

梯度洗脱波长切换 HPLC 同时测定茵栀解毒颗粒中 3 个成分的含量

郑举¹, 刘红云^{2*}, 陈静¹, 洪功飞¹

(1. 安徽省动物疫病预防与控制中心, 安徽合肥 230091; 2. 安徽省兽药饲料监察所, 安徽合肥 230091)

摘要 [目的] 建立同时测定茵栀解毒颗粒中绿原酸、黄芩苷、栀子苷 3 个成分含量的方法。[方法] 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)~0.2% 磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 327 nm (0~9.5 min, 测定绿原酸), 238 nm (9.5~14.0 min, 测定栀子苷)、278 nm (14~30 min, 测定黄芩苷)。[结果] 各待测组分分离度良好; 绿原酸、黄芩苷、栀子苷 3 个成分的进样量分别在 5.01~100.00 μg/mL ($r=0.9997$)、6.25~100.00 μg/mL ($r=0.9995$)、10.86~400.00 μg/mL ($r=0.9993$) 与峰面积呈良好的线性关系; 加样回收率分别为 98.5%、100.0%、99.0% ($n=6$), RSD 分别为 0.2%、0.7%、0.4%。[结论] 该试验建立的含量测定方法符合方法学验证要求, 可用于茵栀解毒颗粒的 3 个指标性成分的同时测定。该方法简便、准确度高、重复性好, 为进一步控制茵栀解毒颗粒的质量标准提供了依据。

关键词 茵栀解毒颗粒; 绿原酸; 黄芩苷; 栀子苷; 含量测定; 高效液相色谱; 梯度洗脱; 波长切换

中图分类号 R 284.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)21-0198-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.21.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Simultaneous Determination of 3 Constituents in Yinzhi Jiedu Granules by Gradient Elution HPLC Method with Switching Wavelength

ZHENG Ju¹, LIU Hong-yun², CHEN Jing¹ et al (1. Anhui Province Animal Disease Prevention and Control Center, Hefei, Anhui 230091; 2. Anhui Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Hefei, Anhui 230091)

Abstract [Objective] To establish a method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin and geniposide in Yinzhi Jiedu granules. [Method] The chromatographic separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile (A)~0.2% phosphoric acid solution (B) in a gradient mode at a flow rate of 1 mL/min. Column temperature was 30 ℃, the UV detection wavelength was set at 327 nm for chlorogenic acid in the first 9.5 min, 238 nm for geniposide during 9.5~14.0 min, 278 nm for baicalin during 14~30 min. [Result] Excellent chromatographic separation was achieved and the ranges for linear correlation of chlorogenic acid, baicalin and geniposide were 5.01~100.00 μg/mL ($r=0.9997$), 6.25~100.00 μg/mL ($r=0.9995$), 10.86~400.00 μg/mL ($r=0.9993$), respectively. The sample recovery rates were 98.5%, 100.0%, and 99.0% ($n=6$), and the RSD were 0.2%, 0.7%, and 0.4%, respectively. [Conclusion] This method is consistent with the method validation requirements, and can simultaneously determine the above 3 index components of Yinzhi Jiedu granules. The method is simple, accurate and repeatable, and provides a basis for further control of the quality standard of Yinzhi Jiedu granules.

Key words Yinzhi Jiedu granules; Chlorogenic acid; Baicalin; Geniposide; Content determination; HPLC; Gradient elution; Wavelength shift

茵栀解毒颗粒由茵陈、栀子、虎杖、黄芩、钩藤 5 味中药组成, 该药物具有清热解暑、疏肝解痉之功效, 兽医临床用于雏鸭病毒性肝炎^[1-5]。茵栀解毒颗粒为《兽药质量标准》2017 年版(中药卷)收录的中药制剂, 但只测定其中绿原酸的含量, 对其他成分未有规定, 不利于整体控制药品的质量。该试验在相关文献的基础上^[6-16], 以其中 3 种药材的代表性成分为检测指标, 建立了同一流动相条件下同时测定茵栀解毒颗粒中茵陈、栀子、黄芩的 3 个特征性成分绿原酸、栀子苷、黄芩苷成分含量的 HPLC 法, 既提高了制剂的质量控制, 又简化了日常操作, 为完善其质量标准提供了参考依据, 对于该药标准的修订具有重要意义。

1 材料与方

1.1 仪器 Agilent1100 型高效液相色谱仪(四元梯度泵/G1311A, 自动进样器/G1379A, 真空在线脱气机, G1315DAD 检测器), 美国 Agilent 公司; EX125DZH 十万分之一分析天平(奥豪斯仪器有限公司); Sartorius BP211D 万分之一分析天平(德国赛多利斯); 水由实验室 MILLI-Q 超纯水自制; SK7200HP 型超声波清洗器(上海科导); 手动移液器(Eppen-

dorf, 德国); 0.45 μm 混合滤膜(美国 Waters 公司)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈(Thermo Fisher Scientific 公司)为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 超纯水、蒸馏水为自制。茵栀解毒颗粒由安徽省某兽药有限公司提供(批号 20190811、20190712、20190919、20191010、20191101)。对照品绿原酸(批号 Z0261702, 规格 98.3%)购于中国兽医药品监察所, 栀子苷(批号 110749-201617, 规格 98.4%)、黄芩苷(批号 110715-201720, 规格 93.52%)购于中国食品药品检定研究院。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件。 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)~0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 13%A; 5~10 min, 13%A~30%A; 10~15 min, 30%A~85%A; 15~25 min, 85%A; 25~26 min, 85%A~13%A; 26~30 min, 13%A), 流速 1 mL/min, 检测波长 327 nm (0~9.5 min, 测定绿原酸)、238 nm (9.5~14.0 min, 测定栀子苷)、278 nm (14~30 min, 测定黄芩苷), 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 各待测组分分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 6 000。在此条件下, 色谱图及光谱图如图 1~4 所示。

1.3.2 对照品储备液的制备。 精密称取绿原酸、栀子苷、黄

作者简介 郑举(1973—), 男, 安徽萧县人, 高级兽医师, 从事畜禽产品安全、动物防疫工作。*通信作者, 高级兽医师, 硕士, 从事中药药检测技术研究。

收稿日期 2020-03-13; **修回日期** 2020-04-15

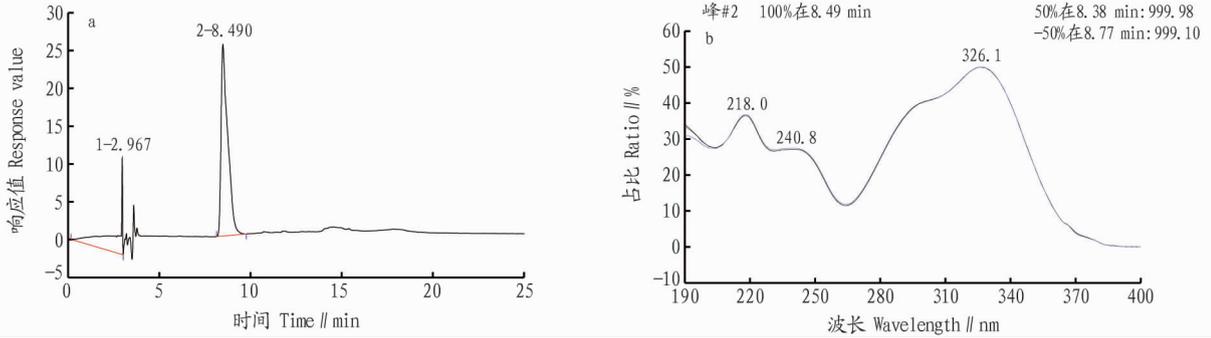


图 1 绿原酸对照品色谱图 (a) 及光谱图 (b)

Fig. 1 Chromatogram (a) and spectrum (b) of chlorogenic acid reference substance

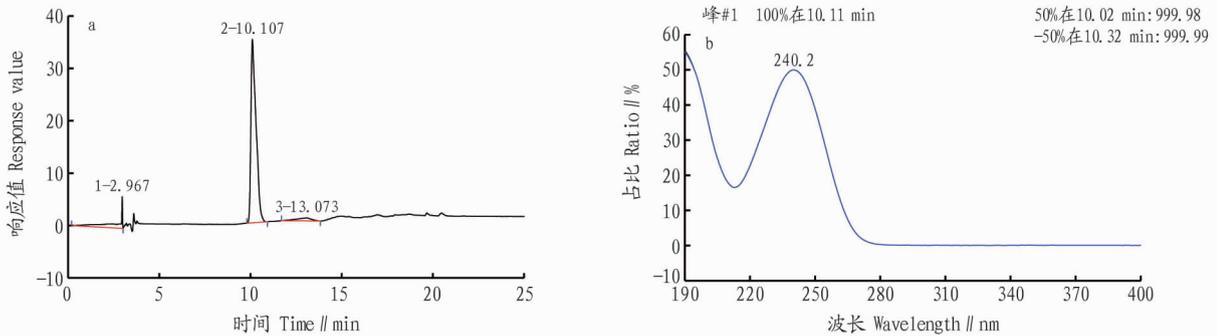


图 2 栀子苷对照品色谱图 (a) 及光谱图 (b)

Fig. 2 Chromatogram (a) and spectrum (b) of geniposide

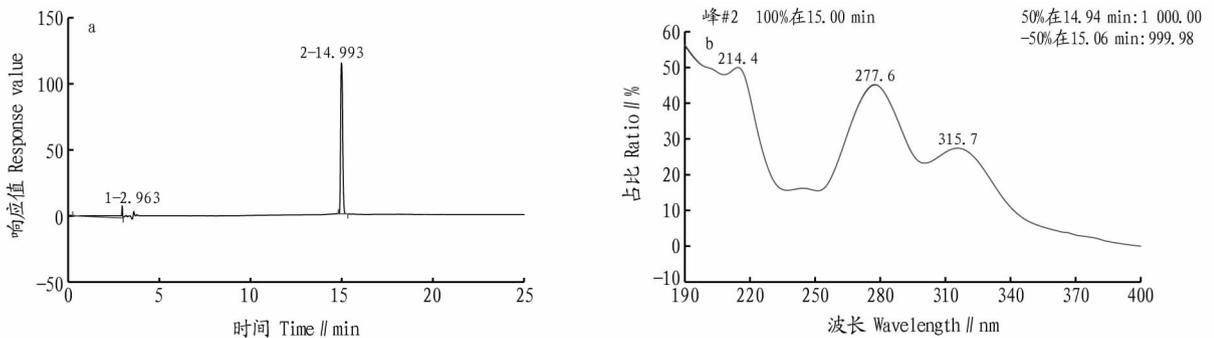
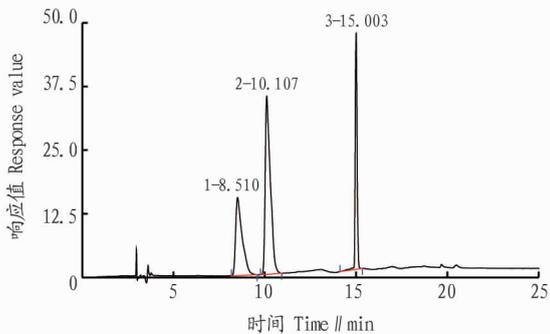


图 3 黄芩苷对照品色谱图 (a) 及光谱图 (b)

Fig. 3 Chromatogram (a) and spectrum (b) of baicalin



注: 1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 黄芩苷

Note: 1. Chlorogenic acid; 2. Geniposide; 3. Baicalin

图 4 混合对照品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of mixed reference substance

将绿原酸、栀子苷、黄芩苷的对照品适量, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇

溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为绿原酸 1.0 mg/mL、栀子苷 1.0 mg/mL、黄芩苷 0.1 mg/mL 的溶液。作为对照品储备液。

1.3.3 混合对照品溶液的制备。精密吸取绿原酸对照品储备液 250 μ L、栀子苷对照品储备液 500 μ L、黄芩苷对照品储备液 2 mL, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为绿原酸 25.86 μ g/mL、栀子苷 50.15 μ g/mL、黄芩苷 200.18 μ g/mL 的混合对照品溶液, 冷藏, 备用。

1.3.4 供试品溶液的制备。将茵栀解毒颗粒研细, 过 40 目筛, 精密称取 3.0 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 精密加入体积分数为 50% 甲醇 50 mL, 称量, 超声提取 (功率 500 W, 频率 40 kHz), 提取 10 min, 放冷再称量, 加体积分数为 50% 甲醇水溶液补足减失的量, 加 500 μ L 冰醋酸, 取适量经 0.45 μ m

微孔滤膜滤过,取续滤液上机分析。

1.3.5 阴性样品溶液的制备。按处方分别制备缺少茵陈、栀子和黄芩的阴性对照溶液。按“1.3.4”供试品溶液的制备方法进行制备,即得3种阴性样品溶液。

2 结果与分析

2.1 专属性试验 混合对照品溶液、供试品溶液及缺茵陈、缺栀子、缺黄芩的3种阴性对照溶液各10 μL,在“1.3.1”色谱条件下分别注入色谱仪,进行分析,根据色谱图的出峰时间,得出茵陈解毒颗粒在与绿原酸、栀子苷、黄芩苷对照品相应的位置上,均有相同保留时间的色谱峰,而缺茵陈的阴性对照溶液无绿原酸色谱峰,缺栀子的阴性对照溶液中无栀子苷色谱峰,缺黄芩的阴性对照溶液无黄芩苷色谱峰,说明茵陈解毒颗粒中其他成分对这3个成分的检测不产生干扰,方法的专属性好。同时依据DAD检测器的峰纯度检测功能,得出3种成分的纯度角度小于纯度阈值,说明样品的成分得到良好的分离。

2.2 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL,置5 mL容量瓶中,用体积分数为50%甲醇稀释至刻度,摇匀,按照“1.3.1”色谱条件进行测定。以峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液的质量浓度(X , μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线并进行回归分析计算,结果见表1。从表1可以看出,绿原酸、栀子苷、黄芩苷在定量测定范围内线性关系良好。

2.3 精密度试验 取同一混合对照品溶液,按“1.3.1”色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。计算得出绿原酸、栀子苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.8%、1.1%、0.6%,均符

合要求,表明仪器精密度良好。

表1 3个成分的标准曲线方程、相关系数、线性范围

Table 1 Standard curve equation, correlation coefficient and linear range of 3 components

成分 Components	线性方程 Linear equation	相关系数(r) Correlation coefficient	线性范围 Linear range μg/mL
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y=14.86X-5.04$	0.999 8	5.01~100.00
栀子苷 Baicalin	$Y=13.56X-3.11$	0.999 6	6.25~100.00
黄芩苷 Geniposide	$Y=10.35X+2.55$	0.999 5	10.86~400.00

2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液10 μL,室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h,按“1.3.1”色谱条件下进样分析,记录峰面积。计算得出绿原酸、栀子苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.5%、0.3%、0.4%,表明供试品溶液室温放置24 h内稳定。

2.5 重复性试验 精密称取茵陈解毒颗粒(批号20190811)的样品6份,每份3.0 g,按“1.3.4”方法制得供试品溶液,按“1.3.1”色谱条件进样分析,按外标法计算各组分含量及其RSD。测得绿原酸、栀子苷、黄芩苷的含量平均值分别为0.358、0.701、3.156 mg/g, RSD分别为0.8%、0.6%、0.7% ($n=6$),表明该方法的重复性良好。

2.6 加样回收率试验 取已知含量的茵陈解毒颗粒(批号20190811)粉末6份,每份约2.0 g,精密称定,精密加入已知浓度的绿原酸、栀子苷、黄芩苷对照品的混合溶液2 mL,按“1.3.4”方法制成供试品溶液,按“1.3.1”色谱条件进样分析,结果见表2。从表2可以看出,绿原酸、栀子苷、黄芩苷的平均加样回收率及RSD均符合要求。

表2 回收率试验结果($n=6$)

Table 2 Results of recovery test ($n=6$)

样品成分 Sample composition	样品称样量 Sample weighing amount//g	样品含量 Sample content mg	对照品添加量 Reference substance added amount//mg	测得总量 Measured total amount//mg	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
绿原酸 Chlorogenic acid	2.012 3	0.720 4	0.051 7	0.758 2	98.5	0.2
	2.008 7	0.719 1	0.051 7	0.760 0		
	2.032 1	0.727 5	0.051 7	0.767 4		
	2.005 6	0.718 0	0.051 7	0.759 3		
	2.213 2	0.792 3	0.051 7	0.833 9		
	2.165 4	0.775 2	0.051 7	0.812 6		
黄芩苷 Baicalin	2.012 3	1.410 6	0.100 3	1.514 7	100.0	0.7
	2.008 7	1.408 1	0.100 3	1.506 1		
	2.032 1	1.424 5	0.100 3	1.513 4		
	2.005 6	1.405 9	0.100 3	1.525 0		
	2.213 2	1.551 5	0.100 3	1.651 0		
	2.165 4	1.517 9	0.100 3	1.609 3		
栀子苷 Geniposide	2.012 3	6.350 8	0.400 4	6.700 6	99.0	0.4
	2.008 7	6.339 5	0.400 4	6.664 4		
	2.032 1	6.413 3	0.400 4	6.752 4		
	2.005 6	6.329 7	0.400 4	6.612 3		
	2.213 2	6.984 9	0.400 4	7.337 3		
	2.165 4	6.834 0	0.400 4	7.174 4		

2.7 含量测定 精密称取茵陈解毒颗粒5份,按“1.3.4”方法制成供试品溶液,分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液

各10 μL,按“1.3.1”色谱条件进样分析,外标法进行含量测定。结果见表3。

表 3 样品含量的测定结果 ($n=2$)

Table 3 Content determination results of samples mg/g

批号 Batch No.	绿原酸 Chlorogenic acid	黄芩苷 Baicalin	栀子苷 Geniposide
20190811	0.358	0.701	3.156
20190712	0.421	0.818	3.252
20190919	0.513	0.854	3.556
20191010	0.587	0.714	2.987
20191101	0.487	0.821	3.012

3 讨论

3.1 提取条件的选择 利用单因素考察法,对提取方法、提取溶剂、提取时间 3 个因素进行了考察。在提取溶剂浓度的选择上,比较了浓度 25%、50%、75%、100% 的甲醇对各组分的提取效果,试验结果显示,50% 甲醇提取茵栀解毒颗粒中的 3 种成分含量最高。在提取方法上分别选择超声、回流 2 种提取方法,结果显示超声提取效率最高,且简便快捷。与此同时在超声提取时间上分别比较了 5、10、15、20、30 min 对茵栀解毒颗粒的提取效果,试验结果显示,样品在超声 10 min 提取效率达到最高。最终选择的提取方法是用 50% 甲醇超声提取 10 min。

3.2 检测波长的选择 同一物质在不同检测波长下具有不同的响应值。在该试验中利用 DAD(光电二极管阵列检测器)对这 3 种化合物进行 190~400 nm 扫描,根据绿原酸、栀子苷、黄芩苷的特征光谱图,确定这 3 种物质的最大吸收波长,同时结合流动相的梯度洗脱的特性,可以将复杂基质的成分进行分离,最终确定为 0~9.5 min 时 327 nm 测定绿原酸,9.5~14.0 min 时 238 nm 测定栀子苷,14~30 min 时 278 nm 测定黄芩苷。

3.3 流动相的选择 该试验考察了多种流动相体系,首先以甲醇-水(13:87)、甲醇-磷酸-水(30:0.1:70)作为流动相,进行等度、梯度洗脱,结果发现绿原酸和栀子苷的分离效果不太好,又考察了乙腈-磷酸-水、等度和梯度,发现采用梯度洗脱时 3 种化合物得到的色谱峰符合分离要求,最后筛选出乙腈和磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱。经试验验证,该流动相体系基线平稳、无拖尾现象,3 种成分色谱峰分离度达到要求,符合系统适用性的要求。故以此为该检测方法的流动性。

3.4 耐用性考察 根据“1.3.1”色谱条件,分别考察了 4 款不同品牌的色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm×200 mm,

5 μm)、Waters Ultimate XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)、Aglient Eclipse XDB C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm) 和 Thermo Hypurity C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),设定了 3 个柱温(25、35、40 °C)、3 个流速(0.8、1.0、1.2 mL/min),结果表明上述条件下各组分的分离度和理论塔板数均能达到要求,证明该方法耐用性较好。

4 小结

该试验建立了 HPLC-DAD 波长切换法同时测定茵栀解毒颗粒中绿原酸、栀子苷、黄芩苷的方法,保证各成分在最大吸收波长处检测,且仅使用 1 个色谱条件即可实现多个指标成分的质量分析。方法学验证结果符合《中国兽药典》2015 年版中质量分析方法验证指导原则的要求。该方法的供试品溶液制备简便快捷,所建立的梯度洗脱方法分离度好,测定结果准确、重复性好、实用性强,有利于茵栀解毒颗粒整体质量的控制。

参考文献

- [1] 章林平,孙倩,王威,等.茵陈有效成分的药理作用及其临床应用的研究进展[J].抗感染药学,2014,11(1):28-31.
- [2] 杨全军,范明松,孙兆林,等.栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J].中国现代中药,2010,12(9):7-12.
- [3] 史雪靖.黄芩药理作用研究进展[J].中医药信息,2010,27(4):128-130.
- [4] 李贵海,朱建伟,吴丽丽.茵栀黄颗粒的保肝作用研究[J].中药材,2001,24(5):353-355.
- [5] 石英.绿原酸在水产饲料中的应用研究进展[J].山东畜牧兽医,2018,39(3):83-85.
- [6] 范文昌,梅全喜.HPLC 法测定金银岗梅颗粒中栀子苷的含量[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(21):145-147.
- [7] 王晓娟.高效液相法测定森登-25 中栀子苷的含量[J].中国民族医药杂志,2015(3):62-63.
- [8] 张广春,陈明明,杨敏,等.高效液相色谱法测定栀芩清肺丸中栀子苷的含量[J].陕西中医,2012,33(10):1412-1413.
- [9] 宁科贤,黄燕萍.高效液相色谱法同时测定炎热清片中栀子苷、黄芩苷和汉黄芩素含量[J].中国药业,2015,24(16):89-91.
- [10] 康艳萍,黄婉.栀子中栀子苷的提取研究[J].广州化工,2018,46(12):73-74,98.
- [11] 吴宇锋,陈灵哲,林忠.HPLC 法同时测定 3 种煎法下防风通圣方中的黄芩苷和栀子苷含量[J].上海医药,2018,39(1):61-64.
- [12] 赵祥军,曹琳,韩玉梅,等.不同产地栀子的质量研究[J].时珍国医国药,2005,16(6):508.
- [13] 冉桂梅,杨凌,张才华,等.高效液相色谱法测定新雪颗粒中栀子苷的含量[J].色谱,2004,22(6):639-640.
- [14] 周瑾.高效液相色谱法测定丹栀逍遥丸中栀子苷的含量[J].海峡药学,2006,18(1):67-68.
- [15] 师永花,师永清.双波长 RP-HPLC 法同时测定黄连上清丸中栀子苷和黄芩苷的含量[J].中国药事,2012,26(7):747-750.
- [16] 付晓,尹忠平,上官新晨,等.HPLC 法同时测定甜叶菊中 3 种绿原酸类化合物[J].食品科技,2014,39(8):276-280.

(上接第 191 页)

- [4] 江英,陈龙,王陈强,等.不同温度储藏下番茄酱色泽变化及其动力学研究[J].食品科技,2014,39(12):281-284.
- [5] 赵文启,李珍慈,宿胜男,等.冷热破碎工艺对小包装番茄酱贮藏期间非酶褐变的影响[J].保鲜与加工,2020,20(1):89-96.
- [6] 张宏,高永生.番茄酱加工全过程色差控制的研究[J].内蒙古农业科技,2014(4):33-35.
- [7] 张博,商金颖,邸一桓,等.不同贮藏温度条件下番茄酱品质变化规律研究与货架期预测[J].食品科技,2018,43(12):56-60.

- [8] 韩慧,吴远高.新疆塔城地区出口番茄酱中番茄红素分析[J].食品安全导刊,2018(3):105-106.
- [9] 冯彩芬,郭鸿存,徐云滨,等.番茄 LeCBL1 功能的初步研究[J].安徽农业科学,2012,40(28):13705-13706,13708.
- [10] 贾业伟,丁玉,孟仕平,等.番茄红素的生理功能和生产工艺研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(28):16032-16034.
- [11] 梅晓岩,孟宪军,梁婧婧.番茄红素抗氧化活性的研究[J].安徽农业科学,2006,34(11):2315-2317.
- [12] 刘忆冬,江英,陈龙,等.不同储藏温度下玻璃罐装番茄酱色泽变化的动力学研究[J].保鲜与加工,2020,20(1):31-35.