

HPLC法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量

彭明丽*, 赵冠人#, 温筱煦(解放军第309医院药剂科, 北京 100091)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0837-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.41

摘要 目的:建立同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为35℃,黄芩苷和绿原酸检测波长为327 nm,木犀草素检测波长为360 nm,进样量为10 μl。结果:黄芩苷、木犀草素、绿原酸质量浓度分别在10.10~202.00、0.10~2.04、0.50~9.96 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.9997$ 、 0.9996 、 0.9997);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;平均加样回收率分别为97.98%、98.15%、97.22%,RSD分别为0.04%、0.70%、0.95%($n=6$)。结论:该方法简便、稳定、重复性好,可用于茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;茵栀黄颗粒;黄芩苷;木犀草素;绿原酸

Simultaneous Determination of Baicalin, Luteolin and Chlorogenic Acid in Yinzhihuang Granules by HPLC

PENG Ming-li, ZHAO Guan-ren, WEN Xiao-xu (Dept. of Pharmacy, No. 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of baicalin, luteolin and chlorogenic acid in Yinzhihuang granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 ml/min (gradient elution). The column temperature was 35℃. The detection wavelength was set at 327 nm for baicalin and chlorogenic acid, and 360 nm for luteolin. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range was 10.10-202.00 μg/ml for baicalin ($r=0.9997$), 0.10-2.04 μg/ml for luteolin ($r=0.9996$) and 0.50-9.96 μg/ml for chlorogenic acid ($r=0.9997$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 1.0%. Average recoveries were 97.98% (RSD=0.04%, $n=6$), 98.15% (RSD=0.70%, $n=6$) and 97.22% (RSD=0.95%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The developed method is simple, stable and reproducible, and can be used for the content determination of baicalin, luteolin and chlorogenic acid in Yinzhihuang granules.

KEYWORDS HPLC; Yinzhihuang granules; Baicalin; Luteolin; Chlorogenic acid

茵栀黄颗粒是由茵栀黄口服液经剂型改革而成,其处方包括茵陈提取物、栀子提取物、黄芩提取物、金银花提取物^[1],主要功效为清热解暑、利湿退黄,临床上主要用于黄疸性肝炎的治疗^[2]。其中,黄芩苷是茵栀黄颗粒中主药黄芩的主要有效

成分,木犀草素和绿原酸是金银花的主要有效成分,三者都具有抗炎、抗菌、抗氧化的作用^[3-5]。2010年版《中国药典》对该药中的黄芩苷和栀子苷进行了质量控制,木犀草素和绿原酸均未被纳入其中。已有的文献报道,有单独对黄芩苷和木犀草

- 研究[J].国外医学:寄生虫病分册,1994,21(5):234.
- [5] 刘美欣,张毅. 外用抗菌剂的比较[J]. 国外医药:抗生素分册,2003,1(24):39.
- [6] 宋如,彭敬梅,张健,等. 高效液相色谱法测定杆菌肽的含量[J]. 河北化工,2009,32(9):701.
- [7] 佟斌,吴兆亮. 高效液相色谱法测定饲料中硫酸粘杆菌素含量[J]. 中国饲料,2007,(5):39.
- [8] Gmur DJ, Bredl CR, Steele SJ, et al. Determination of polymyxin E1 in rat plasma by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 789(2):365.
- [9] 林维宣,孙兴权,田苗,等. 动物组织中粘杆菌素、杆菌肽及维吉尼霉素残留量的液相色谱-串联质谱检测[J]. 分析测试学报,2009,28(2):212.
- [10] 张玉明,倪志华,李琳,等. 高效液相色谱法测定发酵液中杆菌肽A[J]. 理化检验:化学分册,2011,47(5):592.
- [11] British Pharmacopoeia Commission. *BP* 2011[S]. 2011:209-212.
- [12] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia* 2010[S]. 2010:1 440-1 443.
- [13] Pavli V, Kmetec V. Optimization of HPLC method for stability testing of bacitracin[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24(5/6):977.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:325-326.
- (收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-12-27)
(编辑:陈宏)

* 主管药师,博士。研究方向:药物分析。电话:010-66775321。E-mail: pengmingli9@126.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:010-66775335。E-mail: yanliqun@sohu.com

苷进行含量测定的^[6-7],但同时测定该制剂中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量尚未见报道。为此,在本研究中笔者采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量,以为分析和控制茵栀黄颗粒的质量、提高及完善其质量标准提供参考。

1 材料

LC-20AT 高效液相色谱仪,包括 LC-20AT 双泵、SPD-M20A 二极管阵列检测器、CTO-20A 柱温箱、SIL-20A 自动进样器(日本 Shimadzu 公司);XP105DR 电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);5417R 台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);VDRTEX-5 型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);KQ-300GVDV 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

黄芩苷、木犀草素、绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201117、111520-200504、110753-201314;纯度均>98%);茵栀黄颗粒(鲁南厚普制药有限公司,批号:00913270、00913272、00913275);乙腈、磷酸为色谱纯(美国 Dikma 公司),水为 Millipore 系统制备的超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液,采用梯度洗脱,梯度洗脱程序详见表1;黄芩苷和绿原酸检测波长:327 nm,木犀草素检测波长:360 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:35℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,黄芩苷、木犀草素、绿原酸色谱峰的理论板数均不低于3000,3个成分分离良好,色谱见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	乙腈, %	0.2%磷酸溶液, %
0	16	84
20	26	74
35	26	74
37	43	57
52	51	49

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取黄芩苷、木犀草素、绿原酸对照品适量,加甲醇分别配制成黄芩苷质量浓度为202.00 μg/ml、木犀草素质量浓度为2.04 μg/ml、绿原酸质量浓度为9.96 μg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取茵栀黄颗粒适量,研细,精密称定0.5 g置于锥形瓶中,加甲醇10 ml,称定质量,超声(功率:300 W,频率:50 kHz)处理30 min,冷却至室温,甲醇补足损失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例及制备工艺,制备2份阴性样品,分别不含黄芩、不含金银花,按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,分别定量稀释制备成系列混合标准溶液,黄芩苷、木犀草素、绿原酸质量浓度分别为10.10、25.25、50.50、101.00、161.60、202.00 μg/ml,0.10、0.26、0.51、1.02、1.63、2.04 μg/ml,0.50、1.25、2.49、4.98、7.97、9.96 μg/ml,按“2.1”项下色谱条件进样。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程和线性范围见表2。

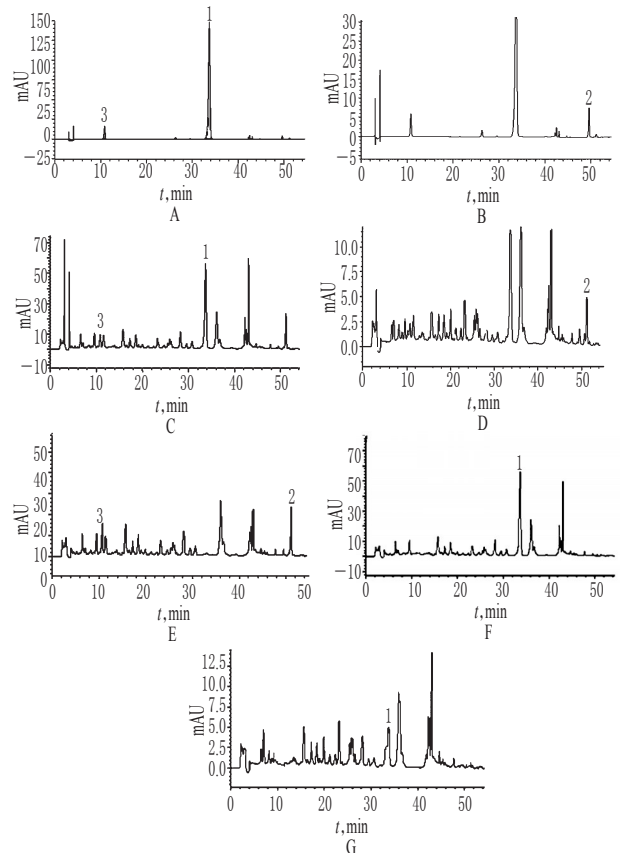


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液(327 nm);B.对照品溶液(360 nm);C.供试品溶液(327 nm);D.供试品溶液(360 nm);E.不含黄芩的阴性对照溶液;F.不含金银花的阴性对照溶液(327 nm);G.不含金银花的阴性对照溶液(360 nm);1.黄芩苷;2.木犀草素;3.绿原酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control solution (at 327nm); B. substance control solution (at 360 nm); C. test sample solution (at 327 nm); D. test sample solution (at 360 nm); E. negative control solution without baicalin; F. negative control solution without *Lonicera japonica* (at 327 nm); G. negative control solution without *Lonicera japonica* (at 360 nm); 1. luteolin; 2. luteolin; 3. chlorogenic acid

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
黄芩苷	$y=2.66 \times 10^{-3}x+1.37$	10.10~202.00	0.999 7
木犀草素	$y=1.53 \times 10^{-3}x+1.51 \times 10^{-2}$	0.10~2.04	0.999 6
绿原酸	$y=1.74 \times 10^{-3}x+8.97 \times 10^{-2}$	0.50~9.96	0.999 7

2.4 精密度试验

取茵栀黄颗粒(批号:00913270)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6次,测定峰面积。结果,黄芩苷、木犀草素和绿原酸峰面积的RSD分别为0.77%、0.22%、0.59%,表明该方法的精密度良好。

2.5 稳定性试验

取茵栀黄颗粒(批号:00913270)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别置于室温下存放0、3、6、9、12、24 h后,按“2.1”项下色谱条件进样,测定峰面积。结果,黄芩苷、木犀草素和绿原酸峰面积的RSD分别为0.94%、0.35%、0.81%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取茵栀黄颗粒(批号:00913270)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样6次,按外标法计算各成分含量。结果,黄芩苷、木犀草素和绿原酸含量分别为61.08 mg/g、40.35 μg/g、6.41 mg/g, RSD分别为0.91%、0.52%、0.76%,表明该方法的重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取茵栀黄颗粒(批号:00913270)0.5 g精密称定,置于10 ml容量瓶中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,取续滤液800 μl,精密加入“2.2.1”项下对照品溶液适量,涡旋混匀1 min,按“2.1”项下色谱条件进样分析,平行操作6份,按外标法计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery test(n=6)

待测成分	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,%
黄芩苷	19.80	25.62	45.02	97.97	97.98	0.04
	19.81	25.62	45.03	97.98		
	19.81	25.62	45.02	97.93		
	19.80	25.62	45.02	97.97		
	19.80	25.62	45.03	98.03		
	19.81	25.62	45.04	98.04		
木犀草素	0.03	0.04	0.07	99.01	98.15	0.70
	0.03	0.04	0.07	97.32		
	0.03	0.04	0.07	98.89		
	0.03	0.04	0.07	97.95		
	0.03	0.04	0.07	97.52		
	0.03	0.04	0.07	98.23		
绿原酸	1.62	2.32	3.87	95.67	97.22	0.95
	1.61	2.32	3.90	98.13		
	1.60	2.32	3.89	98.12		
	1.61	2.32	3.88	96.89		
	1.62	2.32	3.89	96.91		
	1.63	2.32	3.91	97.54		

2.8 样品含量测定

取3批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行操作3份,分别吸取10 μl进样,测定各成分峰面积,按外标法计算黄芩苷、木犀草素、绿原酸的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=3,mg/g)

批号	黄芩苷	木犀草素	绿原酸
00913270	59.99	0.04	5.03
00913272	57.43	0.03	4.39
00913275	65.21	0.05	5.21

3 讨论

3.1 提取条件的优化

本试验根据3种成分的理化性质分别对提取溶剂和提取方式进行了考察。在提取溶剂方面,比较了75%甲醇、甲醇、含1%盐酸的甲醇溶液的提取效果。结果显示,75%甲醇提取液中杂质成分过多,峰形混乱,不利于含量计算;而后二者作为溶剂时,其提取液的目标化合物成分的含量差异不大。考

虑到简化操作和色谱柱保护因素,最终选择甲醇作为提取溶剂。在提取方式方面,对比了超声提取和微波提取,结果显示,超声提取在特定时间内效果远优于微波提取,且耗时较短。基于节省时间和试剂的考虑,最终选择超声提取。

3.2 流动相的选择

笔者对比了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸溶液等流动相系统以及流动相不同配比条件,最终选择乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱)为本研究的流动相。流动相中的磷酸可以有效抑制目标成分的拖尾现象,提高峰形对称性。需要注意的是,黄芩苷在酸性条件下易析出,故每次进样前需将供试品溶液充分摇匀^[9]。

3.3 检测波长的选择

黄芩苷的最大吸收波长为280 nm^[9]。预试验表明,黄芩苷在供试品溶液中含量较高,且在327 nm波长处有肩峰,因此选择绿原酸最大吸收波长327 nm作为二者的检测波长^[10];木犀草素在供试品溶液中含量较低,紫外光谱扫描表明其在327 nm波长处吸光强度较低,因此选择木犀草素的检测波长为360 nm。

综上所述,该方法简便、稳定、重复性好,可用于茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:871-872.
- [2] 李仙义,张雷,袁海龙,等. 顶空气相色谱法检测茵栀黄提取物中苯系列残留物[J]. 中国中药杂志,2003,28(7):672.
- [3] 颜明,刘洁婷,李洪志,等. 黄芩苷对H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及其对Trx表达的影响[J]. 中国生化药物杂志,2012,33(5):574.
- [4] 张毅,王旭光. 木犀草素的体外抗炎机制研究[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(13):231.
- [5] Shan J, Fu J, Zhao Z, et al. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappa B and JNK/AP-1 activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(9):1 042.
- [6] 徐晓光,程仁刚,于晓蕾. HPLC法测定茵栀黄颗粒中黄芩苷的含量[J]. 齐鲁药事,2004,23(6):29.
- [7] 王瑞芬. HPLC测定茵栀黄颗粒中木犀草苷的含量[J]. 中国药师,2012,15(3):389.
- [8] 胡茂华,钟玲,黄晓玉,等. HPLC法同时测定蓝芩口服液盐酸小檗碱与黄芩苷的含量[J]. 重庆医科大学学报,2009,34(2):210.
- [9] 陈艳梅. HPLC法测定七香胃舒胶囊中黄芩苷的含量[J]. 中国药师,2012,15(9):1 427.
- [10] 孟建升. HPLC法测定退热快口服液中绿原酸的含量[J]. 中国药师,2012,15(5):725.

(收稿日期:2014-08-02 修回日期:2015-01-07)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅