病毒合剂(II)中黄芩苷、绿原酸和橙皮苷的含量测定[J].天津药学,2015,3:13.
- [4] 史宏妍,潘成学.HPLC法同时测定小儿热速清颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量[J].中国药房,2012,23(16):1 531.
- [5] 陈国宝,宋桂萍,杨弃尘.HPLC法同时测定双黄连片中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷的含量[J].中国药房,2011,22(48):4 594.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:233.
- [7] 钱星文,何雁,罗晓健,等.高效液相色谱法测定藿香正气制剂中橙皮苷的含量[J].江西中医学院学报,2005,17(3):38.
- [8] 杨宏静,方应权.高效液相色谱法测定五味消毒饮中绿原酸含量[J].现代医药卫生,2014,30(1):21.
- [9] 李运景,陈钧茂,张锦兴,等.HPLC测定清肺合剂中黄芩苷的含量[J].药品评价,2007,4(4):313.

(收稿日期:2015-09-12 修回日期:2016-08-04)

(编辑:申琳琳)