

# HPLC法同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素的含量<sup>Δ</sup>

邱红梅<sup>1\*</sup>, 杨林<sup>2</sup>, 何丹<sup>1#</sup> (1.重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2.重庆医药高等专科学校药理学系, 重庆 401331)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3846-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.28

**摘要** 目的:建立同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为GL InterSustain-C<sub>18</sub>,流动相为水-甲醇(55:45, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μL。结果:绿原酸、黄芩苷和槲皮素的检测质量浓度线性范围分别为1.264~12.64 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、8.704~87.04 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、1.212~12.12 μg/mL( $r=0.999\ 9$ );定量限分别为1.88、2.98、1.94 ng,检测限分别为0.56、0.89、0.58 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.02%~101.10%(RSD=1.01%, $n=9$ )、97.48%~101.70%(RSD=1.38%, $n=9$ )、98.31%~101.10%(RSD=1.02%, $n=9$ )。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法;复方鱼腥草片;绿原酸;黄芩苷;槲皮素

## Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Baicalin and Quercetin in Compound Yuxingcao Tablets by HPLC

QIU Hongmei<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>2</sup>, HE Dan<sup>1</sup> (1.College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2.Dept. Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin and quercetin in Compound yuxingcao tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on GL InterSustain-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of water-methanol (55:45, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 270 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: Linear ranges of chlorogenic acid, baicalin and quercetin were 1.264-12.64 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 8.704-87.04 μg/mL( $r=0.999\ 9$ ) and 1.212-12.12 μg/mL( $r=0.999\ 9$ ), respectively. The limit of quantification were 1.88, 2.98, 1.94 ng, respectively. The limits of detection were 0.56, 0.89, 0.58 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 98.02%-101.10% (RSD=1.01%, $n=9$ ), 97.48%-101.70% (RSD=1.38%, $n=9$ ) and 98.31%-101.10% (RSD=1.02%, $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The established method is simple, accurate, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin and quercetin in Compound yuxingcao tablets.

**KEYWORDS** HPLC; Compound yuxingcao tablets; Chlorogenic acid; Baicalin; Quercetin

复方鱼腥草片是由鱼腥草、黄芩等5味中药材经提取制成的口服制剂,具有清热解毒的功效,临床上多用于外感风热引起的咽喉红肿疼痛、急性咽炎、急性扁桃体炎的治疗<sup>[1]</sup>。本品收载于2015年版《中国药典》(一部),现有标准采用薄层色谱法对鱼腥草、连翘苷和绿原酸进行鉴别<sup>[1]</sup>,以高效液相色谱法(HPLC)测定黄芩苷的含量,并规以黄芩苷计不得少于2.7 mg/片。鱼腥草中除含挥发油成分外,还含有大量绿原酸和槲皮素<sup>[2-4]</sup>。绿原酸具有抗菌、抗病毒、降血压和抗肿瘤等作用<sup>[5]</sup>;槲皮素属黄酮类化合物,能显著抑制癌细胞生长<sup>[6-7]</sup>,可抗肿瘤

和抗血小板凝集<sup>[8,9]</sup>。目前,文献报道关于复方鱼腥草片中有效成分的测定有HPLC法测定桑色素和槲皮素<sup>[8]</sup>,HPLC法测定黄芩苷<sup>[9]</sup>,HPLC法测定绿原酸<sup>[10]</sup>,也有采用毛细管电泳法测定绿原酸和槲皮素<sup>[11]</sup>,但未见同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素含量的报道。本试验采用HPLC法同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素含量,以期对复方鱼腥草片的质量控制提供参考。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

LC-20型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);AG135型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-1100DE型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司)。

<sup>Δ</sup> 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ14400208)

\* 副教授。研究方向:中药药理学、中药分析。E-mail: qiu hongmei@cqmu.edu.cn

# 通信作者:副教授。研究方向:药物分析。E-mail: ilddoctor@163.com

## 1.2 药品与试剂

复方鱼腥草片(李时珍医药集团有限公司,批号:1605002、1601001、1511004,规格:0.393 g/片);绿原酸对照品(批号:110753-201415)、黄芩苷对照品(批号:110896-200001)、槲皮素对照品(批号:100081-201408)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均 $\geq 99.0\%$ ;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:GL InterSustain-C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相:水-甲醇(55:45, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:270 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C;进样量:20  $\mu$ L。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取绿原酸、黄芩苷、槲皮素对照品 15.33、10.88、15.15 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,加水溶解并定容,得单一对照品溶液;量取上述单一对照品溶液各 0.1 mL,置于同一 25 mL 量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,得绿原酸、黄芩苷和槲皮素质量浓度分别为 12.64、87.04、12.12  $\mu$ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品 20 片,研钵研细,精密称取 0.4 g,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇 20 mL 使溶解,称定质量,超声(功率:100 W,频率:40 kHz)处理 30 min,放至室温(25  $^{\circ}$ C),用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

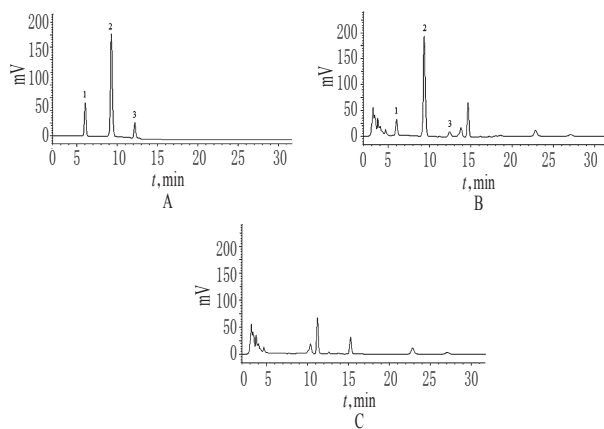
2.2.3 阴性对照溶液 按复方鱼腥草片处方和工艺制备缺鱼腥草和黄芩的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

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。结果,理论板数以绿原酸峰计 $> 3\ 000$ ;绿原酸、黄芩苷和槲皮素均能达到基线分离,分离度均 $> 2$ ,各成分基线分离良好。

### 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 1、2、4、6、8、10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水定容,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 20  $\mu$ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度( $x$ ,  $\mu$ g/mL)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得绿原酸、黄芩苷和槲皮素回归方



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.绿原酸;2.黄芩苷;3.槲皮素  
A.mixed control; B.test sample; C.negative control; 1.chlorogenic acid; 2.baicalin; 3.queracetin

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

程分别为 $y=43\ 567x-388$ ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=59\ 992x-423$ ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=63\ 934x-578$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,绿原酸、黄芩苷和槲皮素检测质量浓度线性范围分别为 1.264~12.64、8.704~87.04、1.212~12.12  $\mu$ g/mL。

### 2.5 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得定量限;当信噪比为 3:1 时,得检测限。结果,绿原酸、黄芩苷和槲皮素的定量限分别为 1.88、2.98、1.94 ng,检测限分别为 0.56、0.89、0.58 ng。

### 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“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、黄芩苷和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.04%、1.33%、0.95%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1605002)适量,分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10 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、黄芩苷和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.21%、0.98%、1.01%( $n=6$ ),表明供试品溶液室温放置 10 h 内基本稳定。

### 2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:1605002)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,记录峰面积并计算样品含量。结果,绿原酸、黄芩苷和槲皮素含量的平均值分别为

0.452 0、4.402、0.118 4 mg/片，RSD 分别为 1.03%、0.76%、1.02% (n=6)，表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:1605002)适量,共9份,分别加入低、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1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests (n=9)

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	0.200 0	0.226 0	0.189 6	0.414 7	99.53	99.21	1.01
	0.200 0	0.226 0	0.189 6	0.412 6	98.41		
	0.200 0	0.226 0	0.189 6	0.412 6	98.43		
	0.200 0	0.226 0	0.227 5	0.449 0	98.02		
	0.200 0	0.226 0	0.227 5	0.456 0	101.10		
	0.200 0	0.226 0	0.227 5	0.450 6	98.71		
	0.200 0	0.226 0	0.265 4	0.488 8	99.01		
	0.200 0	0.226 0	0.265 4	0.489 5	99.28		
	0.200 0	0.226 0	0.265 4	0.492 5	100.40		
黄芩苷	0.200 0	2.201	1.741	3.941	99.95	99.13	1.38
	0.200 0	2.201	1.741	3.945	100.20		
	0.200 0	2.201	1.741	3.921	98.78		
	0.200 0	2.201	2.176	4.322	97.48		
	0.200 0	2.201	2.176	4.334	98.01		
	0.200 0	2.201	2.176	4.324	97.55		
	0.200 0	2.201	2.611	4.856	101.70		
	0.200 0	2.201	2.611	4.788	99.09		
	0.200 0	2.201	2.611	4.796	99.39		
槲皮素	0.200 0	0.592 0	0.472 7	1.062 4	99.53	99.32	1.02
	0.200 0	0.592 0	0.472 7	1.058 0	98.59		
	0.200 0	0.592 0	0.472 7	1.066 6	100.40		
	0.200 0	0.592 0	0.593 9	1.181 6	99.28		
	0.200 0	0.592 0	0.593 9	1.178 2	98.71		
	0.200 0	0.592 0	0.593 9	1.183 0	99.51		
	0.200 0	0.592 0	0.710 4	1.310 2	101.10		
	0.200 0	0.592 0	0.710 4	1.290 4	98.31		
	0.200 0	0.592 0	0.710 4	1.291 2	98.43		

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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2。

表2 样品含量测定结果(n=3, mg/片)

Tab 2 Results of content determination of samples (n=3, mg/tablet)

样品批号	绿原酸		黄芩苷		槲皮素	
	测得值	RSD, %	测得值	RSD, %	测得值	RSD, %
1605002	0.452 0		4.402		0.118 4	
1601001	0.470 1	3.20	4.423	0.97	0.119 2	2.32
1511004	0.441 3		4.485		0.123 6	

## 3 讨论

2015年版《中国药典》(一部)采用HPLC法对黄芩苷含量进行测定,流动相为甲醇、水和磷酸<sup>[1]</sup>。而本研究所建方法流动相仅需甲醇和水,不使用磷酸,更加经济环保。

2015年版《中国药典》(一部)中鱼腥草及其饮片含量测定项下暂无相应内容<sup>[1]</sup>。本研究建方法可以为鱼腥草、鱼腥草饮片以及鱼腥草的相关制剂中绿原酸和槲皮素的含量测定提供参考。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素含量的同时测定。

## 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: 224, 302, 1234.
- [2] 叶春, 阚建全, 谭书明, 等. 鱼腥草叶总黄酮的提取分离[J]. 农业工程学报, 2008, 24(10): 227-230.
- [3] 伍贤进, 李胜华, 李爱明, 等. 鱼腥草化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(8): 1168-1170.
- [4] 李瑞玲, 崔运启, 秦彩霞. 鱼腥草中槲皮素的提取及含量测定[J]. 化学与生物工程, 2014, 31(2): 72-74.
- [5] 王莲, 袁艺. 不同产地鱼腥草中绿原酸、槲皮素含量测定[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1081-1083.
- [6] 罗世琼, 彭全材, 柳丹丹. 高效液相色谱法测定鱼腥草不同部位槲皮素的含量[J]. 贵州师范大学学报, 2008, 26(3): 96-99.
- [7] 崔山凤. 槲皮素的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(6): 23-24.
- [8] 贾小燕, 李念兵, 罗红群. 超声提取反相高效液相色谱同时测定复方鱼腥草片中的桑色素和槲皮素[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 266-270.
- [9] 车晓彦, 贺亚玲, 尹靖先, 等. 复方鱼腥草片的鉴别和含量测定[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1): 65-67.
- [10] 曹金枝, 苏志刚. HPLC法测定复方鱼腥草片中绿原酸的含量[J]. 首都医药, 2014(10): 93-94.
- [11] 吕元琦, 鄢春华, 袁倬斌. 毛细管电泳法测定复方鱼腥草片中的绿原酸和槲皮素[J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 106-108.

(收稿日期: 2016-10-10 修回日期: 2016-11-11)

(编辑: 张 静)