

UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分

陈晓虎^{1,2}, 苏晶¹, 王慧¹, 况刚^{1,2}, 汪杨丽¹

1. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

2. 重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121

摘要: **目的** 建立同时测定栀子金花丸中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 11 种成分的 UPLC 法。**方法** 采用 UPLC 法, Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长: 绿原酸为 324 nm, 栀子苷为 238 nm, 小檗碱为 345 nm, 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素为 276 nm, 芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为 254 nm。**结果** 被测定的 11 种成分色谱峰均有良好的分离度, 方法精密度、重复性的 RSD 均小于 2%; 在室温条件下 24 h 内稳定; 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系 ($r \geq 0.999\ 5$); 平均加样回收率 98.68%~100.47%, RSD 均 < 1.5%。**结论** 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于栀子金花丸的质量控制。

关键词: 栀子金花丸; UPLC; 绿原酸; 栀子苷; 黄芩苷; 小檗碱; 大黄素

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)07-0955-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.011

Simultaneous determination of 11 components in Zhizi Jinhua Pill by UPLC

CHEN Xiao-hu^{1,2}, SU Jing¹, WANG Hui¹, KUANG Gang^{1,2}, WANG Yang-li¹

1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

2. Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China

Abstract: Objective To establish a UPLC method for the simultaneous determination of 11 components, such as chlorogenic acid, geniposide, baicalin, berberine, wogonoside, baicalein, aloe-emodin, wogonin, emodin, chrysophanol, and physcion in Zhizi Jinhua Pill (ZJP). **Methods** The chromatographic separation was achieved on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A)-0.1% phosphate acid solution (B) as mobile phase at the flow rate of 0.4 mL/min for gradient elution; The column temperature was 35 °C. The determination wavelengths were 324 nm for chlorogenic acid, 238 nm for geniposide, 345 nm for berberine, 276 nm for baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin, and 254 nm for aloe-emodin, emodin, chrysophanol, and physcion. **Results** The 11 compounds were well separated. The RSD values of precision and reproducibility were all less than 2%. The stability was good in 24 h. The linear relationship between the concentration and peak areas of the 11 compounds was all linear ($r \geq 0.9995$). The average recoveries were between 98.68%—100.47% and the RSD values were all less than 1.5%. **Conclusion** The method is simple, reliable, and accurate, and could be used for the quality control of ZJP.

Key words: Zhizi Jinhua Pill; UPLC; chlorogenic acid; geniposide; baicalin; berberine; emodin

栀子金花丸 (Zhizi Jinhua Pill, ZJP) 是《中国药典》2010 年版一部收载的品种, 由栀子、黄芩、黄连、黄柏、金银花、大黄、知母和天花粉 8 味中药加工制成, 具有清热泻火、凉血解毒的功效, 临床上主要用于肺胃热盛所致口舌生疮、牙龈肿痛、目赤眩晕、咽喉肿痛、大便秘结等症^[1]。中药复方制剂的疗效是多味药中多种化学成分整体协同作用

的结果, 本处方中栀子的主要活性成分为栀子苷, 黄芩的主要活性成分为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素, 黄连、黄柏的主要成分为小檗碱, 金银花的主要成分为绿原酸, 大黄的主要活性成分为大黄素等蒽醌类化合物。目前, 《中国药典》2010 年版仅对方中臣药栀子中栀子苷进行了 HPLC 定量测定^[1], 难以有效控制该复方制剂的质量; 文献报

收稿日期: 2013-10-24

基金项目: 重庆市科技攻关项目 (CSTC2012ggB10001)

作者简介: 陈晓虎 (1978—), 男, 硕士, 主管中药师, 研究方向为中药质量研究。Tel: (023)86072753 E-mail: chenxiaohu78@126.com

道多采用 HPLC 法对方中黄芩、栀子或大黄等一味药进行定量测定^[2-7], 未能全面有效地控制该复方制剂的多种成分。本研究采用 UPLC 技术^[8-9], 建立了多波长同时测定栀子金花丸中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 11 种主要成分的方法, 此方法简便、快捷、准确, 专属性强, 可以更全面控制该复方制剂质量。

1 仪器与材料

KQ—500B 超声波仪 (江苏昆山市超声仪器有限公司); Acquity UPLC 系统 (包括二元超高压溶剂系统、自动进样恒温样品管理器、二极管阵列检测器、Empower 3 色谱工作站, 美国 Waters 公司); MSA225s 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

对照品绿原酸 (批号 110753-200413, 质量分数以 100%计)、栀子苷 (批号 110749-201115, 质量分数以 99.7%计)、盐酸小檗碱 (批号 110713-201212, 质量分数以 86.7%计)、黄芩苷 (批号 110715-201117, 质量分数以 91.7%计)、芦荟大黄素 (批号 110795-200504, 质量分数以 90.4%计)、黄芩素 (批号 111595-200402, 质量分数以 100%计)、汉黄芩素 (批号 111514-200403, 质量分数以 100%计)、大黄素 (批号 110756-200801, 质量分数以 100%计)、大黄酚 (批号 110796-201017, 质量分数以 99.6%计)、大黄素甲醚 (批号 110758-200509, 质量分数以 95.6%计) 均购于中国食品药品检定研究院, 对照品汉黄芩苷 (批号 MUST-13052312, 质量分数以 98.2%计) 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 栀子金花丸 (水丸, 规格: 9 g/袋, 山东孔圣堂制药有限公司生产 5 批, 批号分别为 130509、120831、120530、130660、130952); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~2 min, 5%~10%乙腈; 2~10 min, 10%~18%乙腈; 10~18 min, 18%~29%乙腈; 18~25 min, 29%~35%乙腈; 25~28 min, 35%~85%乙腈; 28~30 min, 85%~95%乙腈; 30~31 min, 95%~5%乙腈; 31~35 min, 5%乙腈; 体积流量为 0.4 mL/min; 检测波长: 绿原酸为 324 nm, 栀子苷为 238 nm, 小檗碱为 345 nm, 黄芩苷、汉

黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素为 276 nm, 芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为 254 nm; 柱温 35 °C; 进样量 1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 加 75%甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为绿原酸 0.840 mg/mL、栀子苷 0.864 mg/mL、黄芩苷 0.876 mg/mL、小檗碱 0.200 mg/mL、汉黄芩苷 0.793 mg/mL、黄芩素 0.885 mg/mL、芦荟大黄素 0.082 mg/mL、汉黄芩素 0.418 mg/mL、大黄素 0.129 mg/mL、大黄酚 0.102 mg/mL、大黄素甲醚 0.071 mg/mL 的混合对照品储备液; 分别精密量取 0.5、1、2.5、5、7.5 mL 储备液置 10 mL 量瓶中, 以 75%甲醇稀释至刻度, 制得系列混合对照品溶液, 避光保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的栀子金花丸, 研细, 混匀, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75%甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放至室温, 用 75%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取按栀子金花丸工艺方法分别制备的缺金银花、缺栀子、缺黄芩、缺黄连及黄柏、缺大黄的阴性对照样品, 按“2.2.2”项方法操作, 即得。

2.3 专属性考察

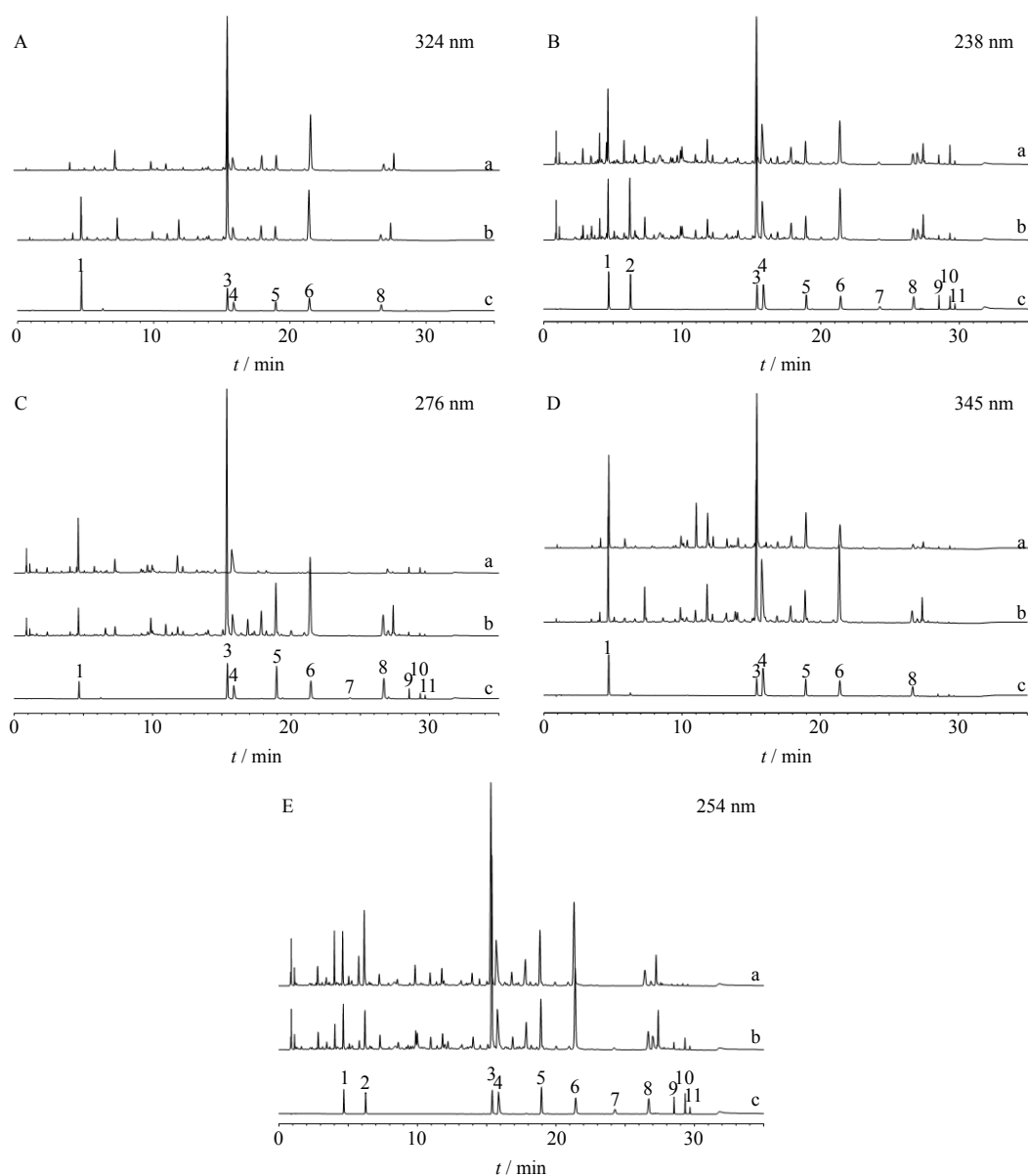
分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 1 μL, 进样分析, 结果见图 1。供试品溶液中各待测成分色谱峰的分离度均大于 1.5, 阴性对照溶液在相应位置处未见色谱峰, 方法专属性良好。

2.4 线性关系考察

在“2.1”项色谱条件下, 分别精密量取混合对照品储备液及系列质量浓度的混合对照品溶液 1 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程。将混合对照品溶液逐级稀释, 以 3 倍信噪比确定检测限, 结果见表 1。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下, 连续进样 6 次, 分别计算各组分色谱峰峰面积 RSD



1-绿原酸 2-栀子苷 3-黄芩苷 4-小檗碱 5-汉黄芩苷 6-黄芩素 7-芦荟大黄素 8-汉黄芩素 9-大黄素 10-大黄酚 11-大黄素甲醚

A-缺金银花阴性对照 B-缺栀子阴性对照 C-缺黄芩阴性对照 D-缺黄连、黄柏阴性对照 E-缺大黄阴性对照

1-chlorogenic acid 2-geniposide 3-baicalin 4-berberine 5-wogonoside 6-baicalein 7-aloe-emodin 8-wogonin 9-emodin 10-chrysophanol

11-phycion A-negative sample without *Lonicerae Japonicae Flos* B-negative sample without *Gardeniae Fructus* C-negative sample without *Scutellariae Radix* D-negative sample without *Coptidis Rhizoma* and *Phellodendri Cortex* E-negative sample without *Rhei Radix et Rhizoma*

图 1 阴性对照样品 (a)、栀子金花丸样品 (b)、混合对照品 (c) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC of negative sample (a), ZJP samples (b), and mixed reference substance (c)

值, 结果绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.41%、0.12%、0.33%、0.58%、0.39%、0.44%、0.62%、0.26%、0.52%、0.55%、0.37%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取样品 (批号 130509) 的供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪, 分

别计算各组分色谱峰峰面积 RSD, 结果绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.01%、0.95%、1.10%、0.79%、0.65%、1.24%、0.85%、0.96%、1.32%、1.24%、1.42%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取样品 (批号 130509), 按“2.2.2”项下方法

表 1 11 种成分的线性回归方程及检测限

Table 1 Linear regression equations and detection limits of 11 components

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	检测限 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y=10\,361\,X-82\,299$	42.0~840.0	0.999 8	0.23
栀子苷	$Y=5\,822\,X-46\,066$	43.2~864.0	0.999 9	0.33
黄芩苷	$Y=14\,341\,X-41\,976$	22.0~876.0	0.999 8	0.22
小檗碱	$Y=16\,619\,X-13\,209$	10.0~199.8	0.999 8	0.14
汉黄芩苷	$Y=16\,132\,X-16\,764$	39.7~793.4	0.999 9	0.15
黄芩素	$Y=21\,918\,X-84\,256$	44.2~884.5	0.999 8	0.10
芦荟大黄素	$Y=7\,860\,X-852$	4.1~82.0	0.999 5	0.09
汉黄芩素	$Y=25\,148\,X-113\,770$	20.9~418.6	0.999 9	0.08
大黄素	$Y=2\,253\,X-5\,919$	6.5~129.0	0.999 8	0.21
大黄酚	$Y=16\,562\,X-1\,134$	5.1~102.0	0.999 6	0.19
大黄素甲醚	$Y=6\,540\,X-760$	3.6~71.2	0.999 5	0.55

制备 6 份供试品溶液,测定计算各成分的量,结果绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚质量分数的 RSD 分别为 0.31%、1.17%、1.02%、1.39%、0.98%、1.02%、1.06%、0.95%、1.51%、1.74%、1.55%,表明方法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密称取已测定的栀子金花丸样品(批号 130509)共 6 份,每份 0.5 g,置具塞锥形瓶中,分别精密加入各对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法平行制备成供试品溶液,测定计算各成分的回收率,结果绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄

芩苷、黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的平均回收率分别为 100.2%、99.56%、100.34%、100.65%、99.74%、98.68%、99.65%、100.47%、98.88%、99.05%、99.67%,RSD 分别为 0.32%、0.87%、0.91%、1.29%、0.98%、0.62%、1.32%、1.45%、0.96%、1.11%、1.05%。

2.9 样品测定

取 5 批(批号分别为 130509、120831、120530、130660、130952)样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批平行 2 份,各进样 1 μL ,记录峰面积,按外标法计算各样品中各成分的量,取平均值,结果见表 2。

表 2 栀子金花丸中 11 种成分测定结果 ($n=2$)Table 2 Determination of 11 components in ZJP ($n=2$)

批号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	绿原酸	栀子苷	黄芩苷	小檗碱	汉黄芩苷	黄芩素	芦荟大黄素	汉黄芩素	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
130509	4.36	5.68	20.98	2.57	3.83	5.93	0.26	1.53	1.05	0.21	0.21
120831	4.12	5.58	21.24	2.65	3.74	4.62	0.24	1.31	1.12	0.22	0.18
120530	4.01	5.71	21.35	3.01	3.80	5.01	0.21	1.37	1.02	0.27	0.20
130660	3.56	4.17	25.34	2.54	4.52	6.32	0.65	1.74	3.14	0.78	0.65
130952	3.23	4.15	22.36	2.04	4.01	5.84	0.53	1.42	2.74	0.67	0.54

3 讨论

根据 11 种化学成分的理化性质和色谱行为,分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液等流动相系统,结果表明纯水系统小檗碱和蒽醌类化合物色谱峰对称性差,加酸后可明显改善峰型;甲醇系统小檗碱峰较宽且对称性差,

最终采用乙腈-0.1%磷酸水溶液组成的流动性系统。经多次优化梯度洗脱比例,使各色谱峰的分离度、对称性和理论塔板数均符合要求。

采用二极管阵列检测器在 200~400 nm 分别对各对照品溶液进行了全波长扫描,以选择波长,结果绿原酸、栀子苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、

黄芩素、芦荟大黄素、汉黄芩素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的最大吸收波长分别为 324、238、276、345、276、276、254、276、254、254、254 nm, 在同一波长下检测难免误差较大。为提高分析方法的灵敏度, 减少干扰, 本研究采用多波长检测, 选择 324 nm 波长测定绿原酸, 238 nm 波长测定栀子苷, 276 nm 波长测定黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 4 种成分, 345 nm 波长测定小檗碱, 254 nm 波长测定芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种成分。

本实验考察了 100%、50%、75% 甲醇及 100%、50% 乙醇等提取溶剂, 结果 75% 甲醇提取效率最高且干扰成分较少; 以 75% 甲醇为提取溶剂, 分别考察了加热回流和超声提取 2 种提取方式, 结果相同时间下 2 种提取方式无明显区别; 采用 75% 甲醇超声提取法, 分别考察了提取时间和提取溶剂用量, 结果采用 25 mL 溶剂提取 30 min, 11 种成分基本提尽, 故最终采用 25 mL 75% 甲醇超声提取 30 min。

本实验采用 UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分, 对 8 种药味中的 6 种的指标性成分均进行了定量测定, 方法简单、准确、可靠, 可用于栀子金花丸的质量控制。实验过程中, 还对金银花中的木犀草苷和咖啡酸、黄连中的巴马汀和药根碱、大

黄中的大黄酸、知母中的芒果苷等进行了考察, 但因其量较低、制剂过程中的损失或杂质的干扰等原因, 未能建立相关定量测定方法, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李春红, 何冰, 张金平, 等. HPLC 法同时测定栀子金花丸中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(17): 4509-4510.
- [3] 王晓可. 毛细管电泳法应用于清肺抑火丸和栀子金花丸质量控制的研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2011.
- [4] 严安定, 张永, 高健. RP-HPLC 法同时测定不同品种栀子及栀子金花丸中栀子苷 [J]. 中成药, 2012, 34(5): 965-967.
- [5] 黄燕萍, 黄焜. HPLC 法同时测定栀子金花丸中栀子苷和黄芩苷的含量 [J]. 中国药事, 2010, 24(10): 1002-1004.
- [6] 郑峰, 徐成志. HPLC 法测定栀子金花丸中大黄素、大黄酚的含量 [J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 1006-1007.
- [7] 黄丽玫, 王宇葶, 颜戊利, 等. HPLC 法测定栀子金花丸中盐酸黄柏碱的含量 [J]. 中药材, 2011, 34(8): 1300-1303.
- [8] 李耿, 王秀丽, 刘金欣, 等. UPLC 法同时测定乐脉颗粒中 11 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1435-1439.
- [9] 赵莉, 唐生安. UPLC 法同时测定荷丹片中 8 种指标成分 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2257-2260.