

HPLC 同时测定鱼腥草芩蓝合剂中 3 种活性成分的含量

邓茂芳¹, 程维明^{2*} (1. 浙江医学高等专科学校, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定鱼腥草芩蓝合剂中绿原酸、黄芩苷和黄芩素的含量。方法 采用 Kromasil-100 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2%磷酸梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 322 nm, 柱温为 35 ℃。结果 绿原酸、黄芩苷和黄芩素线性范围分别为 0.022 4~1.12 μg($R^2=0.999\ 7$), 0.045 8~2.29 μg($R^2=0.999\ 5$)和 0.031 8~1.59 μg($R^2=0.999\ 9$); 3 种成分的平均回收率分别为 99.45%(RSD=1.4%), 99.37%(RSD=2.0%)和 97.90%(RSD=1.7%)。结论 本方法快速简便, 精密度高, 稳定性和重复性好, 可用于鱼腥草芩蓝合剂中绿原酸、黄芩苷和黄芩素 3 种成分的定量分析和药品质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 绿原酸; 黄芩苷; 黄芩素

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)05-0589-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.018

Simultaneous Determination of Three Ingredients in Yuxingcao Qinlan Mixtures by HPLC

DENG Maofang¹, CHENG Weiming^{2*} (1. Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin and baicalein in *Yuxingcao Qinlan Mixtures*. **METHODS** HPLC conditions included Kromasil-100 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and the mobile phase was a mixture of methanol and 0.1% phosphoric acid for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The wavelength was 322 nm and column temperature was 35 ℃. **RESULTS** Three ingredients had good linear relationships: in the range of 0.022 4~1.12 μg($R^2=0.999\ 7$), baicalin in the range of 0.045 8~2.29 μg($R^2=0.999\ 5$) and baicalein in the range of 0.031 8~1.59 μg($R^2=0.999\ 9$). Their average recoveries were 99.45%(RSD=1.4%), 99.37%(RSD=2.0%) and 97.90%(RSD=1.7%), respectively. **CONCLUSION** This method was simple with high precision, good repeatability and stability. It could be used for the determination of the three ingredients and quality control of *Yuxingcao Qinlan Mixtures*.

KEY WORDS: HPLC; chlorogenic acid; baicalin; baicalein

鱼腥草芩蓝合剂为中药制剂, 该药为复方鱼腥草片剂的改良产品, 由鱼腥草、黄芩、连翘、板蓝根和金银花 5 味传统中药组成, 具有清热解毒功效, 临床上常用于治疗外感风热引起的发热、咽喉疼痛、急性咽炎、扁桃腺炎等症^[1]。绿原酸、黄芩苷和黄芩素是鱼腥草芩蓝合剂的主要活性成分, 具有抗炎、抗菌等作用^[2-11]。目前为止, 文献中尚未发现有同时测定绿原酸、黄芩苷和黄芩素 3 种成分含量的报道。为了控制产品质量, 保证药物疗效, 本研究运用 HPLC 梯度洗脱法对绿原酸、黄芩苷和黄芩素的含量进行同时测定。

1 仪器与材料

Agilent HP-1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配备 G1313A 自动进样系统, G1316A 柱温箱, G1314F 1260 紫外检测器,

G1311A 四元泵和 G1322A 脱气装置; pa2251 电子分析天平 (德国 Sartorius); Centrifuge 5430R 型高速离心机 (美国 Eppendorf); 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸、黄芩苷和黄芩素对照品 (中国药品生物制品检验研究院, 批号依次为 110753-200212、10309-0001 和 111595-200301, 纯度依次为 99.2%, 99.5% 和 98.5%); 鱼腥草芩蓝合剂 (浙江惠松制药股份有限公司, 批号为 130601, 130603 和 130604, 规格: 15 mL·支⁻¹); 甲醇为色谱纯; 水为 Mili-Q 纯化水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

Kromasil-100 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A)-0.1% 的磷酸溶液 (B), 流

作者简介: 邓茂芳, 男, 副教授 Tel: (0571)87692627 E-mail: dmf945@163.com
(0571)86459425 E-mail: weiming22@tom.com

*通信作者: 程维明, 男, 博士, 主管药师 Tel:

速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；检测波长为 322 nm ；柱温为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；梯度洗脱： $0\sim 10\text{ min}$ ， $25\%\text{ A}$ ； $10\sim 25\text{ min}$ ， $25\%\sim 60\%\text{ A}$ ； $25\sim 35\text{ min}$ ， $60\%\text{ A}$ 。色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液配制

分别精密称取以五氧化二磷减压干燥 12 h 以上的绿原酸、黄芩苷和黄芩素 3 种对照品 22.41 ， 22.93 ， 31.84 mg ，分别置 50 mL 量瓶中，制备成浓度分别为 0.448 2 ， 0.458 5 ， $0.636\text{ 8 mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液，分别取上述储备液各 1.0 ， 2.0 和 1.0 mL 至 20 mL 棕色量瓶中，用 70% 乙醇定容成浓度分别为 22.41 ， 45.85 ， $31.84\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取鱼腥草蓝草合剂(批号：130601) 1 mL 置 10 mL 棕色量瓶中，加入 70% 甲醇 6 mL ，超声 30 min 后，冷却至室温，用 70% 甲醇稀释至刻度，摇匀， $12\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min ，取上清液作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

绿原酸为金银花中主要成分，黄芩苷、黄芩素为黄芩的主要活性成分，亦为黄芩药材质量控制的主要成分。按“2.3”项下方法，除掉金银花和黄芩 2 味药材，制备阴性对照溶液。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1 ， 2 ， 5 ， 10 ， 20 ， 30 ， $50\text{ }\mu\text{L}$ 依次注入高效液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件进样分析，测定峰面积，以峰面积积分值为纵坐标，以进样量(μg)为横坐标进行线性回归，得回归方程见表 1。结果表明：绿原酸、黄芩苷和黄芩素在各自的线性范围内，其峰面积积分与进样量呈现出良好的线性关系。

表 1 3 种成分的回归方程和线性范围

Tab. 1 Linear regression equation and linear ranges of the three ingredients

成分	回归方程	相关系数(R^2)	线性范围/ μg
绿原酸	$Y=6.22X-1.47$	0.999 7	0.022 4~1.12
黄芩苷	$Y=9.37X-3.08$	0.999 5	0.045 8~2.29
黄芩素	$Y=8.04X-2.69$	0.999 9	0.031 8~1.59

2.6 仪器精密度试验

精密吸取同一对照品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ ，连续进样 6 次，分别测得绿原酸、黄芩苷和黄芩素的峰面积积分值，以峰面积积分值计算 3 种成分的 RSD ($n=6$)分别为 0.1% ， 0.5% 和 0.2% ，表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一批号(130601)供试品溶液，分别在 0 ， 2 ， 4 ， 8 ， 12 ， 16 ， 24 h 进样，记录峰面积值，测得 3 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.9% ， 1.2% 和 1.5% ，表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性较好。

2.8 重复性试验

精密量取同一批号(130601)供试品，按“2.3”项下方法制得 6 份供试品溶液，各自进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ ，根据供试品溶液中 3 种成分各自的峰面积值，计算得到绿原酸、黄芩苷和黄芩素 3 种成分 RSD 值依次为 1.3% ， 1.0% 和 1.7% 。说明本方法有较好的重复性。

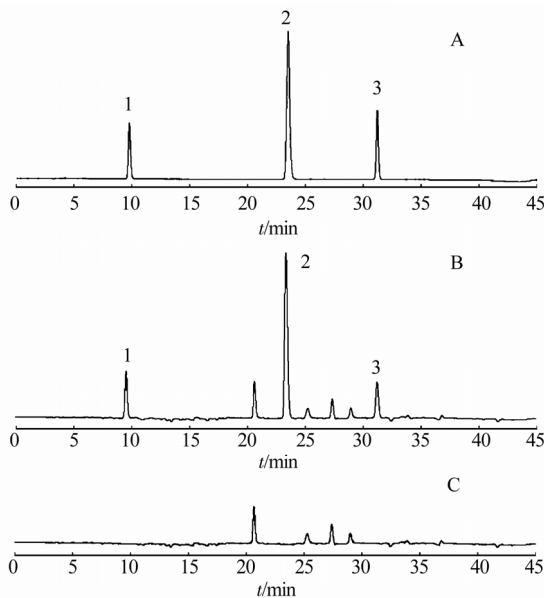


图 1 高效液相色谱图

A—混合对照品；B—鱼腥草蓝草合剂样品；C—阴性对照；1—绿原酸；2—黄芩苷；3—黄芩素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A—three ingredients mixture; B—Yuxingcao Qinlan mixtures; C—negative control; 1—chlorogenic acid; 2—baicalin; 3—baicalein.

2.9 加样回收率试验

精密量取鱼腥草蓝草合剂(批号：130601) 1 mL 置 20 mL 棕色量瓶中，加入 70% 甲醇 12 mL ，精密加入各对照品储备液分别为 0.5 ， 1.0 和 0.5 mL 至 20 mL 棕色量瓶中，按“2.3”项下供试品溶液制备方法操作，制得 6 份供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行测定，根据测得的峰面积积分值分别计算绿原酸、黄芩苷和黄芩素的回收率。平均加样回收率分别为 99.45% ， 99.37% 和 97.90% ，RSD 分别为 1.4% ， 2.0% 和 1.7% ，结果表明本方法的加样回收率较好，符合方法学要求。见表 2。

表 2 加样回收率实验结果(n=6)

Tab. 2 Recovery results of the three ingredients(n=6)

成分	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	0.240 5	0.224 1	0.467 3	101.1	99.45	1.4
	0.241 0	0.224 1	0.461 0	98.3		
	0.239 7	0.224 1	0.463 1	99.7		
	0.241 2	0.224 1	0.462 2	98.7		
	0.241 7	0.224 1	0.463 8	99.2		
黄芩苷	0.238 4	0.224 1	0.461 7	99.7	99.37	2.0
	0.430 6	0.458 5	0.879 6	97.8		
	0.427 8	0.458 5	0.882 1	99.0		
	0.430 1	0.458 5	0.883 2	98.7		
	0.429 5	0.458 5	0.888 3	100.1		
黄芩素	0.424 0	0.458 5	0.887 0	101.1	97.90	1.7
	0.429 9	0.458 5	0.886 1	99.5		
	0.347 1	0.318 4	0.660 5	98.6		
	0.341 4	0.318 4	0.6523	97.8		
	0.342 2	0.318 4	0.657 9	99.2		
黄芩素	0.339 2	0.318 4	0.652 1	98.4		
	0.339 8	0.318 4	0.649 5	97.4		
	0.340 1	0.318 4	0.660 6	96.0		

2.10 样品含量测定

利用本试验建立的 HPLC, 测定同一厂家 3 个不同批号的鱼腥草芩蓝合剂。以外标法计算样品中绿原酸、黄芩苷和黄芩素的含量, 结果见表 3。

表 3 鱼腥草芩蓝合剂 3 批样品含量测定结果

Tab. 3 Contents determination of the three ingredients in 3 batches

批号	绿原酸	黄芩苷	黄芩素
130601	0.465 1	0.881 4	0.640 6
130603	0.467 7	0.887 0	0.651 5
130604	0.470 3	0.873 6	0.649 8

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择

在选择提取方法时, 分别考察了提取溶剂(甲醇、70%甲醇、纯水)、提取方式(超声、回流)以及提取时间(20, 30, 40 min)对提取效率的影响。实验结果显示, 70%甲醇超声提取 30 min 为最优提取方案。

3.2 吸收波长的选择

根据紫外分光光度法, 在 200~400 nm 内进行扫描, 结果绿原酸紫外最大吸收波长在 327 nm 左右, 黄芩苷和黄芩素在 315~327 nm 间有一个较强的吸收波长, 兼顾三者的吸收度及各组分间情况, 最终选择 322 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择

试验前分别考察了以甲醇-磷酸溶液和乙腈-磷酸溶液作为流动相的分离效果, 流动相为乙腈-

磷酸溶液的峰形出现重叠, 而以甲醇-磷酸溶液为流动相的峰形无重叠, 分离度较好。在综合考虑峰形、保留时间、拖尾因子、理论板数等因素, 最终选择甲醇-0.2%磷酸溶液进行梯度洗脱。

3.4 色谱柱和柱温的选择

在色谱柱选择方面, 分别从峰形、保留时间等方面比较了 Zorbax SB-C₁₈、Hypersil-C₁₈、Eclipse-C₁₈、Kromasil-100 C₁₈、Extend-C₁₈ 和 Welch Material XB-C₁₈ 柱的分离效果, 同时还考察了柱温分别在 25, 35, 45 °C 时, 3 种色谱峰的分离情况。结果显示, Kromasil-100 C₁₈ 柱在 35 °C 柱温的分离效果最佳。

本法能让鱼腥草芩蓝合剂中 3 种活性成分得到较好的分离, 经方法学验证, 该方法快速简便, 精密度高, 稳定性和重复性好, 测定数据稳定, 可用于鱼腥草芩蓝合剂中绿原酸、黄芩苷和黄芩素的同时测定, 为该药的质量控制提供了一种良好的监测方法。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 917.
- [2] HUANG Y, SU Y, CHEN L, et al. Experimental study of Flos Chrysanthemi Indici particles on the effects of anti-inflammation and analgesia [J]. J Gansu Coll Tradit Chin Med(甘肃中医学院学报), 2009, 26(5): 5-8.
- [3] XIN W Y, SONG J K, HE G R, et al. Progress in pharmacological study and the underlying mechanism of baicalein and baicalin [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2013, 22(6): 647-659.
- [4] LIU H M, ZHANG Y, YANG F W, et al. Simultaneous determination of eight components in Xiaoe Jiebiao granules by HPLC and principal component analysis [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2014, 34(15): 1302-1305.
- [5] SHU J F. Determination of scopoletin, baicalin, baicalein and farrerol in Qinbaohong Zhike capsule by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1114-1117.
- [6] 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用[M]. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 972-982.
- [7] YU Y, XU J, XIU L L, et al. Determination of three kinds of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* purified by macroporous absorption [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(10): 1107-1110.
- [8] XIE Q, ZHONG D F, CHEN X Y. Metabolites of injected chlorogenic acid in rats [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2011, 59(1): 88-95.
- [9] LI Q N, GE X Q. Effect of baicalin on antipyresis and influence on cytokine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 56(8): 1068-1072.
- [10] 吴钊红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展 [J]. 中药材, 2009, 27(2): 142.
- [11] FENG R T, LU Y J, BOWMAN L L, et al. Inhibition of activator protein-1, NF-kappa B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid [J]. J Boil Chem, 2005, 280(30): 27888-27895.

收稿日期: 2014-10-08