

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)19-0101-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.19.021



高效液相色谱法同时测定金银花口服液中 6 种成分含量

胡潇漓¹, 高 昌^{1△}, 黄 平²

(1. 山东省日照市中医医院, 山东 日照 276800; 2. 浙江省杭州市中医院, 浙江 杭州 310007)

摘要:目的 建立同时测定金银花口服液中新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Shimadzu-GL C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 320 nm, 柱温为 30℃, 进样量为 10 μL。结果 新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的质量浓度分别在 6.52~62.5 μg/mL、15.48~154.8 μg/mL、1.82~18.2 μg/mL、2.62~26.2 μg/mL、3.34~33.4 μg/mL、2.18~21.8 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.9993$, $n=6$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 平均加样回收率分别为 98.95%, 101.37%, 99.34%, 97.85%, 100.94%, 98.95%, RSD 分别为 2.06%, 1.91%, 2.54%, 1.58%, 2.18%, 1.66% ($n=6$)。3 批样品中上述 6 种成分的含量分别为 0.3502~0.3944 mg/mL、0.8513~0.9214 mg/mL、0.0349~0.0370 mg/mL、0.0837~0.1091 mg/mL、0.1079~0.1172 mg/mL、0.1264~0.1362 mg/mL。结论 该方法操作简便、结果准确、专属性和重复性好, 可用于同时测定金银花口服液中 6 种成分的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 金银花口服液; 多成分含量测定

Simultaneous Determination of Six Components in Jinyinhua Oral Liquid by HPLC

HU Xiaoli¹, GAO Chang¹, HUANG Ping²

(1. Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao, Shandong, China 276800; 2. Hangzhou Traditional Hospital of Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China 310007)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid C in Jinyinhua Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu-GL C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 320 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid C were 6.52-62.5 μg/mL, 15.48-154.8 μg/mL, 1.82-18.2 μg/mL, 2.62-26.2 μg/mL, 3.34-33.4 μg/mL, 2.18-21.8 μg/mL ($R^2 \geq 0.9993$, $n=6$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.0% ($n=6$). The average recoveries of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid C were 98.95%, 101.37%, 99.34%, 97.85%, 100.94%, and 98.95%, with RSDs of 2.06%, 1.91%, 2.54%, 1.58%, 2.18%, and 1.66% ($n=6$), respectively. The contents of six components in three batches of samples were in the ranges of 0.3502-0.3944 mg/mL, 0.8513-0.9214 mg/mL, 0.0349-0.0370 mg/mL, 0.0837-0.1091 mg/mL, 0.1079-0.1172 mg/mL, and 0.1264-0.1362 mg/mL, respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate, with good specificity and repeatability, which can be used for the simultaneous determination of six components in Jinyinhua Oral Liquid.

Key words: HPLC; Jinyinhua Oral Liquid; content determination of multi-components

金银花口服液是以金银花为主药, 配以蔗糖、苯甲酸钠制备而成, 具有清热解毒、疏散风热功效, 用于治

疗中暑、麻疹、疖肿、风热感冒、咽喉肿痛^[1]及小儿急性上呼吸道感染^[2]、新型冠状病毒感染^[3]、小儿疱疹性

第一作者: 胡潇漓, 女, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为中药药效物质基础及质量标准, (电子信箱) huxiaolibest@163.com。

[△]通信作者: 高昌, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物质量控制, (电子信箱) 15689626960@163.com。

- [17] 李庆德, 蓝献泉, 郑锦坤, 等. 反向高效液相色谱法同时测定泌炎宁颗粒中绿原酸和蒙花苷含量[J]. 中国药业, 2021, 30(20): 81-83.
- [18] 段慧芳, 吴啟南, 朱亚莹, 等. UPLC 同时测定不同产地金银花中 10 种成分[J]. 中草药, 2019, 50(23): 5858-5864.
- [19] 张丽娟, 蓝献泉, 郑锦坤, 等. 反相高效液相色谱法同时测定鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷含量[J]. 中国药业, 2021, 30(21): 62-65.
- [20] 单圣男, 解玫莹, 王 兰, 等. 中药材大蓟及混伪品的傅里叶变换红外光谱鉴别研究[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2076-2081.

(收稿日期: 2023-10-18; 修回日期: 2024-04-15)

咽喉炎^[4]等疾病,也可联合伐昔洛韦治疗单纯疱疹^[5],联合氨来咕诺糊剂治疗复发性口腔溃疡^[6]等。金银花含有黄酮、有机酸、挥发油等成分,具有显著的抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化、增强免疫等药理学作用^[7]。中药方剂的药效物质复杂多样,各成分从整体上共同发挥治疗作用,单一或单类成分的含量测定难以反映药品的质量^[8],多指标成分质量控制模式已广泛用于中药及其成方制剂^[9]。有学者建立了测定金银花口服液中绿原酸类成分或环烯醚萜类成分含量的一测多评法^[10-11],但尚未见同时测定其中黄酮和有机酸类成分的相关报道。因此,本研究中建立了同时测定金银花口服液中绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸B、异绿原酸C 6种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),配有二极管阵列检测器(PAD);BS-124S型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.1 mg);KQ5200DB型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率为200 W,频率为40 kHz);ULPHW-I型超纯水制造仪(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试剂

金银花口服液(真奥金银花药业有限公司,批号分别为2302245,2302110,2301136);新绿原酸对照品(批号为2204349,含量为98.8%),绿原酸对照品(批号为2202136,含量为98.2%),异绿原酸B对照品(批号为2690030,含量为99.3%),异绿原酸C对照品(批号2203711,含量为98.5%),均购自上海安谱瑾世标准技术有限公司;咖啡酸对照品(批号为2110809-201205,含量为99.2%),芦丁对照品(批号为100080-201811,含量为99.5%),均购自中国食品药品检定研究院;磷酸、乙腈(色谱纯,美国Thermo Fisher公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu-GL C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时15%A→23%A,10~25 min时23%A→35%A);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:320 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸B、异绿原酸C对照品各适量,精密称定,加甲醇,超声使溶解,即得质量浓度分别为156.25,387.0,45.5,65.5,83.5,54.5 μg/mL的混合对照品溶液。精密吸取样品1.0 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按处方工艺制备缺金银花药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相应保留时间处有色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品溶液1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL,置25 mL棕色容量瓶中,加甲醇定容,按2.1项下色谱条件进样测定,以各待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表1。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,用甲醇稀释至原质量浓度的40%后,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸B、异绿原酸C峰面积的RSD分别为1.02%,0.49%,1.33%,1.83%,1.25%,1.18%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为2302245)适量,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条

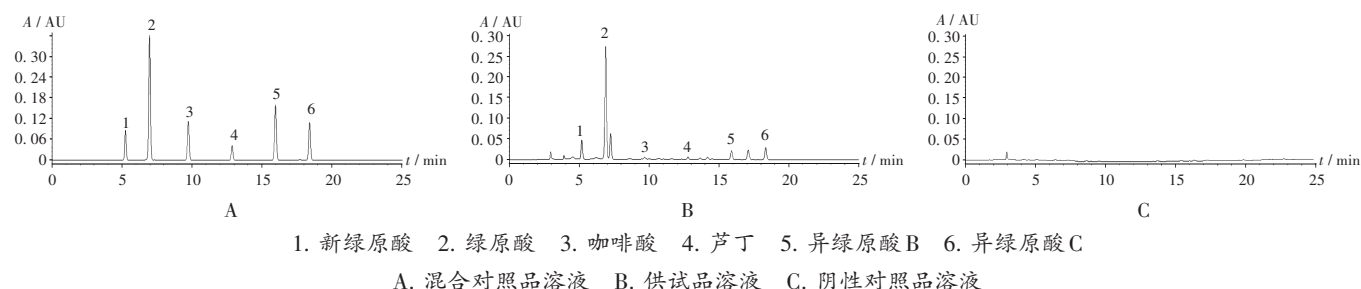


图1 高效液相色谱图

1. Neochlorogenic acid 2. Chlorogenic acid 3. Caffeic acid 4. Rutin 5. Isochlorogenic acid B 6. Isochlorogenic acid C
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1 线性关系考察与加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 1 Results of the linear relation test and the recovery test ($n = 6$)

成分	回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	加样回收试验(%)	
				平均回收率	RSD
新绿原酸	$Y = 17\,688 X - 2\,195.6$	0.999 6	6.52~62.5	98.95	2.06
绿原酸	$Y = 48\,694 X + 54\,734.0$	0.999 4	15.48~154.8	101.37	1.91
咖啡酸	$Y = 23\,334 X - 2\,604.1$	0.999 3	1.82~18.2	99.34	2.54
芦丁	$Y = 11\,680 X + 2\,285.3$	0.999 4	2.62~26.2	97.85	1.58
异绿原酸 B	$Y = 37\,302 X + 3\,212.4$	0.999 7	3.34~33.4	100.94	2.18
异绿原酸 C	$Y = 39\,526 X + 1\,016.0$	0.999 8	2.18~21.8	98.95	1.66

件进样测定,记录峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.21%, 0.77%, 2.33%, 1.67%, 1.73%, 1.22% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 2302245)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C 峰面积的 RSD 分别为 1.67%, 0.86%, 1.56%, 1.26%, 1.87%, 2.11% ($n = 7$), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 2302245)6 份,每份约 0.5 mL,按 100% 的比例加入新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C 对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品(批号分别为 2302245, 2302110, 2301136)各适量,平行 3 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,按外标法计算含量。结果见表 2。

表 2 样品中 6 种成分含量测定结果 (mg/mL , $n = 3$)

Tab. 2 Results of the content determination of six components in samples (mg/mL , $n = 3$)

批号	新绿原酸	绿原酸	咖啡酸	芦丁	异绿原酸 B	异绿原酸 C
2302245	0.394 4	0.894 0	0.036 1	0.083 7	0.107 9	0.136 2
2302110	0.372 5	0.851 3	0.034 9	0.092 1	0.117 2	0.132 5
2301136	0.350 2	0.921 4	0.037 0	0.109 1	0.109 8	0.126 4

3 讨论

3.1 指标性成分选择

金银花是金银花口服液中的主要成分,含有新绿原酸、绿原酸等绿原酸类成分^[12]和芦丁、金丝桃苷等黄酮类成分^[13],具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等药理学作用^[14-15]。为更好地控制制剂质量,本研究中的指标性成分选择新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C。

3.2 检测波长选择

本研究中参考了新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C 等成分的检测波长^[16],结果当检测波长为 320 nm 时,各成分的定量限均能满足含量测定要求,且基线稳定,理论板数较高,色谱峰的峰形和分离度均良好。故检测波长选择 320 nm。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、专属性和重复性好,可用于同时测定金银花口服液中多种成分的含量。

参考文献

- [1] 李细海. 一种金银花口服液及其制备方法:CN104922187A[P]. 2015-09-23.
- [2] 汪建华. 金银花口服液治疗小儿急性上呼吸道感染的疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2023, 33(8): 41-43.
- [3] 张又莉, 雷亮, 徐勇, 等. 金银花口服液治疗新型冠状病毒肺炎 80 例临床疗效分析[J]. 中国药业, 2020, 29(9): 23-26.
- [4] 朱丹. 金银花口服液治疗小儿疱疹性咽峡炎的临床效果及对 CRP 和 SAA 的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(35): 150-152.
- [5] 吴和平, 廖琳玲. 金银花口服液联合氨来咕诺糊剂治疗复发性口腔溃疡患者的效果[J]. 中国民康医学, 2022, 34(19): 98-100.
- [6] 蔡晓政. 金银花口服液联合伐昔洛韦治疗单纯疱疹的临床效果及其机制探讨[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(12): 2055-2057.
- [7] 关秀锋, 王锐, 李晓龙, 等. 金银花的化学成分与药理作用研究新进展[J]. 化学工程师, 2020, 34(4): 59-62.
- [8] 李俊霞, 刘松, 游秋霞. 高效液相色谱——测多评法同时测定金佛止痛丸中 8 种成分含量[J]. 中国药业, 2022, 31(15): 71-75.
- [9] 姚会婷, 苏凤艳, 姚慧敏. RP-HPLC 法同时测定五加参口服液中 10 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(2): 201-208.
- [10] 李勋. 金银花口服液酚酸类成分的含量测定方法: CN115902080A[P]. 2023-04-04.
- [11] 李勋. 金银花口服液环烯醚萜类成分的含量测定方法: CN115792070A[P]. 2023-03-14.
- [12] 王春秋, 李雯霞. RP-HPLC 法同时测定金银花中 10 种化学成分[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1973-1977.
- [13] 魏晓芳, 沈婉莹, 李阳芳, 等. 金银花黄酮苷类化学成分研究[J]. 中草药, 2023, 54(11): 3424-3429.
- [14] 高银鹤. 金银花水提取物的入血成分分析及抗炎活性成分研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2023.
- [15] 崔晓燕. 金银花提取物的抗炎免疫作用研究[J]. 中国药业, 2011, 20(23): 8-9.
- [16] 甄亚钦, 冯玉, 田伟, 等. 忍冬不同部位 UPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4449-4454.

(收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2024-03-02)