

# 多波长HPLC法同时测定复方黄白胶囊中3种成分的含量<sup>△</sup>

方芳<sup>1\*</sup>,王晶<sup>1</sup>,方舟<sup>1</sup>,雷力力<sup>1</sup>,孟繁颖<sup>2</sup>,方洪壮<sup>2#</sup>(1.佳木斯大学附属第一医院,黑龙江佳木斯 154003; 2.佳木斯大学药学院,黑龙江佳木斯 154007)

中图分类号 R283.65;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0641-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.22

**摘要** 目的:建立同时测定复方黄白胶囊中绿原酸、栀子苷和芍药苷3种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为ZORBAX Eclipse SB-C<sub>8</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,绿原酸、栀子苷和芍药苷的检测波长分别为327、240和232 nm。结果:绿原酸、栀子苷和芍药苷的进样量分别在0.02~0.19、0.09~0.84和0.11~1.01 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(*r*分别为0.999 7、0.999 8、0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率分别为99.6%、101.0%和100.2%,RSD分别为1.3%、0.7%和1.4%(*n*均为6)。结论:所建方法可用于复方黄白胶囊中3种成分的含量测定。

**关键词** 复方黄白胶囊;绿原酸;栀子苷;芍药苷;高效液相色谱法;多波长;含量测定

## Simultaneous Determination of 3 Components in Compound Huangbai Capsules by Multi-wavelength HPLC Method

FANG Fang<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, FANG Zhou<sup>1</sup>, LEI Li-li<sup>1</sup>, MENG Fan-ying<sup>2</sup>, FANG Hong-zhuang<sup>2</sup>(1.The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154003, China; 2.College of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, geniposide and paeoniflorin in Compound huangbai capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on ZORBAX Eclipse SB-C<sub>8</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was at 30 ℃. The detection wavelengths were set at 327, 240 and 232 nm for chlorogenic acid, geniposide and paeoniflorin, respectively. RESULTS: The linear ranges of chlorogenic acid, geniposide and paeoniflorin were 0.02-0.19 μg(*r*=0.999 7), 0.09-0.84 μg(*r*=0.999 8) and 0.11-1.01 μg(*r*=0.999 9), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The average recoveries of the 3 components were 99.6% (RSD=1.3%, *n*=6), 101.0% (RSD=0.7%, *n*=6) and 100.2% (RSD=1.4%, *n*=6), respectively. CONCLUSIONS: The established method can be applied for the simultaneous determination of 3 components in Compound huangbai capsules.

**KEYWORDS** Compound huangbai capsules; Chlorogenic acid; Geniposide; Paeoniflorin; HPLC; Multi-wavelength; Content determination

复方黄白胶囊(原名怡康灵胶囊)为佳木斯大学附属第一医院开发的医院制剂,由黄芩、白芍、栀子、茵陈、厚朴、大黄和玄明粉7味药材组成<sup>[1]</sup>,主治急、慢性胰腺炎和重症胰腺炎。该制剂现行的质量标准中,仅对主要成分黄芩苷进行了定量研究<sup>[2]</sup>。但是,该制剂的组方药材较多,单一成分的测定不能全面、综合地评价整个制剂的质量。多波长高效液相色谱(HPLC)法是适用于复杂体系中多种成分同时测定的色谱定量方法<sup>[3-4]</sup>,在定量信息获取上有多波长固定和波长切换两种方式<sup>[5-6]</sup>。该方法灵敏度高、选择性好,可克服色谱测定时分离效果不佳、峰形不良、拖尾严重等现象,已被广泛应用于中药分析中<sup>[7-9]</sup>。本研究根据复方黄白胶囊中绿原酸、栀子苷、

芍药苷的紫外光谱特性,建立了通过3种波长切换同时测定该制剂中3种成分的多波长HPLC法,可为该制剂制备工艺的改进和质量标准的提升提供依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1315型二极管阵列检测器(DAD)、G1329型自动进样器等(美国Agilent公司);BD211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);SK250H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);HC-2516型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

#### 1.2 药品与试剂

复方黄白胶囊(佳木斯大学附属第一医院制剂室,批号:090708、090725、090813、090829、090911、090930);绿原酸、栀子苷、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200413、110749-200714、110736-200933);甲醇、乙腈(色谱纯)和磷酸(分析纯)均购自天津科密欧试剂有限公司;水为重蒸水。

△基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12521547);佳木斯大学科学技术面上项目(No.S2011-032)

\*主管药师,硕士。研究方向:临床药物分析。E-mail: fafa317@163.com

#通信作者:教授。研究方向:药物分析。电话:0454-8611265。E-mail: fhz-chjms@sohu.com

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse SB-C<sub>8</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 保护柱: ZORBAX Eclipse SB-C<sub>8</sub>(12.5 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min, 10% A; >12~17 min, 10% A→14% A; >17~30 min, 14% A); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 0~14.5 min为327 nm(绿原酸), >14.5~23 min为240 nm(栀子苷), >23~30 min为232 nm(芍药苷); 进样量: 10 μl。

### 2.2 混合对照品溶液的制备

取绿原酸、栀子苷、芍药苷对照品分别约3、12、14 mg, 精密称定, 置同一20 ml棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成混合对照品贮备液。精密量取混合对照品贮备液2 ml, 置25 ml棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得绿原酸、栀子苷、芍药苷质量浓度分别为10.80、46.64、56.08 mg/L的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取复方黄白胶囊内容物约0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入体积分数为60%的甲醇25 ml, 称定质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 53 kHz)提取30 min, 放冷, 再次称定质量, 用体积分数为60%的甲醇补足失质量, 摇匀, 取上清液, 滤纸滤过后取续滤液, 再用0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 阴性对照溶液的制备

取各味药材和辅料, 按复方黄白胶囊的处方与生产工艺, 分别制备不含单味药白芍、栀子、茵陈的阴性样品, 再按“2.3”项下方法分别制备阴性对照溶液。

### 2.5 检测波长的选取

DAD设定为200~400 nm全波长扫描(1 nm/set)。取混合对照品溶液适量, 按上述色谱条件进样测定。在记录的色谱-光谱二维数据中, 分别提取绿原酸、栀子苷、芍药苷各色谱峰处的光谱数据, 绘制3种对照品的光谱曲线, 见图1。由图1可知, 绿原酸、栀子苷、芍药苷在紫外光区的最大吸收波长分别为327、240、232 nm。3个波长下对照品的HPLC图见图2。在上述3个波长下测定供试品溶液, 根据所得色谱图确定波长切换时间。供试品溶液与阴性对照溶液的HPLC图见图3。

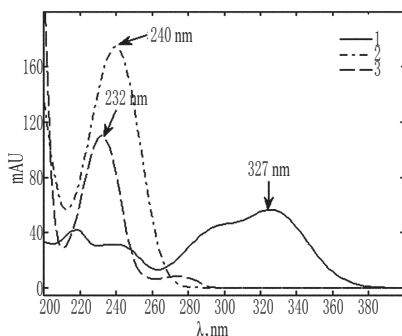


图1 混合对照品的紫外吸收曲线

1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 芍药苷

Fig 1 UV absorption curves of mixture control

1. chlorogenic acid; 2. geniposide; 3. paeoniflorin

### 2.6 系统适用性试验

取混合对照品溶液和供试品溶液各适量, 按上述色谱条

件分别进样分析。结果表明, 绿原酸、栀子苷、芍药苷的色谱峰分离度良好, 与相邻色谱峰的分度均>1.5, 脱尾因子均在0.95~1.05之间, 理论板数均>5 000。

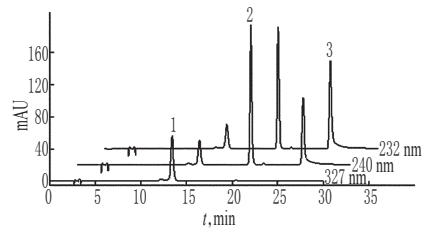


图2 混合对照品的HPLC图

1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 芍药苷

Fig 2 HPLC chromatograms of mixture control

1. chlorogenic acid; 2. geniposide; 3. paeoniflorin

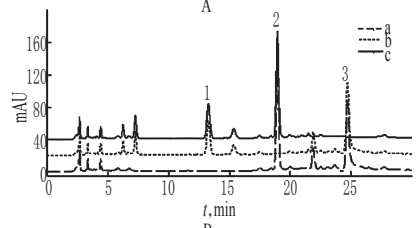
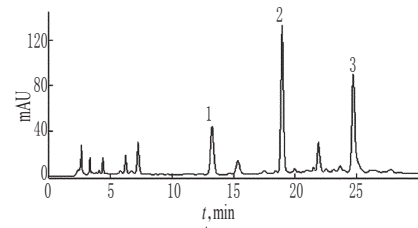


图3 供试品与阴性对照的HPLC图

A. 供试品; B. 阴性对照; a. 缺茵陈; b. 缺栀子; c. 缺白芍; 1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 芍药苷

Fig 3 HPLC chromatograms of tests samples and negative control

A. test samples; B. negative control; a. negative without *Artemisiae Scopariae Herba*; b. negative without *Gardenia jasminoides*; c. negative without *Paeonia lactiflora*; 1. chlorogenic acid; 2. geniposide; 3. paeoniflorin

### 2.7 线性关系考察

分别取混合对照品溶液2、6、10、14、18 μl, 按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。以对照品进样量(x)为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得各成分的回归方程, 详见表1。

表1 3种成分的线性关系考察结果(n=5)

Tab 1 Results of linearity assay of 3 components (n=5)

成分	检测波长, nm	回归方程	r	线性范围, μg
绿原酸	327	$y = 1\ 879.8x + 18.234$	0.999 7	0.02~0.19
栀子苷	240	$y = 1\ 500.7x + 8.314$	0.999 8	0.09~0.84
芍药苷	232	$y = 1\ 257.7x - 4.443$	0.999 9	0.11~1.01

### 2.8 精密度试验

取混合对照品溶液适量, 按上述色谱条件重复进样测定6次, 记录峰面积。结果显示, 绿原酸、栀子苷、芍药苷峰面积的RSD分别为0.9%、0.8%、1.3% (n均为6), 表明仪器精密度良好。

### 2.9 重复性试验

取同一批(批号: 090708)样品适量, 按“2.3”项下方法平行

制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果显示,每粒样品中平均含绿原酸、栀子苷、芍药苷0.602 5、2.573 5、3.081 8 mg, RSD分别为2.3%、2.0%、1.7%(*n*均为6),表明本方法重复性良好。

### 2.10 稳定性试验

取同一批样品(批号:090708)制备的供试品溶液适量,室温下放置,分别于0、4、8、12、16、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,绿原酸、栀子苷、芍药苷峰面积的RSD分别为1.8%、1.6%、0.8%(*n*均为6),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定。

### 2.11 加样回收率试验

取同一批(批号:090708)已知含量的复方黄白胶囊内容物6份,每份约0.05 g,精密称定,每份分别精密加入混合对照品贮备液1 ml和体积分数为60%的甲醇24 ml,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积;另取混合对照品溶液同法测定,按外标法计算测得量,并计算加样回收率,结果分别见表2、表3和表4。

表2 绿原酸的加样回收率试验结果(*n*=6)

Tab 2 Recoveries of chlorogenic acid(*n*=6)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.130 5	0.135 0	0.264 1	99.0		
2	0.135 8	0.135 0	0.271 3	100.4		
3	0.135 9	0.135 0	0.269 0	98.6	99.6	1.3
4	0.133 3	0.135 0	0.265 6	98.0		
5	0.148 4	0.135 0	0.285 3	101.4		
6	0.130 9	0.135 0	0.265 9	100.0		

表3 栀子苷的加样回收率试验结果(*n*=6)

Tab 3 Recoveries of geniposide(*n*=6)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.591 9	0.583 0	1.174 0	99.9		
2	0.564 7	0.583 0	1.156 0	101.4		
3	0.565 8	0.583 0	1.154 0	100.9	101.0	0.7
4	0.619 8	0.583 0	1.206 0	100.5		
5	0.537 8	0.583 0	1.132 0	101.9		
6	0.584 2	0.583 0	1.175 0	101.4		

表4 芍药苷的加样回收率试验结果(*n*=6)

Tab 4 Recoveries of paeoniflorin(*n*=6)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.632 2	0.701 0	1.339 0	101.0		
2	0.736 1	0.701 0	1.438 0	100.2		
3	0.730 6	0.701 0	1.421 0	98.5	100.2	1.4
4	0.700 4	0.701 0	1.396 0	99.2		
5	0.697 9	0.701 0	1.397 0	99.8		
6	0.613 3	0.701 0	1.332 0	102.5		

### 2.12 样品含量测定

取6批复方黄白胶囊各10粒,精密称定,倾倒入内容物,用小刷刷净胶囊壳,精密称定囊壳总质量,求出每粒内容物的平均质量。每批样品取3份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液。取供试品溶液和混合对照品溶液各适量,按上述色谱条件分别进样测定,记录峰面积,以外标法计算复方黄白胶囊中绿原酸、栀子苷和芍药苷的含量,结果见表5。

## 3 讨论

### 3.1 测定方式的选择

多波长HPLC法的多波长固定和波长切换两种方式获得的定量结果是一致的,所不同的是:波长切换方式对检测器要

表5 样品含量测定结果(mg/粒,*n*=3)

Tab 5 Results of content determination of samples(mg/capsule,*n*=3)

批号	绿原酸含量	栀子苷含量	芍药苷含量
090708	0.602 4	2.573 6	3.081 8
090725	0.589 4	2.726 8	3.053 0
090813	0.552 2	2.726 6	3.193 6
090829	0.606 2	2.568 8	2.991 1
090911	0.611 1	2.615 7	3.418 2
090930	0.567 9	2.596 1	3.060 8

求相对较低,可以在可变波长检测器下完成;而多波长固定方式需有DAD的支持。本试验先采用波长固定的方式,根据混合对照品与供试品的色谱图,确定波长切换时间,充分利用DAD的功能,有利于波长切换时间的选取;再以波长切换的方式获取定量信息,利用了波长切换方式下输出的色谱图相对简洁的特性。

### 3.2 色谱柱的选择

本试验采用了C<sub>8</sub>色谱柱进行定量分析。这是由于复方黄白胶囊组成的药味较多、成分复杂,虽然多波长定量技术可在很大程度上降低色谱分离的要求,但试验中若采用C<sub>18</sub>色谱柱,样品中绿原酸、栀子苷、芍药苷和其他共存的极性较大成分的分并不理想,而以C<sub>8</sub>色谱柱可达到较满意的结果。

### 3.3 检测波长的选择

色谱流动相的pH影响绿原酸、栀子苷和芍药苷的紫外最大吸收波长,故本试验利用DAD可获得色谱-光谱二维数据的功能,在确定的流动相梯度洗脱程序下,根据各成分相应光谱的最大吸收选取检测波长,这既可增加定量信息的选择性,又可提高方法测定的灵敏性。

## 参考文献

- [1] 黄展. 怡康灵胶囊主要药效学实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(3): 47.
- [2] 董丽华, 张志国, 于春艳. 高效液相色谱法测定怡康灵胶囊中黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2006, 9(8): 777.
- [3] 徐燕, 曹进, 王义明, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分[J]. 药学学报, 2003, 38(7): 543.
- [4] 付娟, 罗娟敏, 王义明, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定丹红注射液中7种成分的含量[J]. 中国新药杂志, 2012, 23(23): 2 817.
- [5] 刘志勇, 汪军, 岳霞丽, 等. 高效液相色谱切换波长法测定多组分体系[J]. 分析化学, 2006, 36(6): 894.
- [6] 李玉恒, 张振秋, 赖静怡, 等. HPLC波长切换技术同时测定黄连片中7种成分含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 371.
- [7] 张硕旭, 孙冬晓, 董立华, 等. HPLC法同时测定乙肝扶正胶囊中6种化学成分的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(27): 2 546.
- [8] 苗瑞娜, 胡春丽, 高瑞芳, 等. RP-HPLC波长切换法同时测定阑尾炎颗粒中5种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(3): 205.
- [9] 尤春雪, 张振秋, 李峰, 等. HPLC波长切换技术对葛根中8种成分的测定及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2013, 44(5): 616.

(收稿日期:2013-02-16 修回日期:2013-05-20)