

# 波长切换HPLC法快速测定柴银口服液中绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量

李翔\*,刘皈阳#,马建丽,周亮,黄欣欣(解放军总医院第一附属医院药剂药理科,北京 100048)

中图分类号 R283.611;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3327-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.21

**摘要** 目的:建立同时测定柴银口服液中绿原酸、葛根素和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Purospher® STAR RP-18 endcapped(55 mm×4 mm,3 μm),流动相为甲醇-2%冰醋酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为327 nm(0~<4 min)、250 nm(4~<6 min)、280 nm(6~10 min),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃。结果:绿原酸、葛根素和黄芩苷的质量浓度分别在0.436 8~8.736 0 μg/ml、0.206 4~4.128 0 μg/ml和2.060~41.200 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r$ 均为0.999 9);三者精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率分别为99.57%、99.91%和100.08%,RSD分别为1.75%、1.69%和2.20%( $n$ 均为6)。结论:波长切换HPLC法简便、快速、准确、可靠,可用于柴银口服液质量的全面控制与评价。

**关键词** 柴银口服液;高效液相色谱法;波长切换;绿原酸;葛根素;黄芩苷;含量测定

## Content Determination of Chlorogenic Acid, Puerarin and Baicalin in Chaiyin Oral Solution by HPLC with Switching Wavelength

LI Xiang, LIU Gui-yang, MA Jian-li, ZHOU Liang, HUANG Xin-xin (Dept. of Pharmacology, The First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of chlorogenic acid, puerarin and baicalin in Chaiyin oral solution. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Purospher® STAR RP-18 endcapped (55 mm×4 mm, 3 μm) column with mobile phase consisted of methanol-2% glacial acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 327 nm(0-<4 min), 250 nm(4-<6 min) and 280 nm (6-10 min). The column temperature was set at 30 ℃. RESULTS: The liner ranges of chlorogenic acid, puerarin and baicalin were 0.4368-8.736 0 μg/ml ( $r=0.999 9$ ), 0.206 4-4.128 0 μg/ml( $r=0.999 9$ ) and 2.060-41.200 μg/ml( $r=0.999 9$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. Average recoveries were 99.57% (RSD=1.75%,  $n=6$ ), 99.91% (RSD=1.69%,  $n=6$ ) and 100.08% (RSD=2.20%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and reliable, and it could be used for the quality control and evaluation of Chaiyin oral solution.

**KEYWORDS** Chaiyin oral solution; HPLC; Switching wavelength; Chlorogenic acid; Puerarin; Baicalin; Content determination

柴银口服液是由柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷和鱼腥草11味中药组成的抗流感制剂,具有清热解毒、利咽止咳的作用,临床上主要用于治疗呼吸道感染外感风热证,症见发热恶风,头痛、咽痛,汗出,鼻塞流涕,咳嗽,舌边尖红、苔薄黄等。目前,分别测定柴银口服液中黄芩苷、绿原酸、连翘苷等成分的方法陆续有文献报道,但各种方法采用的色谱条件不一致,且存在检测时间较长,无法用于

3个成分同时测定的不足<sup>[1-4]</sup>。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法结合检测波长切换技术,可在10 min内快速测定柴银口服液中绿原酸、葛根素和黄芩苷的质量浓度,方法简便、快速,结果准确可靠,可以为进一步完善制剂的质量控制和评价方法提供参考和依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

[7] 奥·乌力吉,白明刚,乌日吉木斯,等.清咽利喉胶囊的质量标准研究[J].中成药,2012,34(11):97.

[8] 陈志琦.六味甘草丸质量标准研究[J].中国药房,2010,21(31):70.

[9] 郭丽娜,马莹慧,赵伟,等.淫羊藿属植物中化学成分分析

\* 主管药师,博士。研究方向:中药与药物分析。电话:010-66867401。E-mail:lxbj@hotmail.com

# 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学与药剂学。电话:010-66867081。E-mail:liuguivy@gmail.com

研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(8):67.

[10] 黎阳,张铁军,刘素香,等.人参化学成分和药理研究进展[J].中草药,2009,40(1):170.

[11] 王蕾,谈瑄忠,毛春芹,等.RP-HPLC法同时测定淫桂通便颗粒中6种成分[J].中成药,2013,35(2):89.

[12] 范辉,顾泉琳,贝伟剑,等.HPLC法测定乌参醒脑滴丸中人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和Rd[J].中成药,2012,34(7):83.

(收稿日期:2013-09-18 修回日期:2013-12-22)

1200型HPLC仪(美国Agilent公司),包括四元泵、VWD检测器、自动进样器和ChemStation化学工作站;AE240型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

## 1.2 药品与试剂

绿原酸、葛根素和黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200413、110752-200511、110715-200815);柴银口服液(鲁南厚普制药有限公司,20 ml/支,批号:00512058、00512070、00512073、00512082、00512083);甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Purospher® STAR RP-18 endcapped(55 mm×4 mm,3 μm);流动相:甲醇-2%冰醋酸水溶液,梯度洗脱(梯度洗脱程序及检测波长见表1);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量:5 μl;运行时间:10 min。

表1 梯度洗脱程序及检测波长

Tab 1 Gradient elution condition and detection wavelength

时间,min	甲醇,%	2%冰醋酸水溶液,%	检测波长,nm
0~<4	15	85	327
4~<6	20	80	250
6~<6.5	25	75	280
6.5~<10	55	45	280

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品适量,用甲醇溶解,制成质量浓度为2.184 mg/ml的对照品溶液;精密量取绿原酸对照品溶液0.5 ml,置25 ml量瓶中,用甲醇定容,即得质量浓度为43.68 μg/ml的绿原酸对照品贮备溶液。

精密称取葛根素对照品适量,用甲醇溶解,制成质量浓度为1.032 mg/ml的对照品溶液;精密量取葛根素对照品溶液0.5 ml,置25 ml量瓶中,用甲醇定容,即得质量浓度为20.64 μg/ml的葛根素对照品贮备溶液。

精密称取在60℃减压干燥4 h后的黄芩苷对照品适量,用甲醇溶解,制成质量浓度为1.03 mg/ml的对照品溶液;精密量取黄芩苷对照品溶液5 ml,置25 ml量瓶中,用甲醇定容,即得质量浓度为206 μg/ml的黄芩苷对照品贮备溶液。

分别精密量取绿原酸、葛根素及黄芩苷对照品贮备溶液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得不同质量浓度的系列混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密量取柴银口服液1 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 阴性对照溶液的制备

依照处方比例,分别按生产工艺制备缺金银花、葛根、黄芩的阴性样品,按“2.3”项下供试品溶液的制备方法,制得阴性对照溶液。

### 2.5 专属性试验

取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果显示,供试品溶液中

绿原酸、葛根素和黄芩苷的色谱峰与其他色谱峰能达到基线分离,且保留时间与对照品溶液一致,各阴性对照溶液在其相同保留时间处无色谱峰,表明其他组方药材对绿原酸、葛根素和黄芩苷的测定无干扰。色谱见图1。

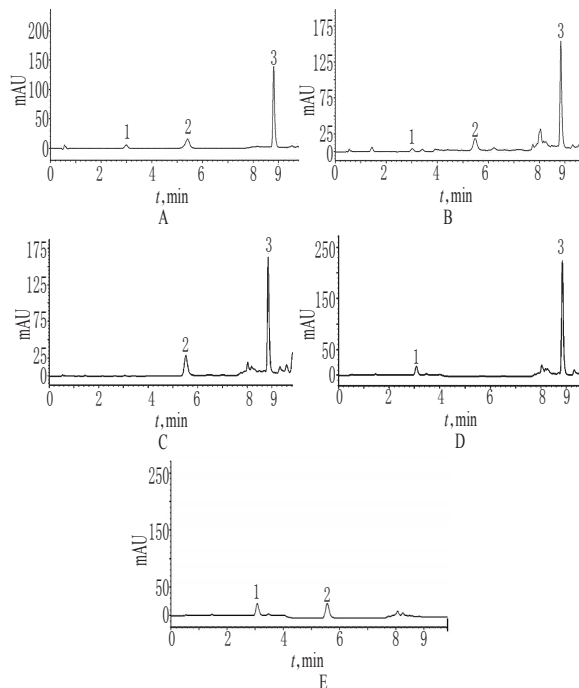


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.金银花阴性对照;D.葛根阴性对照;E.黄芩阴性对照;1.绿原酸;2.葛根素;3.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control;B.test sample;C.Lonicera japonica negative control;D.Kudzuvine Root negative control;E.Scutellaria baicalensis negative control;1.chlorogenic acid;2.puerarin;3.baicalin

### 2.6 线性关系考察

取不同浓度的系列混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件分别进样,测定峰面积。分别以绿原酸、葛根素和黄芩苷的质量浓度(μg/ml)为横坐标(x),以其各自的峰面积积分为纵坐标(y),绘制标准曲线,得线性回归方程:绿原酸为 $y=26.82x+1.854$ ( $r=0.9999$ , $n=6$ ),线性范围为0.4368~8.7360 μg/ml;葛根素为 $y=18.66x+0.8457$ ( $r=0.9999$ , $n=6$ ),线性范围为0.2064~4.1280 μg/ml;黄芩苷为 $y=30.74x+2.258$ ( $r=0.9999$ , $n=6$ ),线性范围为2.060~41.200 μg/ml。结果表明,绿原酸、葛根素和黄芩苷在各自线性范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

### 2.7 精密度试验

精密吸取绿原酸、葛根素和黄芩苷的对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积。结果显示,绿原酸、葛根素和黄芩苷峰面积的RSD分别为1.00%、0.23%、0.18%( $n=6$ ),表明仪器的精密度良好。

### 2.8 稳定性试验

取批号为00512058的样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别于0、2、4、8、10、12 h各进样1

次,测定峰面积。结果显示,绿原酸、葛根素和黄芩苷峰面积的RSD分别为1.45%、1.44%、1.13% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

### 2.9 重复性试验

取批号为00512058的样品,按“2.3”项下方法制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果显示,绿原酸、葛根素和黄芩苷的平均质量浓度分别为42.17、52.98、622.5  $\mu\text{g/ml}$ ,RSD分别为1.21%、2.35%、1.98% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.10 加样回收率试验

精密称取批号为00512058的样品6份,其中绿原酸、葛根素和黄芩苷质量浓度分别为42.18、52.99、622.9  $\mu\text{g/ml}$ ,分别精密加入21.84  $\mu\text{g/ml}$ 绿原酸对照品贮备溶液1.0 ml,20.64  $\mu\text{g/ml}$ 葛根素对照品贮备溶液1.3 ml,206  $\mu\text{g/ml}$ 黄芩苷对照品贮备溶液1.5 ml,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定,计算回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果 ( $n=6$ )  
Tab 2 Results of recovery test ( $n=6$ )

成分	取样量,ml	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
绿原酸	0.5	21.09	21.84	43.57	102.93		
	0.5	21.09	21.84	42.74	99.13		
	0.5	21.09	21.84	42.80	99.40	99.57	1.75
	0.5	21.09	21.84	42.80	99.40		
	0.5	21.09	21.84	42.47	97.89		
	0.5	21.09	21.84	42.63	98.63		
葛根素	0.5	26.50	26.83	53.69	101.34		
	0.5	26.50	26.83	53.71	101.42		
	0.5	26.50	26.83	52.89	98.36	99.91	1.69
	0.5	26.50	26.83	53.23	99.63		
	0.5	26.50	26.83	52.66	97.50		
	0.5	26.50	26.83	53.65	101.19		
黄芩苷	0.5	311.50	309.00	627.30	102.20		
	0.5	311.50	309.00	622.80	100.74		
	0.5	311.50	309.00	627.80	102.36	100.08	2.20
	0.5	311.50	309.00	621.20	100.23		
	0.5	311.50	309.00	611.40	97.06		
	0.5	311.50	309.00	613.90	97.86		

### 2.11 样品含量测定

取5批次柴银口服液样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,计算绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果 ( $n=3$ )

Tab 3 Results of content determination of samples ( $n=3$ )

批号	绿原酸		葛根素		黄芩苷	
	含量, $\mu\text{g/ml}$	RSD,%	含量, $\mu\text{g/ml}$	RSD,%	含量, $\mu\text{g/ml}$	RSD,%
00512058	42.18	1.09	52.99	2.37	622.90	1.91
00512070	33.57	2.44	41.56	1.72	536.30	1.91
00512073	37.83	1.26	53.62	2.22	571.00	1.55
00512082	34.20	2.10	54.57	1.87	541.60	1.23
00512083	62.16	2.09	64.28	2.67	732.00	2.52

## 3 讨论

参照2010年版《中国药典》(一部)并通过比较绿原酸、葛根素和黄芩苷在波长200~400 nm的紫外光谱,可以发现绿原酸、葛根素和黄芩苷的最大吸收波长分别为327、250、280 nm。3种成分的特征吸收波长差异较大,在配备单一波长的紫外检测器中通常采用分别测定的方法;若采用多波长的二极管阵列检测器,则对仪器的要求较高,增加试验成本<sup>[6-7]</sup>。本试验采用波长切换的方法,结合流动相梯度洗脱,可以有效分离绿原酸、葛根素和黄芩苷3种成分,并分别在其最大吸收波长处测定质量浓度<sup>[8-10]</sup>。该方法灵敏度高、简便可行,且对仪器的要求较低,有利于测定工作的开展和实现。

本试验采用新型Purospher® STAR RP-18 endcapped色谱柱,其3  $\mu\text{m}$ 的填料粒径,可以增加色谱峰的分度,有助于取得更好的色谱峰型;55 mm的色谱柱长度,能够有效降低色谱柱的压力,可以在普通HPLC仪上使用。采用梯度洗脱的方法,可以在10 min内完成绿原酸、葛根素和黄芩苷3种极性差别较大成分的同时测定,且均能达到很好的分离效果,满足质量浓度测定的系统适用性要求。

## 参考文献

- [1] 唐慧慧,蔡清宇.高效液相色谱法测定柴银口服液中绿原酸含量[J].解放军药学学报,2011,27(5):442.
- [2] 马桂华,王瑞成,徐桂花.HPLC测定柴银口服液中黄芩苷含量[J].山东医药工业,2001,20(5):9.
- [3] 蔡清宇,唐慧慧,康琛,等.HPLC测定柴银口服液中连翘苷含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):94.
- [4] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC测定柴银口服液中葛根素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):131.
- [5] 暴风伟,张振秋,刘玉强,等.波长切换HPLC法同时测定丹参中5种水溶性成分的含量[J].中国药房,2013,24(11):1002.
- [6] 高瑞芳,任祥友,王忠元,等.波长切换HPLC法同时测定元和正胃片中5种成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2013,30(1):25.
- [7] 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].药学报,2003,38(7):543.
- [8] 赵鸣舒,赵希贤.双波长高效液相色谱法测定丹参中多种成分的含量[J].中国药事,2010,24(8):804.
- [9] 吕惠卿,张小平,涂继方,等.双波长RP-HPLC测定解毒祛瘀滋阴方阿魏酸、异阿魏酸和芍药苷的含量[J].中华中医药学刊,2013,31(6):1245.
- [10] 谢剑琳,张振秋,杨超.HPLC波长切换法同时测定牡丹皮中6个成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):85.

(收稿日期:2013-09-17 修回日期:2014-05-02)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅