



双波长高效液相色谱法同时测定枇杷口服液中7种成分的含量

王庆芬, 刘晓玲, 杨育儒, 李杰

Simultaneous determination of seven components in Piqin oral liquid by dual-wavelength HPLC

WANG Qingfen, LIU Xiaoling, YANG Yuru, LI Jie

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202008007>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

双波长高效液相色谱法同时测定复方首乌藤合剂中7种有效成分

Simultaneous determination of seven active components in compound caulis polygoni multiflori mixture by HPLC of double wavelength

药 学 实 践 杂 志. 2018, 36(4): 334-337 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.010

高效液相色谱法测定不同产地假中的 α -细辛脑含量

Determination of content of α -Asarone in *Piper sarmentosum* Roxb. from different habitats by HPLC

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(4): 348-351 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.012

HPLC法同时测定多效防护霜中盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯的含量

Simultaneous determination of diphenhydramine hydrochloride, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate in multi-effect protective cream by HPLC

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(6): 508-511 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.007

口腔溃疡膜有效成分提取方法的考察及含量测定

Investigation of the extraction method and content determination of the active components from oral ulcer film

药 学 实 践 杂 志. 2020, 38(5): 466-468, 480 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003033

反相高效液相色谱法同时测定大鼠血浆中紫杉醇硬脂酸酯及其活性代谢产物紫杉醇的含量

Simultaneous determination of paclitaxel-stearate (PTX-SA) and its bioactive metabolite paclitaxel (PTX) by RP-HPLC

药 学 实 践 杂 志. 2018, 36(3): 224-227, 273 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.007

用HPLC法测定百蕊草中3个黄酮苷的含量

Determination of three flavonoid glycosides in *Thesium chinensis* Turcz by HPLC method

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(5): 460-463 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.014



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

双波长高效液相色谱法同时测定枇杷口服液中 7 种成分的含量

王庆芬, 刘晓玲, 杨育儒, 李 杰 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院/厦门大学附属东南医院药剂科, 福建漳州 363000)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法同时测定枇杷口服液中绿原酸、咖啡酸、芍药苷、甘草酸铵、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 7 种成分含量。方法 采用双波长 HPLC, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.02% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱。流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μl。检测波长: 0~18.0 min, 325 nm (检测绿原酸、咖啡酸); 18.0~65.0 min, 280 nm (检测芍药苷, 黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素)。结果 枇杷口服液中的绿原酸、咖啡酸、芍药苷、甘草酸铵、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素完全分离, 7 种成分峰面积与浓度的线性关系良好, 加样回收率为 96.41%~99.70%。结论 该法操作简单、准确、重复性好, 可用于枇杷口服液的质量控制。

[关键词] 枇杷口服液; 高效液相色谱; 双波长; 含量测定

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2022)02-0161-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202008007

Simultaneous determination of seven components in Piqin oral liquid by dual-wavelength HPLC

WANG Qingfen, LIU Xiaoling, YANG Yuru, LI Jie (Department of Pharmacy, No. 909 Hospital of Joint Logistics Support Force of the PLA/the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of the contents of 7 components of chlorogenic acid, caffeic acid, paeoniflorin, ammonium glycyrrhizinate, baicalin, baicalein, and wogonin in Piqin oral liquid. **Methods** A double-wavelength HPLC method was performed. The column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 0.02% phosphoric acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) gradient elution; Flow rate: 1.0 ml/min; Column temperature: 35°C; Injection volume: 20 μl; Detection wavelength: 0-18.0 min, 325 nm (detect chlorogenic acid, caffeic acid); 18.0-65.0 min, 280 nm (detect paeoniflorin, baicalin, baicalein, ammonium glycyrrhizinate, wogonin). **Results** The chlorogenic acid, caffeic acid, paeoniflorin, ammonium glycyrrhizinate, baicalin, baicalein and wogonin were completely separated. Seven components have a good linear relationship between the peak area and concentration, with the recoveries between 96.41% and 99.70%. **Conclusion** This method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of Piqin oral liquid.

[Key words] Piqin oral liquid; HPLC; double-wavelength; content determination

枇杷口服液是我院皮肤科的临床经验方, 主要由枇杷叶、黄芩、赤芍、甘草等十三味中药制成, 具有清热、祛湿、凉血等功效, 临床主要用于治疗寻常型痤疮^[1]。目前质量控制指标为制剂中的总黄酮以及君药黄芩中的成分^[2], 不能全面反映制剂的整体质量。组方中黄芩、枇杷叶为君药, 具有清热解毒, 凉血消肿作用。黄芩活性成分主要为黄酮类化合物, 其中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素抗炎及抑菌效果好。枇杷叶等药材中含有绿原酸和咖啡酸成分, 具有抗菌、消炎等作用。组方中的芍药苷及甘

草中的甘草酸铵同样具有抗炎、抑菌及免疫调节等功效, 诸药合用, 在治疗寻常痤疮中发挥协同作用^[3]。本研究拟采用双波长高效液相色谱法测定绿原酸、咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素含量^[4-5], 以进一步完善其质量标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 Series 高效液相色谱系统(含 DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); AUX220 电子分析天平(日本岛津公司)。

1.2 试剂

枇杷口服液(自制, 批号: 20200220、20200224、

[作者简介] 王庆芬, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向: 医院制剂与质量控制, Email: 58221899@qq.com

20200315); 黄芩苷对照品(批号: 110715-201821, 含量 95.4%)、黄芩素对照品(批号: 111595-200905, 含量 98.5%)、绿原酸对照品(批号: 110753-201415, 含量 96.2%)、芍药苷对照品(批号: 110736-201337, 含量 94.9%)、甘草酸铵对照品(批号: 110731-201418, 含量 93.1%), 咖啡酸对照品(批号: 110885-200102)、汉黄芩素对照品(批号: 111514-200403, 含量 98.0%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈(色谱纯, TEDIA 公司, 批号: 18085030)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5μm) 为色谱柱; 流动相: 0.02% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B) 梯度洗脱, 洗脱程序: 0~10 min, 10%B; 10~20 min, 10%~20%B; 20~30 min, 20%~25%B; 30~40 min, 25%~30%B; 40~50 min, 30%~40%B; 50~60 min, 40%~70%B; 60~65 min, 70%~30%B; 65~70 min, 30%~10%B; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35℃; 进样量: 20 μl。

检测波长: 0~18.0 min, 325 nm(检测绿原酸、咖啡酸); 18.0~65.0 min, 280 nm(检测芍药苷, 黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素)。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液

分别称取各对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含绿原酸 355.9 μg/ml、咖啡酸 550.0 μg/ml、芍药苷 1480 μg/ml、黄芩苷 772.7 μg/ml、黄芩素 660.0 μg/ml、甘草酸铵 642.4 μg/ml 和汉黄芩素 499.8 μg/ml 的单一对照品储备液。精密吸取上述对照品储备液适量, 置于同一 10 ml 的量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得质量浓度依次为 35.59、5.500、296.1、77.27、66.00、128.5 和 1.999 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

精密量取相应批号的枇杷口服液 2ml, 置 10 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

2.2.3 阴性供试品溶液

根据处方中各药的比例, 依次制备不含绿原酸(缺茵陈、墨旱莲和枇杷叶)、咖啡酸(缺夏枯草、墨旱莲、枇杷叶和丹参)、赤芍、黄芩和甘草的阴性样品, 按“2.2.2”项下供试品溶液制备阴性溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件测定, 结果见图 1。在供试品溶液色谱中, 与对照品溶液色谱中绿原酸、咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素位置上均有相应的色谱峰出现, 且色谱峰之间的分离度均>1.5, 理论板数>3000。

2.3.2 线性关系考察

分别精密吸取对照品储备液 0.50、1.00、1.50、2.50、3.50、5.00ml 置于 5ml 棕色量瓶中, 加入甲醇稀释至刻度, 摇匀。即得系列浓度的混合对照品溶液, 按照上述的色谱分析条件进样分析, 以浓度(X, μg/ml)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程及线性范围, 结果见表 1。

2.3.3 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积。结果显示绿原酸、咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.57%、1.98%、1.74%、1.07%、2.01%、1.41% 和 1.69%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验

取同一批样品(批号: 20200224) 6 份, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 绿原酸、咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.91%、1.90%、0.68%、1.41%、1.78%、1.40% 和 1.97%, 表明方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h, 按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 绿原酸、咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.05%、1.90%、1.32%、1.06%、1.78%、2.02% 和 1.87%, 结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验

精密量取已知含量(批号: 20200224)的枇杷口服液 1ml, 共 9 份, 分别按相当于绿原酸、咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵和汉黄芩素含有量的 80%、100%、120% 加入对照品溶液(不同加入量各 3 份), 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定含量, 并计算加样回收率和 RSD, 结果见表 2。

2.4 样品测定

取 3 个批号枇杷口服液(批号: 20200220、

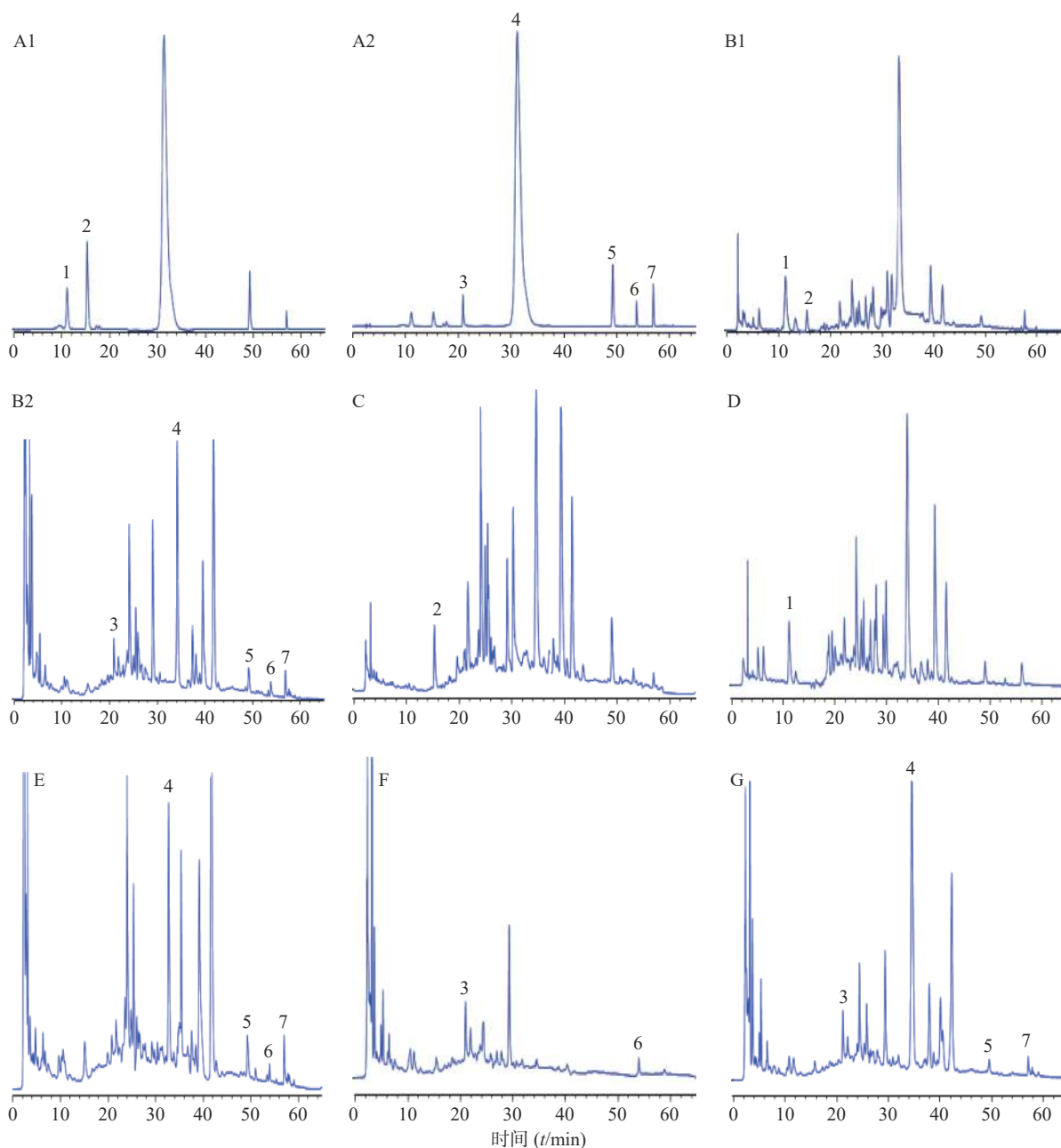


图1 批苓口服液 HPLC 色谱图

注: A1.混合对照品 (325nm); A2.混合对照品 (280nm); B1.供试品 (325nm); B2.供试品 (280nm); C.绿原酸阴性样品、D.咖啡酸阴性样品 (325nm); E.赤芍阴性样品、F.黄芩阴性样品、G.甘草阴性样品 (280nm) 1.绿原酸; 2.咖啡酸; 3.芍药苷; 4.黄芩苷; 5.黄芩素; 6.甘草酸铵; 7.汉黄芩素

表1 批苓口服液中有效成分的回归方程、
相关系数和线性范围

有效成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围(μg/ml)
绿原酸	$Y=18.102X-0.0003$	0.9991	3.559 ~ 35.59
咖啡酸	$Y=51.805X+0.0874$	0.9993	0.5500 ~ 5.500
芍药苷	$Y=2.2865X+0.5859$	0.9999	29.61 ~ 296.1
黄芩苷	$Y=215.23X+43.349$	0.9999	7.727 ~ 77.27
黄芩素	$Y=14.843X-69.402$	0.9998	6.600 ~ 66.00
甘草酸铵	$Y=4.7447X-48.701$	0.9995	12.85 ~ 128.5
汉黄芩素	$Y=413.09X-64.950$	0.9998	0.1999 ~ 1.999

20200224、20200315), 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算7种成分的含量, 结果见表3.

3 讨论与结论

3.1 制剂质控指标的确定

试验中选择的7种成分来源于黄芩、夏枯草、茵陈、赤芍和甘草, 全面覆盖君、臣、佐、使中的多味药材, 将其作为质控指标, 以提高质量控制的整体性和特征性。因测定成分绿原酸分别存在于组

表2 枇杷叶口服液加样回收率测定结果 (n=9)

成分	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
绿原酸	66.46	56.94	122.4	98.24	98.55	0.75
	66.46	71.18	136.2	98.02		
	66.46	88.98	154.9	99.39		
咖啡酸	11.32	8.800	19.94	97.99	97.95	0.67
	11.32	11.00	22.02	97.27		
	11.32	13.20	24.33	98.59		
芍药苷	638.3	493.5	1117.7	97.14	97.58	0.67
	638.3	592.2	1220.7	98.34		
	638.3	710.6	1329.3	97.25		
黄芩苷	151.3	123.6	274.13	99.38	99.70	0.61
	151.3	154.5	304.73	99.31		
	151.3	185.5	337.47	100.40		
黄芩素	103.7	84.48	187.93	99.71	98.88	1.51
	103.7	105.6	209.07	99.78		
	103.7	132.0	231.93	97.15		
甘草酸铵	115.5	102.8	217.17	98.90	98.26	1.41
	115.5	128.5	243.0	99.22		
	115.5	154.2	264.57	96.67		
汉黄芩素	1.908	1.599	3.427	95.02	96.41	1.41
	1.908	1.999	3.837	96.50		
	1.908	2.399	4.252	97.72		

表3 枇杷叶口服液7种成分的含量测定结果
(n=3, $\mu\text{g}/\text{ml}$)

批号	绿原酸	咖啡酸	芍药苷	黄芩苷	黄芩素	甘草酸铵	汉黄芩素
20200220	69.54	12.11	615.3	157.3	99.97	112.2	1.709
20200224	66.46	11.32	638.3	151.3	103.7	115.5	1.908
20200315	65.80	11.21	633.2	149.2	105.2	117.2	1.911

方中茵陈、枇杷叶等药材中,咖啡酸存在于枇杷叶、丹参等药材中,因此按照相应的方法制备阴性供试品溶液。

3.2 检测波长的选择

试验采用高效液相的DAD检测器分别对7种对照品在200~400 nm处扫描,结果绿原酸和咖啡酸在325 nm波长处有最大紫外吸收,芍药苷,黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、汉黄芩素在280 nm波长处有最大吸收,因此本实验选择325nm和280 nm作为测定波长。

3.3 色谱条件的筛选

考察了甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.02%磷酸水溶液等流动相系统,结果采用乙腈-0.02%磷酸水溶液梯度洗脱,对照品溶液与供试品溶液各成分分离度较好,梯度洗脱中基线相对平稳,峰形较好。此外,对柱温、流速、进样量等色谱条件进行优化最终确定色谱条件。

【参考文献】

- [1] 王庆芬,杨育儒,沈秋莲,等. 枇杷叶颗粒体外抑制金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的作用[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(12): 1457-1460.
- [2] 王庆芬,倪晓霞,李杰,等. 高效液相色谱法同时测定枇杷叶口服液中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量[J]. 中国药业, 2015, 24(16): 93-95.
- [3] 缪小海. 面膜联合中药汤剂治疗寻常痤疮的可行性分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(76): 150-151.
- [4] 姚晓,蒋骊龙,陈建伟. 双波长HPLC同时测定小儿咳喘灵颗粒中8种有效成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1036-1040.
- [5] 邱小玉,刘玉萍,刘焯,等. HPLC法同时测定茵栀黄口服液液中10种有效成分[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3648-3653.

[收稿日期] 2020-08-03 [修回日期] 2022-01-06

[本文编辑] 陈盛新