

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.21.020

高效液相色谱法同时测定茵栀黄制剂中4种有效成分含量*

张伟,孙亦钊,张娟娟,黄妍妍,王世林,陈林[△],尹震花

(黄河科技学院·郑州市天然产物合成生物学重点实验室,河南 郑州 450063)

摘要:目的 建立同时测定茵栀黄颗粒、口服液、胶囊中绿原酸、黄芩苷、栀子苷、木犀草素4种有效成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Xterra MS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min 时 10% B~30% B,10~25 min 时 30% B),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 茵栀黄颗粒、口服液、胶囊中绿原酸、黄芩苷、栀子苷、木犀草素进样量分别在 0.012 65~0.303 60 μg、0.808~6.464 μg、0.063 12~0.378 72 μg、0.005 33~0.106 50 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r>0.999\ 0$),检测限分别为 0.12,2.64,0.18,0.33 ng,定量限分别为 0.27,7.66,0.42,0.81 ng,精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 3.0% ($n=6$),平均回收率分别为 99.46%,98.86%,98.60%,99.25%,RSD 分别为 0.94%,1.40%,1.30%,0.89% ($n=6$)。绿原酸、黄芩苷、栀子苷、木犀草素的含量,茵栀黄颗粒中分别为 3.661,77.043,3.102,0.760 mg/g,茵栀黄胶囊中分别为 27.859,780.433,15.030,4.589 mg/g,茵栀黄口服液中分别为 0.837,53.998,2.047,0.510 mg/mL。结论 该方法操作简便,灵敏度高,重复性好,稳定可靠,可用于同时测定茵栀黄制剂中绿原酸、黄芩苷、栀子苷、木犀草素的含量。

关键词:茵栀黄制剂;高效液相色谱法;绿原酸;黄芩苷;栀子苷;木犀草素;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)21-0073-04

Simultaneous Determination of Four Active Ingredients in Yinzhihuang Preparations by HPLC

ZHANG Wei, SUN Yizhao, ZHANG Juanjuan, HUANG Yanyan, WANG Shilin, Chen Lin, YIN Zhenhua

(Huanghe Science and Technology College · Zhengzhou Key Laboratory of Synthetic Biology of Natural Products, Zhengzhou, Henan, China 450063)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin, geniposide and luteolin in Yinzhihuang Granule, Oral Liquid and Capsule. **Methods** The chromatographic column was Xterra MS C₁₈ column (250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid solution(A)-acetonitrile(B) with gradient elution (0-10 min, 10% B-30% B; 10-25 min, 30% B), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The chlorogenic acid, baicalin, geniposide and luteolin in Yinzhihuang Granule, Oral Liquid and Capsule showed a linear relationship in the ranges of 0.012 65-0.303 60 μg, 0.808-6.464 μg, 0.063 12-0.378 72 μg, 0.005 33-0.106 50 μg ($r>0.999\ 0$), respectively. Their limits of detection were 0.12, 2.64, 0.18 and 0.33 ng, respectively, and the limits of quantification were 0.27, 7.66, 0.42, and 0.81 ng, respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 3.0% ($n=6$). The average recoveries of chlorogenic acid, baicalin, geniposide and luteolin were 99.46%, 98.86%, 98.60% and 99.25% with RSDs of 0.94%, 1.40%, 1.30% and 0.89% ($n=6$), respectively. The contents of chlorogenic acid, baicalin, geniposide and luteolin in Yinzhihuang Granule were 3.661, 77.043, 3.102 and 0.760 mg/g, respectively. The contents of the above four active ingredient in Yinzhihuang Capsule were 27.859, 780.433, 15.030 and 4.589 mg/g, respectively. The contents of the above four active ingredient in Yinzhihuang Oral Liquid were 0.837, 53.998, 2.047 and 0.510 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive, reproducible, stable and reliable, which can be used for the simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin, geniposide and luteolin in Yinzhihuang preparations.

Key words: Yinzhihuang preparations; HPLC; chlorogenic acid; baicalin; geniposide; luteolin; content determination

茵栀黄制剂包括口服液、颗粒、软胶囊、泡腾片、胶囊等剂型,是由茵陈、栀子、黄芩、金银花4味中药的提取物制成的常用中成药制剂,由张仲景传统中医名方“茵陈蒿汤”加减药味组方^[1],具有清热解毒、利湿退黄功效,用于治疗肝胆湿热所致黄疸,症见面目悉黄、胸胁胀痛、恶心呕吐、小便黄赤及急、慢性肝炎见上述证候者^[2],临床用于治疗新生儿生理性和病理性黄疸、黄疸型肝炎

等疗效较好^[3-4]。方中,茵陈主要含有绿原酸、香豆精、咖啡酸等成分,为治疗肝胆疾病的主要有效成分^[5];栀子主要有效成分为环烯醚萜苷类化合物,如栀子苷、有机酸类等^[6];黄芩主要有效成分为黄酮类化合物,如黄芩苷和黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素^[7];金银花主要有效成分为有机酸类、黄酮类、皂苷类、鞣质等化学成分^[8]。茵栀黄制剂现行质量标准为2015年版《中国药典》(一

*基金项目:河南省科技发展计划项目[182107000033];河南省郑州市基础研究及应用基础研究专项资金项目[ZS202003];河南省大学生创新创业训练计划项目[S202011834013];黄河科技学院大学生创新创业项目[2020XSCXCY103]。

第一作者:张伟,硕士研究生,教授,研究方向为中药活性成分的开发,(电话)0371-69083296(电子信箱)zzzwwwqq@126.com。

[△]通信作者:陈林,博士研究生,副教授,研究方向为天然活性成分的开发,(电话)0371-87540853(电子信箱)lchenchina@163.com。

部)》所载的茵陈、栀子、黄芩、金银花提取物的质量标准,分别以对羟基苯乙酮、栀子苷、黄芩苷、绿原酸为指标进行质量控制。目前,主要对茵栀黄颗粒和口服液中的有效成分^[9-14]进行研究,对比分析缺少茵栀黄胶囊制剂中有效成分及不同制剂中的有效成分含量。本研究采用高效液相色谱(HPLC)法测定茵栀黄3种制剂颗粒剂、口服液、胶囊剂中4种有效成分绿原酸、黄芩苷、栀子苷、木犀草素的含量,并比较各制剂中的含量差异,为深入研究茵栀黄制剂的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Water 公司); AG285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为十万分之一);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500W,频率为 40kHz)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号为 RP190531),木犀草素对照品(批号为 RP181106),黄芩苷对照品(批号为 RP190624),栀子苷对照品(批号为 RP190629),均购自成都麦德生科技有限公司,规格为每支 20 mg,纯度 $\geq 98.00\%$;茵栀黄口服液[北京新华润高科天然药物有限公司,批号为 191014,规格为每支 10mL(含黄芩苷 0.4 g)];茵栀黄胶囊(四川百利药业有限公司,批号为 191102,规格为每粒 0.33 g);茵栀黄颗粒(鲁南厚普制药有限公司,批号为 09190461,规格为每袋 3 g);乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技<中国>有限公司);甲醇、甲酸(均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水为超纯水。

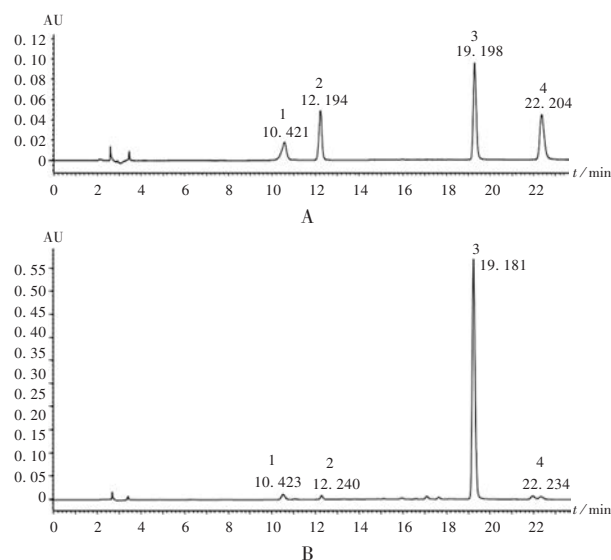
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Xterra MSC₁₈ 柱(250mm×4.6mm,5 μ m);流动相:0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min 时 10% B~30% B,10~25 min 时 30% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μ L。在此色谱条件下,各成分色谱峰基线分离,与相邻色谱峰的分度大于 1.5。色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

取绿原酸、栀子苷、黄芩苷、木犀草素对照品各适量,精密称定,分别加甲醇制成质量浓度为 101.2, 105.2, 404.0, 85.2 μ g/mL 的对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液各适量,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得质量浓度分别为 20.24, 29.46, 48.48, 11.93 μ g/mL 的混合对照品溶液。取茵栀黄胶囊内容物 30.78mg,茵栀黄颗粒 46.36mg,精密称定,精密量取茵栀黄口服液 80 μ L,分别置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为 300 W,频率



1. 绿原酸 2. 栀子苷 3. 黄芩苷 4. 木犀草素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液(茵栀黄胶囊)

图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. chlorogenic acid 2. baicalin 3. geniposide 4. luteolin
A. Mixed reference solution B. Test solution(Yinzhihuang Capsule)

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

为 40 kHz)20 min,冷却至室温,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察^[2,10]与检测限、定量限确定:分别精密吸取 2.2 项下绿原酸、栀子苷、木犀草素对照品贮备液各适量,置容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 25.30, 31.56, 10.65 μ g/mL 的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 μ L,精密吸取黄芩苷对照品贮备液 1, 2, 4, 8, 12, 16 μ L,分别注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μ g)为横坐标绘制标准曲线。用甲醇逐级多步稀释对照品溶液,并逐一进样,以信噪比(S/N)为 3 时的含量为检测限,以 S/N 为 10 的含量为定量限。结果见表 1。

精密度试验:取 2.2 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,记录峰面积。结果见表 1,表明仪器精密度良好。

重复性试验:取茵栀黄颗粒,依法制备供试品溶液,共 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 1,表明方法重复性良好。

稳定性试验:取茵栀黄颗粒,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表 1,表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

加样回收试验:取已知含量的茵栀黄颗粒,研细,每

表 1 茵栀黄制剂中 4 种有效成分方法学考察结果

Tab. 1 Results of methodological investigation of four active ingredients in Yinzhihuang preparations

成分	回归方程	r	线性范围(μg)	定量限(ng)	检测限(ng)	RSD(% , $n=6$)		
						精密度试验	重复性试验	稳定性试验
A	$Y=951\,264X-2\,295.5$	0.999 7	0.012 65~0.303 60	0.27	0.12	1.12	1.03	0.93
B	$Y=777\,411X-5\,840.8$	0.999 6	0.063 12~0.378 72	0.42	0.18	1.05	2.01	1.35
C	$Y=10\,122\,144.15X-53\,611.60$	0.999 9	0.808 00~6.464 00	7.66	2.64	0.64	1.95	1.15
D	$Y=3\,109\,828.45X-3\,085.39$	1.000 0	0.005 33~0.106 50	0.81	0.33	0.53	2.03	1.24

注:A 为绿原酸,B 为栀子苷,C 为黄芩苷,D 为木犀草素。表 2 和表 3 同。

Note: A is chlorogenic acid, B is baicalin, C is geniposide, and D is luteolin, as well as Tab. 2 and Tab. 3.

表 2 茵栀黄颗粒中 4 种有效成分加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the recovery test of four active ingredients in Yinzhihuang Granule($n=6$)

取样量 (g)	样品含量(mg)				加入量(mg)				测得量(mg)				回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0.401 1	0.146 8	1.244 2	30.901 9	0.304 8	0.202 1	1.004 3	25.014 3	0.401 5	0.349 5	2.249 4	55.252 4	0.702 1	100.28	100.09	97.35	98.94								
0.400 2	0.146 5	1.241 4	30.832 6	0.304 2	0.202 1	1.004 3	25.014 3	0.401 5	0.347 2	2.230 1	55.261 2	0.706 5	99.30	98.44	97.66	100.21								
0.399 5	0.146 3	1.239 2	30.778 7	0.303 6	0.202 1	1.004 3	25.014 3	0.401 5	0.349 1	2.228 6	55.314 7	0.701 5	100.37	98.51	98.09	99.10	99.46	98.60	98.86	99.25	0.94	1.30	1.40	0.89
0.402 4	0.147 3	1.248 2	31.002 1	0.305 8	0.202 1	1.004 3	25.014 3	0.401 5	0.349 6	2.224 4	56.096 2	0.708 6	100.09	97.20	100.32	100.32								
0.403 1	0.147 6	1.250 4	31.056 0	0.306 4	0.202 1	1.004 3	25.014 3	0.401 5	0.346 1	2.227 2	56.215 1	0.699 8	98.23	97.26	100.58	97.99								
0.401 2	0.146 9	1.244 5	30.909 7	0.304 9	0.202 1	1.004 3	25.014 3	0.401 5	0.345 9	2.249 5	55.722 0	0.702 1	98.48	100.07	99.19	98.93								

份 0.4 mg,精密称定,共 6 份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入适量按 2.2 项下方法新制备的混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取茵栀黄颗粒、胶囊、口服液各适量,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定 3 次,并计算 4 种有效成分的含量。结果见表 3。

表 3 3 批样品中 4 种有效成分含量测定结果($n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of four active ingredients in three batches of samples($n=3$)

批号	A	B	C	D
09190461(mg/g)	3.661	3.102	77.043	0.760
191102(mg/g)	27.859	15.030	780.433	4.589
191014(mg/mL)	0.837	2.047	53.998	0.510

3 讨论

3.1 流动相选择

参考文献[15-16],以 0.1% 甲酸溶液-乙腈为流动相,比较了不同配比流动相对各色谱峰分离度、出峰时间、峰形等的影响。按 2.1 项下梯度洗脱程序,绿原酸、栀子苷、黄芩苷、木犀草素的色谱峰峰形良好,出峰时间短,基线平稳,柱压低。故最终选择 0.1% 甲酸溶液-乙腈为流动相。

3.2 检测波长选择

2015 年版《中国药典(一部)》中规定绿原酸、栀子苷、黄芩苷、木犀草素检测波长分别为 325,238,280,

360 nm。于 238,254,325,360 nm 波长处供试品溶液均可检测到绿原酸、栀子苷、黄芩苷、木犀草素,但在 254 nm 波长处 4 种有效成分均有较强吸收,且峰形良好,基线平稳,故最终选择 254 nm 为检测波长。

3.3 含量测定结果分析

2015 年版《中国药典(一部)》中规定每 1 mL 茵栀黄口服液中含黄芩苷 34~46 mg,栀子苷不得少于 0.80 mg;每粒茵栀黄胶囊中含黄芩苷 120.0~147.0 mg,栀子苷不得少于 1.6 mg,绿原酸不得少于 1.2 mg;每袋茵栀黄颗粒中含黄芩苷 180~220 mg,栀子苷不得少于 3.0 mg,绿原酸不得少于 1.8 mg^[2]。本研究中茵栀黄口服液、颗粒、胶囊中绿原酸和栀子苷的含量均符合规定,而黄芩苷的含量略高。这可能与提取方法、检测条件、标准品来源等不同有关。另外,茵栀黄制剂是由 4 种提取物组成,不同含量组合制成的制剂,测定每种制剂中相应化合物的含量与测定其中的含量略有不同,也会与本研究结果有一定误差。

3.4 方法评价

该方法操作简单,灵敏度高,重复性好,稳定可靠,可用于同时测定茵栀黄颗粒、口服液、胶囊中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、木犀草素 4 种有效成分的含量,同时可为后续研究茵栀黄制剂中的有效活性成分提供参考。

参考文献

- [1] 范建伟,李蔚群,李艳芳,等. 茵栀黄制剂处方溯源、剂型沿革与质量控制的研究进展[J]. 中成药,2017,39(11):2365-2368.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: