

RP-HPLC法同时测定抗菌消炎片中7种成分的含量^Δ

许丽丽*,王玉团#,徐丽华,林永强,牛艳(山东省食品药品检验研究院,济南 250101)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2981-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.28

摘要 目的:建立同时测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量的方法。方法:采用反向高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Extend C₁₈,流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长分别为327 nm(绿原酸)、280 nm(黄芩苷)和450 nm(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚检测进样量线性范围分别为0.209 4~4.188 0 μg($r=0.999\ 9$)、0.372 0~7.440 0 μg($r=0.999\ 9$)、0.006 3~0.126 2 μg($r=0.999\ 9$)、0.011 6~0.232 2 μg($r=0.999\ 9$)、0.005 3~0.106 0 μg($r=0.999\ 8$)、0.012 8~0.256 4 μg($r=0.999\ 9$)、0.016 5~0.330 3 μg($r=0.999\ 8$);定量限分别为2.01、1.93、0.76、1.25、1.24、0.53、1.53 ng,检测限分别为0.98、0.65、0.25、0.42、0.41、0.18、0.52 ng;加样回收率分别为98.41%~100.40%(RSD=0.76%, $n=9$)、96.17%~100.10%(RSD=1.58%, $n=9$)、96.11%~100.10%(RSD=1.33%, $n=9$)、96.29%~100.80%(RSD=1.85%, $n=9$)、96.88%~100.10%(RSD=1.22%, $n=9$)、97.81%~101.90%(RSD=1.64%, $n=9$)、96.46%~101.30%(RSD=1.85%, $n=9$)。结论:该方法准确可靠,重复性好,可用于抗菌消炎片中7种成分含量的同时测定。

关键词 抗菌消炎片;反向高效液相色谱法;绿原酸;黄芩苷;芦荟大黄素;大黄酸;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚;含量测定

Simultaneous Determination of 7 Components in Kangjun Xiaoyan Tablets by RP-HPLC

XU Lili, WANG Yutuan, XU Lihua, LIN Yongqiang, NIU Yan(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin, aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcione in Kangjun xiaoyan tablets. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Extend C₁₈ with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 327 nm (chlorogenic acid), 280 nm (baicalin) and 450 nm (aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcione). The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of chlorogenic acid, baicalin, aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcione were 0.209 4-4.188 0 μg($r=0.999\ 9$), 0.372 0-7.440 0 μg($r=0.999\ 9$), 0.006 3-0.126 2 μg($r=0.999\ 9$), 0.011 6-0.232 2 μg($r=0.999\ 9$), 0.005 3-0.106 0 μg($r=0.999\ 8$), 0.012 8-0.256 4 μg($r=0.999\ 9$), 0.016 5-0.330 3 μg($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantitation were 2.01, 1.93, 0.76, 1.25, 1.24, 0.53 and 1.53 ng; the limits of detection were 0.98, 0.65, 0.25, 0.42, 0.41, 0.18 and 0.52 ng, respectively. The recoveries were 98.41% -100.40% (RSD=0.76%, $n=9$), 96.17% -100.10% (RSD=1.58%, $n=9$), 96.11% -100.10% (RSD=1.33%, $n=9$), 96.29% -100.80% (RSD=1.85%, $n=9$), 96.88% -100.10% (RSD=1.22%, $n=9$), 97.81% -101.90% (RSD=1.64%, $n=9$), 96.46% -101.30% (RSD=1.85%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and reproducible. It can be used for simultaneous determination of 7 components in Kangjun xiaoyan tablets.

KEYWORDS Kangjun xiaoyan tablets; RP-HPLC; Chlorogenic acid; Baicalin; Aloe emodin; Rhein; Emodin; Chrysophanol; Physcione; Content determination

抗菌消炎片系由金银花、黄芩、大黄、百部、大青叶、知母和金钱草七味药组成的复方制剂,有清热、泻火、解毒之功效,常用于治疗风热感冒、咽喉肿痛、实火牙痛^[1]等症。方中金银花具有清热解毒、凉散风热的作用,其有效成分为绿原酸;黄芩具有清热燥湿、泻火解毒、止血的作用,其有效成分为黄芩苷、黄芩素^[2-3];大黄具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、活血祛瘀之功效,其有效成

分为芦荟大黄素、大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚等^[4-5]。该制剂的现行质量标准中仅有常规检查项,无含量控制项,不能有效控制该制剂的内在质量。

鉴于此,笔者采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立了同时测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚^[6-9]含量的方法,以期为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2998二极管阵列检测器和Empower工作站(美国Waters公司);CP225D型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);BK-600C型超声波清

Δ 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2013HM074)

* 主管药师,硕士。研究方向:药品质量控制。电话:0531-81216527。E-mail:hshpiti@163.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药品质量控制。电话:0531-81216522。E-mail:wytuan@163.com

洗仪(济南巴克超声波科技有限公司,功率:500 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

抗菌消炎片(薄膜衣片,A厂,批号:20151101、20151102、20151103,规格:每片相当于原药材0.5 g;糖衣片,B厂,批号:150501、150603、150606,规格:每片相当于原药材0.5 g;糖衣片,C厂,批号:215001079、215004060、215005062,规格:每片相当于原药材0.5 g);绿原酸对照品(批号:110753-201314,纯度:96.6%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201117,纯度:91.7%)、芦荟大黄素对照品(批号:110795-201308,纯度:97.8%)、大黄酸对照品(批号:110757-200206,纯度:97.8%)、大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度:98.5%)、大黄酚对照品(批号:110796-201319,纯度:99.6%)、大黄素甲醚对照品(批号:110758-200610,纯度98.6%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Extend C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.5%磷酸溶液,梯度洗脱(0~5 min,5% A,5~20 min,5%→9% A,20~64 min,9%→21% A,64~80 min,21%→30% A,80~95 min,30%→80% A,95~100 min,80%→90% A,100~105 min,90%→100% A);流速:1.0 mL/min;检测波长分别:327 nm(绿原酸)、280 nm(黄芩苷)和450 nm(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚);柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芦荟大黄素对照品6.45 mg、大黄酸对照品11.61 mg、大黄素对照品5.30 mg、大黄酚对照品12.87 mg和大黄素甲醚对照品16.75 mg,置于同一200 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得大黄5种蒽醌类成分的混合对照品贮备液。精密称取绿原酸对照品10.84 mg、黄芩苷对照品20.28 mg,再精密量取上述混合对照品贮备液10 mL,置于同一100 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚质量浓度分别为104.7、186.0、3.154 1、5.805 0、2.650 0、6.409 3、8.257 8 μg/mL的混合对照品溶液。

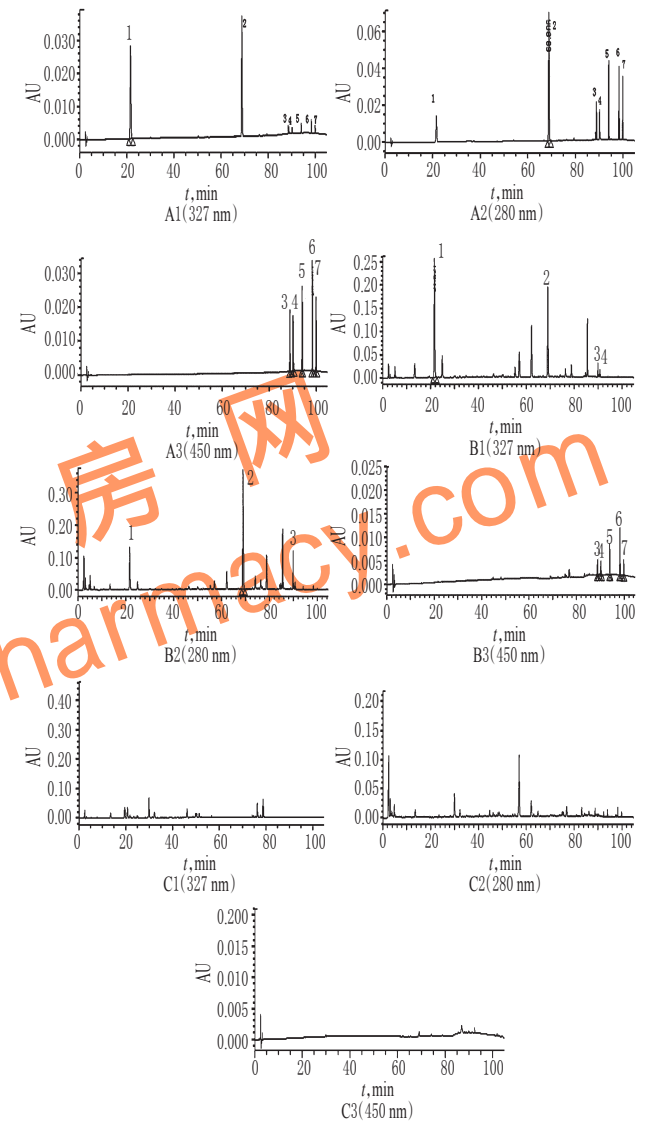
2.2.2 供试品溶液 取样品(糖衣片除去包衣,薄膜衣片除去薄膜)研细,取约0.50 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇溶液25 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,加70%甲醇溶液补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例,制备缺大黄、黄芩和金银花的阴性样品,再按“2.2.2”项

下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”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,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;理论板数以绿原酸峰计为208 75,保留时间为21.485 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A1~3.混合对照品;B1~3.供试品;C1~3.阴性对照;1.绿原酸;2.黄芩苷;3.芦荟大黄素;4.大黄酸;5.大黄素;6.大黄酚;7.大黄素甲醚

A1-3.mixed control; B1-3.test sample; C1-3.negative control; 1.chlorogenic acid; 2.baicalin; 3.aloe emodin; 4.rhein; 5.emodin; 6.chrysofanol; 7. physcione

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液2、5、10、15、20、40 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)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1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
绿原酸	$y=2\ 963\ 167x-33\ 491$	0.999 9	0.209 4~4.188 0
黄芩苷	$y=3\ 299\ 889x+70\ 686$	0.999 9	0.372 0~7.440 0
芦荟大黄素	$y=1\ 663\ 606x-266$	0.999 9	0.006 3~0.126 2
大黄酸	$y=1\ 516\ 975x+344$	0.999 9	0.011 6~0.232 2
大黄素	$y=2\ 162\ 563x-2\ 026$	0.999 8	0.005 3~0.106 0
大黄酚	$y=1\ 817\ 266x-1\ 280$	0.999 9	0.012 8~0.256 4
大黄素甲醚	$y=94\ 028x-3\ 889$	0.999 8	0.016 5~0.330 3

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,结果见表2。

表2 LOQ与LOD测定结果(ng)

Tab 2 Determination results of LOQ and LOD(ng)

待测成分	LOQ	LOD
绿原酸	2.01	0.98
黄芩苷	1.93	0.65
芦荟大黄素	0.76	0.25
大黄酸	1.25	0.42
大黄素	1.24	0.41
大黄酚	0.53	0.18
大黄素甲醚	1.53	0.52

2.6 精密度的试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.50%、1.62%、0.78%、0.28%、1.09%、0.92%、1.12%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20151102)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、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、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.75%、0.30%、0.28%、0.39%、1.07%、0.11%、1.78%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20151102)适量,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,记录峰面积并计算含量。结果,绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.24%、0.96%、1.84%、1.67%、1.45%、0.79%、1.18%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:20151102)0.25 g,精密称定,各置于具塞锥形瓶中,分别精密加入低、中、高质量的待测成分对照品,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($n=9$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.250 4	1 563	1 196	2 755	99.67	99.39	0.76
	0.251 2	1 568	1 196	2 745	98.41		
	0.253 3	1 581	1 196	2 759	98.49		
	0.249 8	1 559	1 495	3 054	100.00		
	0.252 5	1 576	1 495	3 061	99.33		
	0.254 1	1 586	1 495	3 058	98.46		
	0.250 9	1 566	1 794	3 368	100.40		
	0.251 2	1 568	1 794	3 360	99.89		
	0.252 1	1 574	1 794	3 365	99.83		
黄芩苷	0.250 4	3 075	2 727	5 800	99.93	98.76	1.58
	0.251 2	3 085	2 727	5 815	100.10		
	0.253 3	3 111	2 727	5 811	99.01		
	0.249 8	3 068	3 030	6 025	97.59		
	0.252 5	3 101	3 030	6 028	96.60		
	0.254 1	3 121	3 030	6 035	96.17		
	0.250 9	3 081	3 334	6 413	99.94		
	0.251 2	3 085	3 334	6 405	99.58		
	0.252 1	3 096	3 334	6 428	99.94		
芦荟大黄素	0.250 4	33.71	30.25	63.36	98.02	97.91	1.33
	0.251 2	33.82	30.25	63.29	97.42		
	0.253 3	34.11	30.25	63.58	97.42		
	0.249 8	33.63	37.50	70.29	97.76		
	0.252 5	34.00	37.50	70.12	96.32		
	0.254 1	34.21	37.50	70.25	96.11		
	0.250 9	33.78	45.12	78.96	100.10		
	0.251 2	33.82	45.12	78.56	99.16		
	0.252 1	33.94	45.12	78.54	98.85		
大黄酸	0.250 4	55.89	44.64	100.23	99.33	98.47	1.85
	0.251 2	56.06	44.64	99.56	97.45		
	0.253 3	56.53	44.64	99.58	96.44		
	0.249 8	55.75	55.80	109.48	96.29		
	0.252 5	56.35	55.80	110.12	96.36		
	0.254 1	56.71	55.80	112.25	99.53		
	0.250 9	56.00	60.12	116.25	100.20		
	0.251 2	56.06	60.12	116.68	100.80		
	0.252 1	56.26	60.12	116.28	99.83		
大黄素	0.250 4	58.23	49.65	107.36	98.95	98.35	1.22
	0.251 2	58.42	49.65	106.55	96.94		
	0.253 3	58.91	49.65	107.01	96.88		
	0.249 8	58.10	59.10	115.69	97.45		
	0.252 5	58.72	59.10	117.23	99.00		
	0.254 1	59.10	59.10	116.87	97.75		
	0.250 9	58.35	70.28	128.69	100.10		
	0.251 2	58.42	70.28	128.63	99.90		
	0.252 1	58.63	70.28	127.65	98.21		
大黄酚	0.250 4	108.71	95.40	203.69	99.56	99.84	1.64
	0.251 2	109.05	95.40	202.36	97.81		
	0.253 3	109.96	95.40	204.58	99.18		
	0.249 8	108.44	107.50	216.78	100.80		
	0.252 5	109.62	107.50	215.21	98.22		
	0.254 1	110.31	107.50	215.69	98.03		
	0.250 9	108.92	119.30	230.05	101.50		
	0.251 2	109.05	119.30	230.58	101.90		
	0.252 1	109.44	119.30	230.69	101.60		

续表3

Continued tab 3

待测成分	取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
大黄素甲醚	0.250 4	35.76	29.65	64.36	96.46	98.67	1.85
	0.251 2	35.87	29.65	65.59	100.20		
	0.253 3	36.17	29.65	65.87	100.20		
	0.249 8	35.67	38.20	74.36	101.30		
	0.252 5	36.06	38.20	73.93	99.14		
	0.254 1	36.29	38.20	74.39	99.74		
	0.250 9	35.83	45.89	80.61	97.58		
	0.251 2	35.87	45.89	80.27	96.75		
	0.252 1	36.00	45.89	80.35	96.64		

2.10 样品含量测定

取9批样品各适量,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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$, mg/片)Tab 4 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/tablet)

生产厂家	样品批号	绿原酸	黄芩苷	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
A厂	20151101	1.560 0	2.990 0	0.034 4	0.053 4	0.056 0	0.106 0	0.032 3
	20151102	1.530 0	3.010 0	0.033 0	0.054 7	0.057 0	0.106 0	0.035 0
	20151103	1.500 0	2.880 0	0.034 6	0.059 3	0.058 0	0.110 0	0.032 1
B厂	150501	1.720 0	2.730 0	0.015 5	0.020 6	0.024 0	0.049 0	0.014 0
	150603	1.820 0	2.850 0	0.017 0	0.021 7	0.026 0	0.053 0	0.015 5
	150606	1.800 0	2.810 0	0.018 0	0.021 4	0.025 0	0.051 0	0.015 3
C厂	215001079	1.950 0	2.270 0	0.014 5	0.014 8	0.028 0	0.053 0	0.015 0
	215004060	1.840 0	2.230 0	0.014 1	0.018 2	0.027 0	0.052 0	0.014 8
	215005062	1.970 0	2.280 0	0.014 3	0.019 1	0.028 0	0.054 0	0.015 0

3 讨论

3.1 提取方式、提取时间和提取溶剂的考察

笔者考察了超声和加热回流两种提取法,结果超声提取法简便易行,且提取效果优于加热回流法;又比较了超声处理15、30、45 min的提取效率,结果超声处理30 min即可达到最佳提取效果;此外,还考察了水、50%甲醇溶液、70%甲醇溶液和甲醇作为提取溶剂的提取效果,结果70%甲醇溶液对7种待测成分的提取效果最高,因此本试验最终确定以70%甲醇溶液超声提取30 min的方式进行提取。

3.2 检测波长的选择

根据7种待测成分的全波长扫描图谱发现,绿原酸在327 nm波长下吸收最好,黄芩苷在280 nm波长下吸收最好;5种大黄蒽醌类成分在220~230 nm波长范围内灵敏度最高,但是有干扰色谱峰出现,干扰了大黄酸色谱峰,经比较分析,在450 nm波长处没有干扰色谱峰出现,故选择450 nm波长测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄

素、大黄酚和大黄素甲醚5种蒽醌类成分^[10-11],在280 nm波长处测定黄芩苷,在327 nm波长处测定绿原酸。

3.3 样品测定结果分析

对9批样品进行分析,结果表明均能检测出绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚7种成分,但各批样品中上述7种成分的含量存在一定差异,这可能与金银花、黄芩、大黄的来源、品种、生产工艺等有关。

综上所述,本方法准确可靠、重复性好,可用于抗菌消炎片中7种成分含量的同时测定。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂:第七册[S].1993.
- [2] 费扬,赵亮,张海,等.高效液相色谱法测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的含量[J].第二军医大学学报,2009,30(10):1191-1194.
- [3] 林永强,徐丽华,王淑华.一测多评法同步测定银黄片中6种咖啡酰奎宁酸[J].中草药,2012,43(4):706-710.
- [4] 魏艳婷,张静宜,张华潭,等.HPLC法同时测定三黄滴丸中5种蒽醌类成分的含量[J].中国药房,2015,26(27):3867-3869.
- [5] 何盛江,聂阳,陈刚,等.HPLC法同时测定不同产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].中国药房,2016,27(33):4719-4721.
- [6] 王钰莹,冯伟红,杨菲,等.“一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J].中国中药杂志,2012,37(2):212-217.
- [7] 程小丽,魏胜利,刘春生,等.RP-HPLC-DAD法同时测定大黄中9种有效成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):99-102.
- [8] 赵吉平,刘爱萍.抗菌消炎胶囊中土大黄苷的薄层鉴别及HPLC鉴别方法研究[J].中国药事,2012,26(6):620-622.
- [9] 史学红,崔绍梅,田云美,等.HPLC法测定抗菌消炎片黄芩苷的含量[J].齐鲁药事,2010,29(8):466-468.
- [10] 李巧如,李小川,罗春香.抗菌消炎片质量标准研究[J].中成药,2007,29(12):8-10.
- [11] 张梅,任爱农,杨玉兰,等.HPLC波长切换法同时测定清清颗粒中9个成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(1):29-33.

(收稿日期:2016-11-07 修回日期:2017-04-11)

(编辑:刘柳)