

HPLC法同时测定感冒止咳颗粒中绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量

柴鑫莉*, 陈 蕾, 舒金富(衢州市食品药品检验所, 浙江衢州 324000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)40-3824-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.40.26

摘要 目的:建立同时测定感冒止咳颗粒中绿原酸、葛根素和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-pH2.6磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为327 nm(0~9 min)、250 nm(9.1~15 min)、280 nm(15.1~30 min),柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:绿原酸、葛根素和黄芩苷的检测质量浓度分别在3.7~37.5, 7.8~78.4, 15.6~155.8 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤3.41%;平均加样回收率分别为98.9%、100.6%、101.6%,RSD分别为1.51%、1.34%、2.69%($n=9$)。结论:该方法简便、快速、重复性好,可用于感冒止咳颗粒的质量控制。

关键词 高效液相色谱;感冒止咳颗粒;绿原酸;葛根素;黄芩苷

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Puerarin and Baicalin in Ganmao Zhike Granules by HPLC

CHAI Xin-li, CHEN Lei, SHU Jin-fu(Quzhou Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Quzhou 324000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, puerarin and baicalin in Ganmao zhike granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-pH2.6 phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detective wavelength was set at 327nm (0-9 min), 250 nm (9-15 min), 280 nm(15-30 min); the column temperature was at 25℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear ranges were 3.7-37.5 μg/ml for chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 7.8-78.4 μg/ml for puerarin ($r=0.999\ 9$) and 15.6-155.8 μg/ml for baicalin ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.41%. The average recoveries were 98.9% (RSD=1.51%, $n=9$), 100.6% (RSD=1.34%, $n=9$) and 101.6% (RSD=2.69%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and repeatable, which can be used for the quality control of Ganmao zhike granules.

KEYWORDS HPLC; Ganmao zhike granules; Chlorogenic acid; Puerarin; Baicalin

感冒止咳颗粒是由柴胡、山银花、葛根、青蒿、连翘、黄芩、桔梗、苦杏仁提取物与薄荷脑制成的颗粒制剂^[1],具有解表清热、止咳化痰之功效,常用于外感风热所致的感冒发热、头痛鼻塞、伤风咳嗽、喉咙肿痛等。山银花、葛根和黄芩均为感冒

止咳颗粒的主药,其有效成分分别为绿原酸、葛根素和黄芩苷。目前,关于感冒止咳颗粒成分的定性和定量分析的报道较多,但仅为单一的测定某一种成分,如测定绿原酸^[2-4]、葛根素^[5-7]、黄芩苷^[8-9]、连翘苷^[10-11]。为了更全面的保障感冒止咳颗

- 苷含量[J].浙江临床医学,2014,16(6):997.
- [5] 宋成英,封加福.HPLC同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):115.
- [6] 于维萍,孙萍.糖肾康颗粒中黄芪甲苷的含量测定[J].中国药师,2007,10(10):993.
- [7] 梁瑞雪,张新军,贾元印,等.薄层扫描法测定尘肺清颗粒中黄芪甲苷的含量[J].时珍国医国药,2006,17(9):1 689.
- [8] 王俊,冷湘静,高锦彪.HPLC同时测定参坤养血颗粒中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、丹参素和党参炔苷[J].中国药师,2014,17(7):1 138.

- [9] 冯传平,杨惠,狄庆锋,等.HPLC-ELSD法测定补肾温肺合剂中黄芪甲苷的含量[J].中国药师,2014,17(2):322.
- [10] 庞兴寿,牟晓莹.HPLC-ELSD法测定芪血通络片中黄芪甲苷的含量[J].中国药师,2011,14(2):279.
- [11] 陈晓虎.HPLC-ELSD测定补中益气颗粒中黄芪甲苷含量[J].中国现代中药,2014,16(3):229.
- [12] 邹龙,刘辉,李仲秋,等.HPLC测定补阳还五汤总苷中黄芪甲苷和芍药苷的含量[J].湖南中医药大学学报,2012,32(5):39.
- [13] 林晓莲,林丽君,张尚斌.高效液相色谱法测定复方黄连液中黄芪甲苷的含量[J].长春中医药大学学报,2010,26(1):128.

* 工程师,硕士。研究方向:药物检测。电话:0570-8358022。E-mail:chaixinli1982@gmail.com

(收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-08-28)

粒的质量,在本研究中笔者采取多波长切换高效液相色谱(HPLC)法同时测定了感冒止咳颗粒中绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 型 HPLC 仪,包括真空在线脱气泵、LPG-3400SD 四元泵、WPS-3000 自动进样器、Tcc-3x00 柱温箱、VWD-3x00 紫外检测器、Chromleon 7 工作站(美国 thermo 公司);Mettler FE20 Ph 计(瑞士梅特勒-托利多公司);Mettler XP205 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

绿原酸对照品、葛根素对照品、黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-201314、110752-200209、110715-201117);感冒止咳颗粒(A厂,批号:ZJ12008、ZJ12009、ZHB1303、ZJB1311;B厂,批号:131005;C厂,批号:1312204;D厂,批号:20130901);甲醇(色谱纯,美国 Media 试剂公司);其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:流动相A为甲醇,流动相B为 pH2.6 磷酸溶液,采用梯度洗脱(梯度洗脱见表1);柱温:25 °C;流速:0.8 ml/min;检测波长:327 nm(0~9 min),250 nm(9.1~15 min),280 nm(15.1~30 min);进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	27	73
13	27	73
15	55	45
24	55	45
27	80	20
30	27	73

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、葛根素、黄芩苷对照品适量,置于不同的50 ml量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度分别为0.468、0.196、0.390 mg/ml的对照品贮备液。分别精密量取上述对照品贮备液各1.0、5.0、5.0 ml,置于同一25 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取感冒止咳颗粒适量,研细,精密称定粉末1 g,置于50 ml棕色量瓶中,加入30%甲醇适量,称定质量,超声处理30 min(功率:250 W,频率:40 kHz),放冷,加入30%甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm孔径微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方中各药材的比例制备不含山银花、葛根和黄芩的阴性对照品,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

精密吸取“2.2”项下供试品溶液、混合对照品溶液、阴性溶液各10 μl,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。在该色谱条件下,绿原酸、葛根素和黄芩苷均能达到基线分离,保留时间分别是7.44、11.24、21.97 min,理

论板数按绿原酸计算不低于4 000。

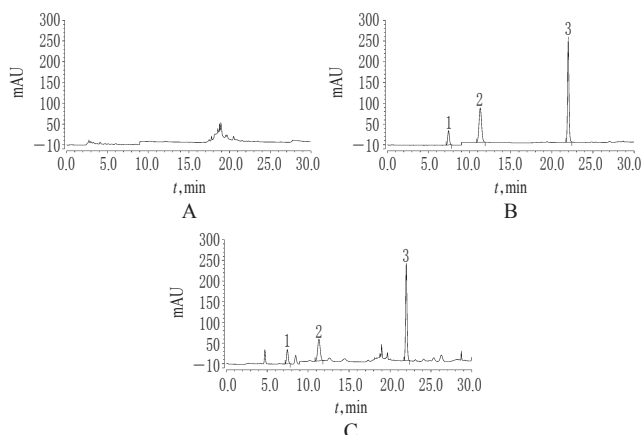


图1 高效液相色谱图

A. 阴性溶液; B. 混合对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 绿原酸; 2. 葛根素; 3. 黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative solution; B. mixed control; C. test sample; 1. chlorogenic acid; 2. puerarin; 3. baicalin

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下绿原酸对照品贮备液、葛根素对照品贮备液、黄芩苷对照品贮备液各适量,加水制成不同系列浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述溶液10 μl,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以检测质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程及线性范围见表2。

表2 回归方程及线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
绿原酸	$y=33.164x-9.8374$	0.9999	3.7~37.5
葛根素	$y=56.914x-12.011$	0.9999	7.8~78.4
黄芩苷	$y=46.773x+6.083$	0.9999	15.6~155.8

2.5 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。结果,绿原酸、葛根素、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.08%、0.06%、0.08%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:ZJ12008)适量,分别室温密闭放置0、2、4、6、8、10、12 h时,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定。结果,绿原酸、葛根素、黄芩苷峰面积的RSD分别为2.37%、0.10%、2.98%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:ZJ12008)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定。结果,绿原酸、葛根素、黄芩苷峰面积的RSD分别为1.11%、0.32%、3.41%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

称取已知含量的样品(批号:ZJ12008),共9份,分别取“2.2.1”项下绿原酸对照品贮备液0.8、1.0、1.2 ml,葛根素对照品贮备液3.0、4.0、5.0 ml,黄芩苷对照品贮备液2.5、3.0、3.5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定并计算加样回收率,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	称样量, g	所含量, 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	0.547 1	0.349	0.375	0.731	102.0	98.9	1.51
	0.664 3	0.423	0.375	0.795	99.2		
	0.531 8	0.339	0.375	0.703	97.1		
	0.575 2	0.366	0.468	0.832	99.4		
	0.560 0	0.357	0.468	0.820	99.0		
	0.482 8	0.308	0.468	0.768	98.4		
	0.538 8	0.343	0.562	0.905	99.9		
	0.575 3	0.366	0.562	0.913	97.2		
	0.545 6	0.367	0.562	0.919	98.2		
	0.547 1	0.846	0.588	1.432	99.6		
葛根素	0.664 3	1.028	0.588	1.614	99.7	100.6	1.34
	0.531 8	0.823	0.588	1.415	100.8		
	0.575 2	0.890	0.784	1.688	101.8		
	0.560 0	0.866	0.784	1.663	101.6		
	0.482 8	0.747	0.784	1.543	101.5		
	0.538 8	0.834	0.980	1.831	101.8		
	0.575 3	0.890	0.980	1.879	100.9		
	0.545 6	0.890	0.980	1.849	97.8		
	0.547 1	1.320	0.974	2.264	96.9		
	0.664 3	1.603	0.974	2.593	101.6		
黄芩苷	0.531 8	1.283	0.974	2.286	103.0	101.6	2.69
	0.575 2	1.388	1.169	2.571	101.2		
	0.560 0	1.351	1.169	2.566	103.9		
	0.482 8	1.165	1.169	2.367	102.8		
	0.538 8	1.300	1.363	2.699	102.7		
	0.575 3	1.388	1.363	2.814	104.6		
	0.545 6	1.389	1.363	2.643	97.3		

2.9 样品含量测定

取7批感冒止咳颗粒样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定,计算3种成分的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 4 Content determination of sample(mg/g, n=3)

批号	绿原酸	葛根素	黄芩苷
ZJ12008	0.637	1.547	2.413
ZJ12009	0.686	1.729	2.073
ZHB1303	0.859	1.979	3.027
ZJB1311	1.045	2.064	2.954
131005	0.467	0.590	2.624
1312204	0.289	0.578	2.724
20130901	0.715	0.990	2.919

3 讨论

3.1 流动相的选择

感冒止咳颗粒中绿原酸、黄芩苷在碱性条件下不稳定。有研究报道了绿原酸、葛根素和黄芩苷的检定方法^[2-9],分别比较了以乙腈-0.2%磷酸溶液、甲醇-1.8%磷酸溶液、甲醇-0.2%磷酸溶液、甲醇-ph2.6磷酸溶液、甲醇-1%醋酸溶液等为洗脱溶剂,同时比较了流速分别为0.8、1.0 ml/min,柱温分别为25、30℃时各成分的分度。发现当流速为0.8 ml/min,柱温为25℃,流动相为甲醇-ph2.6磷酸溶液,采用梯度洗脱时,各成分分度均较好。

3.2 提取溶剂的选择

笔者通过比较乙醇、30%乙醇、70%乙醇、甲醇、30%甲醇、70%甲醇等不同溶剂对样品提取的效果,发现甲醇、30%甲醇、70%甲醇的提取效果均较好,但甲醇、70%甲醇均影响各成分的分度及峰型,故选择30%甲醇为提取溶剂。

3.3 提取方法的选择

在本研究中笔者分别观察了超声提取、回流提取样品,结果表明两种提取方法测得的各成分含量均无明显差异,但超声提取更简便、快捷,故选择超声提取。同时又比较了超声提取15、30、45、60 min时各成分的含量,发现当超声提取30 min时各成分含量无明显变化,故选择超声提取30 min。

3.4 检测波长的选择

笔者分别对绿原酸、葛根素、黄芩苷进行全波长扫描,发现绿原酸、葛根素、黄芩苷的最大吸收波长分别在327、250、280 nm处。如在同一波长下检测将损失某些成分的检测灵敏度,故选择多波长切换HPLC法,分别在各成分最大紫外吸收波长处进行检测,使各成分在相应波长下有最大吸收。

3.5 样品含量测定结果

本研究对4个厂家7批感冒止咳颗粒进行测定,绿原酸、葛根素、黄芩苷的含量在0.289~1.045、0.578~2.064、2.073~3.027 mg/g范围内,相同厂家不同批次间的含量值较接近,不同厂家之间含量差距较大,可能与不同厂家的原料来源和制备工艺不同的有关。

综上所述,本方法简便、快速、重复性好,可用于感冒止咳颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:1 183.
- [2] 王艳萍, 赵琪钟, 卫舒帆. RP-HPLC法测定感冒止咳糖浆中绿原酸的含量[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(9):65.
- [3] 王静, 常新全, 刘俐纯, 等. HPLC测定感冒止咳颗粒剂中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(3):206.
- [4] 唐德智. RP-HPLC测定复方感冒止咳颗粒中绿原酸含量[J]. 海峡药学, 2009, 21(7):79.
- [5] 刘海霞, 杨志伟, 邹文斌. HPLC法测定感冒止咳颗粒中葛根素的含量[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(5):52.
- [6] 李正国, 李兰忠, 张爱琴. HPLC法测定感冒止咳糖浆中葛根素的含量[J]. 山东医药工业, 2001, 20(4):14.
- [7] 王明江, 郑国平. 感冒止咳颗粒葛根素含量测定[J]. 医药导报, 2009, 28(2):241.
- [8] 王燕, 钟韶霞. 高效液相色谱法测定感冒止咳颗粒中黄芩苷的含量[J]. 分析科学学报, 2008, 24(4):488.
- [9] 赵士治, 冯秀珍. 高效液相色谱法测定感冒止咳颗粒中黄芩苷含量[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(12):11.
- [10] 李坚, 王玉紫, 陈作环, 等. HPLC法测定感冒止咳颗粒中连翘苷的含量[J]. 湖北医药学院学报, 2011, 30(5):520.
- [11] 蒋荣珍, 陈琨凤, 黎强. HPLC法测定感冒止咳糖浆中连翘苷的含量[J]. 广西中医学院学报, 2006, 9(2):69.

(收稿日期:2014-06-04 修回日期:2014-08-23)