

HPLC 双波长法同时测定炎热清片中 6 种有效成分的含量

邓俊杰(绍兴市食品药品检验研究院, 浙江 绍兴 312088)

摘要: 目的 建立 HPLC 双波长法同时测定炎热清片中龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 6 种成分的含量。方法 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇:0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱), 柱温为 35 ℃, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 0~20 min 为 254 nm, 同时检测龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷, 20~50 min 为 280 nm, 同时检测黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素。结果 龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素分别在 18.92~189.2 ng($r=0.999\ 9$), 107.44~1 074.4 ng($r=0.999\ 9$), 9.82~98.2 ng($r=0.999\ 9$), 767.68~7 676.8 ng($r=1.000\ 0$), 100.94~1 009.4 ng($r=0.999\ 9$), 49.84~498.4 ng($r=0.999\ 9$) 线性良好, 平均回收率($n=9$) 分别为 98.31%, 98.35%, 98.40%, 98.03%, 98.46%, 98.24%, RSD 分别为 0.4%, 0.3%, 0.3%, 0.4%, 0.4%, 0.3%。结论 该方法灵敏、简便、准确, 可用于炎热清片的质量控制。

关键词: 炎热清片; 龙胆苦苷; 栀子苷; 芒果苷; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2018)09-1329-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.09.013

引用本文: 邓俊杰. HPLC 双波长法同时测定炎热清片中 6 种有效成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1329-1332.

Simultaneous Determination of Six Components in Yanreqing Tablets by Double-wavelength HPLC

DENG Junjie(*Shaoxing Institute for Food and Drug Control, Shaoxing 312088, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a new double-wavelength HPLC method for simultaneous determination of 6 main components in Yanreqing tablets. **METHODS** The method was performed on an Agilent TC-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of methanol-0.2% phosphoric acid by gradient elution at 35 ℃ column temperature. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 254 nm for gentiopicroside, geniposide, mangiferin at 0~20 min, and 280 nm for baicalin, baicalein, wogonin at 20~50 min. **RESULTS** Gentiopicroside, geniposide, mangiferin, baicalin, baicalein, wogonin showed a good linear relationship in the range of 18.92~189.2 ng($r=0.999\ 9$), 107.44~1 074.4 ng($r=0.999\ 9$), 9.82~98.2 ng($r=0.999\ 9$), 767.68~7 676.8 ng($r=1.000\ 0$), 100.94~1 009.4 ng($r=0.999\ 9$), 49.84~498.4 ng($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries were 98.31%, 98.35%, 98.40%, 98.03%, 98.46%, 98.24%, the RSD were 0.4%, 0.3%, 0.3%, 0.4%, 0.4%, 0.3%. **CONCLUSION** The method is sensitive, simple, accurate, and suitable for the quality control of Yanreqing tablets.

KEY WORDS: Yanreqing tablets; gentiopicroside; geniposide; mangiferin; baicalin; baicalein; wogonin; HPLC

炎热清片现行标准为国家药品监督管理局国家标准 YBZ13632005-2011Z-5, 处方由龙胆、栀子、知母、黄芩、玄参、石膏、柴胡、薄荷脑 8 味中药组成, 具有解表清里、清热解毒的功效。临床用于呼吸道炎、支气管炎、肺炎、急性扁桃体炎, 也可用于泌尿系统感染、胆道感染^[1-3]。

目前, 国家标准 YBZ13632005-2011Z-5 中只以黄芩苷 1 种成分作为指标考察制剂质量, 既缺少对以黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素为代表的总黄酮含量的研究, 也缺少对处方中其他组分药材的质控指标, 整体质量的控制尚显不足。本实验采用 HPLC 双波长法同时测定龙胆主要成分龙胆苦苷, 栀子主要成分栀子苷, 知母主要成分芒果苷, 黄芩主要成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素, 从 1

种成分的检测到同时检测 6 种成分, 较大幅度地提升整体质量标准, 经验证该方法灵敏、简便、准确, 可用于炎热清片的质量控制^[4-15]。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); UV-2550 型紫外可见分光光度计(岛津仪器有限公司); XPE 105 电子天平(Mettler Toledo 梅特勒-托利多公司); FESCO17 微量离心机(Termo 赛默飞世尔科技公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司)。

1.2 试药

龙胆苦苷(批号: 110770-201314; 含量以 100.0% 计), 栀子苷(批号: 110749-201316; 含量

以 97.5% 计), 芒果苷(批号: 111607-201503; 含量以 98.4% 计), 黄芩苷(批号: 110715-201318; 含量以 93.3% 计), 黄芩素(批号: 111595-201607; 含量以 98.5% 计), 汉黄芩素(批号: 111514-201605; 含量以 100.0% 计)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈(色谱纯, 美国天地试剂公司); 磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水; 炎热清片(吉林天药本草堂制药有限公司, 批号分别为 150304, 160509, 160704)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~15 min, 12%A; 15~42 min, 12%→15%A; 42~50 min, 50%→12%A); 柱温: 35 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 0~20 min 为 254 nm, 20~50 min 为 280 nm, 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取①龙胆苦苷对照品 9.46 mg, 置于 100 mL 量瓶中; ②栀子苷对照品 11.02 mg, 置于 20 mL 量瓶中; ③芒果苷对照品 12.47 mg, 置于 250 mL 量瓶中; ④黄芩素对照品 12.81 mg, 置于 25 mL 量瓶中; ⑤汉黄芩素对照品 12.46 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 分别加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品贮备液。再精密称取黄芩苷对照品 20.57 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入①~⑤号对照品储备液各 5.0 mL, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 制成混合对照品溶液, 龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量分别为 9.46, 53.72, 4.91, 383.84, 50.47, 24.92 μg·mL⁻¹(含量均已计算相应纯度)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量, 除去包衣, 研细, 混匀, 精密称取 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入 70% 甲醇 40 mL, 超声处理 30 min, 取出, 放冷至室温, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摆匀, 离心, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性供试品溶液制备 按处方组成及生产工艺, 分别制备缺龙胆、栀子、知母、黄芩的 4 种阴性供试品, 再按供试品溶液制备法制得阴性供试品溶液。

2.3 系统适应性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液和 4 种阴性供试品溶液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件注入

高效液相色谱仪, 记录色谱图。结果供试品色谱图中显示与对照品相同保留时间的色谱峰, 且各色谱峰分离度均>1.5, 阴性供试品溶液在此保留时间无色谱峰出现, 表明处方中其他成分对结果无干扰, 该方法系统适应性良好, 结果见图 1。

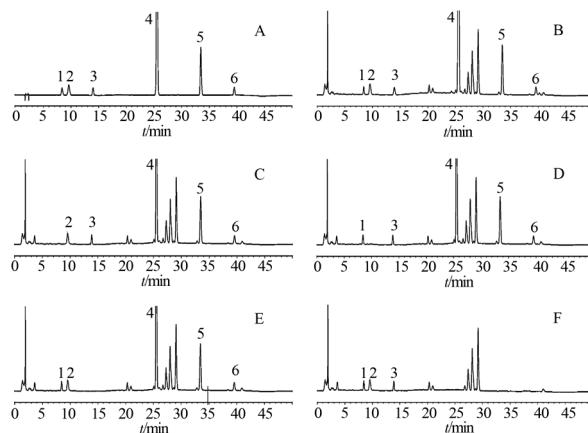


图 1 高效液相色谱图

A—混合对照品; B—供试品; C—缺龙胆阴性供试品; D—缺栀子阴性供试品; E—缺知母阴性供试品; F—缺黄芩阴性供试品; 1—龙胆苦苷; 2—栀子苷; 3—芒果苷; 4—黄芩苷; 5—黄芩素; 6—汉黄芩素。

Fig. 1 HPLC chromatogram

A—mixed reference substances; B—sample; C—negative sample without Gentianae Radix et Rhizoma; D—negative sample without Gardeniae Fructus; E—negative sample without Anemarrhenae Rhizoma; F—negative sample without Scutellariae Radix; 1—gentiopicroside; 2—geniposide; 3—mangiferin; 4—baicalin; 5—baicalein; 6—wogonin.

2.4 线性关系考察

分别精密量取混合品对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰而积。以峰面积为纵坐标(Y), 进样量为横坐标(X)绘制标准曲线, 计算得线性回归方程, 结果见表 1。

表 1 6 种成分的线性回归方程

Tab. 1 The regression curve of six components

成分	线性回归方程	线性范围/ng
龙胆苦苷	$Y=651.85X-0.68, r=0.999\ 9$	18.92~189.2
栀子苷	$Y=115.63X-1.46, r=0.999\ 9$	107.44~1 074.4
芒果苷	$Y=1\ 057.11X-0.88, r=0.999\ 9$	9.82~98.2
黄芩苷	$Y=607.11X-3.43, r=1.000\ 0$	767.68~7 676.8
黄芩素	$Y=587.57X-1.99, r=0.999\ 9$	100.94~1 009.4
汉黄芩素	$Y=223.37X-0.45, r=0.999\ 9$	49.84~498.4

2.5 仪器精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 每次进样 10 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 结果龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.1%, 0.3%, 0.2%, 0.2%, 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取6份同一批号供试品粉末(批号:160704),以供试品溶液制备法制备,按“2.1”项下色谱条件测定并计算,结果龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量分别为0.779,5.41,0.491,41.6,5.01,2.53 mg·g⁻¹,RSD分别为0.3%,0.1%,0.5%,0.4%,0.3%,0.2%,表明重复性较好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别在0,8,12,24,48 h,按“2.1”项下色谱条件测定并计算,结果龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素在不同时间点测得含量的RSD分别为0.3%,0.5%,0.6%,0.4%,0.5%,0.4%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

2.8.1 加标用对照品溶液的制备 精密称取①龙胆苦苷对照品20.24 mg;②芒果苷对照品12.72 mg,③汉黄芩素对照品64.32 mg分别置于10 mL量瓶中,加70%甲醇溶解并稀释至刻度,作为①、②、③储备液。再精密称取栀子苷对照品13.97 mg,黄芩苷对照品112.56 mg,黄芩素对照品12.87 mg,置于同一20 mL量瓶中,加入①、②、③储备液各1.0 mL,加70%甲醇溶解并稀释至刻度,制成加标用对照品溶液,龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量分别为0.101 2,0.681,0.062 6,5.251,0.634,0.321 6 mg·mL⁻¹。

2.8.2 加样回收率测定 取9份已知含量的同一批号供试品粉末(批号:160704),每份约0.25 g,精密称定,分置具塞锥形瓶中,3份为1组,分别加入加标用对照品溶液1.0,2.0,3.0 mL(约相当于样品含量的50%,100%,150%),以供试品溶液制备法制备,按上述色谱条件测定,并计算回收率,结果见表2。3组不同对照品加入量(*n*=9)间的平均回收率,龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素分别为98.31%,98.35%,98.40%,98.03%,98.46%,98.24%,RSD分别为0.4%,0.3%,0.3%,0.4%,0.4%,0.3%。

2.9 供试品含量测定

取3批供试品(150304,160509,160704)粉末各约0.5 g,精密称定,以供试品溶液制备法制备,按“2.1”项下色谱条件测定并计算含量,结果见表3。

表2 加样回收率试验测定结果(*n*=9)

Tab. 2 Results of recovery test(*n*=9)

成分	取样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测定结果/mg	回收率/%	组内平均%	RSD/%
龙胆苦苷	0.253 9	0.197 8	0.101 2	0.293 8	98.26	98.52	0.2
	0.254 8	0.198 5	0.101 2	0.295 5	98.60		
	0.252 5	0.196 7	0.101 2	0.294 0	98.69		
	0.253 8	0.197 7	0.202 4	0.392 9	98.20	98.35	0.5
	0.251 1	0.195 6	0.202 4	0.393 5	98.87		
	0.251 6	0.196 0	0.202 4	0.390 3	97.97		
	0.253 1	0.197 2	0.303 6	0.492 1	98.26	98.08	0.3
	0.252 2	0.196 5	0.303 6	0.491 5	98.28		
	0.255 9	0.199 3	0.303 6	0.491 3	97.69		
栀子苷	0.253 9	1.374	0.681	2.016	98.11	98.49	0.3
	0.254 8	1.378	0.681	2.033	98.74		
	0.252 5	1.366	0.681	2.019	98.63		
	0.253 8	1.373	1.362	2.699	98.68	98.26	0.4
	0.251 1	1.358	1.362	2.671	98.20		
	0.251 6	1.361	1.362	2.666	97.91		
	0.253 1	1.369	2.043	3.342	97.95	98.30	0.3
	0.252 2	1.364	2.043	3.353	98.42		
	0.255 9	1.384	2.043	3.377	98.54		
芒果苷	0.253 9	0.124 7	0.062 6	0.185 1	98.83	98.63	0.2
	0.254 8	0.125 1	0.062 6	0.184 9	98.51		
	0.252 5	0.124 0	0.062 6	0.183 9	98.55		
	0.253 8	0.124 6	0.125 2	0.244 6	97.92	98.19	0.3
	0.251 1	0.123 3	0.125 2	0.243 8	98.11		
	0.251 6	0.123 5	0.125 2	0.245 1	98.55		
	0.253 1	0.124 3	0.187 8	0.306 7	98.27	98.39	0.2
	0.252 2	0.123 8	0.187 8	0.307 2	98.59		
	0.255 9	0.125 6	0.187 8	0.308 1	98.31		
黄芩苷	0.253 9	10.562	5.251	15.571	98.47	98.29	0.2
	0.254 8	10.600	5.251	15.573	98.25		
	0.252 5	10.504	5.251	15.465	98.16		
	0.253 8	10.558	10.502	20.585	97.74	98.13	0.4
	0.251 1	10.446	10.502	20.574	98.21		
	0.251 6	10.467	10.502	20.637	98.42		
	0.253 1	10.529	15.753	25.711	97.83	97.66	0.4
	0.252 2	10.492	15.753	25.711	97.97		
	0.255 9	10.645	15.753	25.653	97.18		
黄芩素	0.253 9	1.272	0.634	1.876	98.43	98.69	0.3
	0.254 8	1.277	0.634	1.886	98.69		
	0.252 5	1.265	0.634	1.879	98.95		
	0.253 8	1.272	1.268	2.503	98.54	98.68	0.2
	0.251 1	1.258	1.268	2.497	98.85		
	0.251 6	1.261	1.268	2.495	98.66		
	0.253 1	1.268	1.902	3.109	98.08	98.01	0.1
	0.252 2	1.264	1.902	3.101	97.95		
	0.255 9	1.282	1.902	3.121	98.02		
汉黄芩素	0.253 9	0.642 4	0.321 6	0.946 5	98.18	98.32	0.2
	0.254 8	0.644 6	0.321 6	0.948 7	98.19		
	0.252 5	0.638 8	0.321 6	0.946 9	98.59		
	0.253 8	0.642 1	0.643 2	1.263 4	98.30	98.36	0.3
	0.251 1	0.635 3	0.643 2	1.261 9	98.70		
	0.251 6	0.636 5	0.643 2	1.255 1	98.08		
	0.253 1	0.640 3	0.964 8	1.569 1	97.76	98.04	0.3
	0.252 2	0.638 1	0.964 8	1.576 9	98.38		
	0.255 9	0.647 4	0.964 8	1.579 7	97.98		

表3 供试品含量测定结果(n=3)

批号	mg·g ⁻¹					
	龙胆苦苷	栀子苷	芒果苷	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
150304	0.751	5.23	0.478	39.8	4.76	2.49
160509	0.782	5.38	0.495	42.3	5.05	2.60
160704	0.779	5.41	0.491	41.6	5.01	2.53

3 讨论

3.1 流动相的选择

参考中国药典2015年版一部和相关文献,确定各组分常用流动相的选择如下:龙胆苦苷为甲醇:水(25:75),栀子苷为乙腈:水(15:85),芒果苷为乙腈:0.2%冰醋酸(15:85),黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素为甲醇:0.2%磷酸(47:53)。故流动相的选择可以分为2组:龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷3者为1组,黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素3者为1组,2组流动相的洗脱能力相差较大,故采用梯度洗脱的方法。

比较甲醇和乙腈作为有机相的分离效果,由于龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷3者结构类似,甲醇分离效果优于乙腈,最终以甲醇作为有机相,同时在水相中添加0.2%的磷酸,有效改善各组分的峰型。

3.2 检测波长的选择

取龙胆苦苷、栀子苷、芒果苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对照品适量,分别加70%甲醇溶解后,使用紫外可见分光光度计分别测定紫外光谱图,结果各组分的最大吸收波长分别为:龙胆苦苷254,270 nm,栀子苷238 nm,芒果苷241,258,318 nm,黄芩苷213,278,315 nm,黄芩素214,275,322 nm,汉黄芩素199,275 nm。流动相中甲醇在190~220 nm处有吸收,考虑在避免干扰的同时,使各组分均有较高响应值,最终确定检测波长0~20 min为254 nm,20~50 min为280 nm。

3.3 提取溶剂的选择

取用甲醇、乙醇、70%甲醇作为提取溶剂,分别制备供试品溶液,结果发现用70%甲醇作为溶剂提取效果好,杂质峰较少,故选用70%甲醇作为提取溶剂。

3.4 提取方式的选择

比较了超声和回流2种提取方法,发现提取效果差异小,相同提取时间下,含量基本相同,考虑提取过程中,超声法比回流法溶剂挥发量少,结果重复性好,故选择超声提取法。

3.5 提取时间的考察

比较了超声时间20,30,45,60 min对结果的影响,结果在超声时间20 min时,黄芩苷含量偏低,未能完全提取,30,45,60 min下,各组分含量基本相同,故选择超声时间为30 min。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第八册[S]. 1993: 101.
- [2] YBZ13632005-2011Z-5, 国家食品药品监督管理局国家药品标准[S]. 2012.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2015: 96, 212-213, 248, 301-302.
- [4] GUAN X Y, CHEN X L, WANG S H, et al. Simultaneous determination of 4 effective components in Fufang Yuxingcao tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(9): 1300-1303.
- [5] WANG W Y, MAO J H, YU L, et al. Quality evaluation of decoction pieces of Gardeniae Fructus in market [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(5): 681-685.
- [6] WANG J P, CHAI J, LYU L F. Simultaneous determination of aloe-emodin, baicalin, obacunone and crocin I in Sijisanhuang tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(2): 199-203.
- [7] ZHOU Z H, WEI J N, ZHAO L L. Multi-index comprehensive evaluation of Radix Scutellariae [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2015, 17(1): 31-38.
- [8] FU L, SHI J H. Antibacterial activity *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vivo* of baicalein [J]. China Pharma(中国药房), 2014, 25(23): 2136-2138.
- [9] ZHAO Y W, YU M, SI X L, et al. TLC identification and content determination of gentiopicroside in Yan Reqing tablet [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(3): 118-120.
- [10] NING K X, HUANG Y P. Determination of geniposide, baicalin and wogonin in Yanreqing tablets by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2015, 24(16): 89-91.
- [11] ZHOU P, SONG Q, MA S. Simultaneous determination of geniposide, peoniflorin, baicalin, baicalein and wogonin in Xiao'er Chiqiao Qingre granules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(8): 1693-1696.
- [12] ZHAO L, WANG X X, LV L, et al. Determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin in Qinggan Sanjie granules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2014, 36(2): 313-318.
- [13] WANG W N, ZHOU Q, LI H. Simultaneous determination of gentiopicroin and baicalin in Erlong capsules by HPLC [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2013, 27(7): 732-734.
- [14] ZHANG X F, LUO G F, WANG Y. Simultaneous determination of swertiajamarin, gentiopicroside and mangiferin in Swertia Franchetiana by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(12): 61-64.
- [15] ZHANG H M, CHANG S, CUI B J, et al. Simultaneous determination of 6 kinds of components in Yindan Pinggan capsules by HPLC [J]. China Pharm (中国药房), 2017, 28(9): 1239-1242.

收稿日期: 2017-11-08

(本文责编: 曹粤锋)