

· 研究报告 ·

## 双波长高效液相色谱法同时测定枇杷叶口服液中 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叶口服液中绿原酸、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-C<sub>18</sub>(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 枇杷叶口服液中的绿原酸、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, 可用于枇杷叶口服液的质量控制。

**[关键词]** 枇杷叶口服液; 高效液相色谱法; 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-C<sub>18</sub> (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

枇杷叶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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>, 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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4-5]</sup>, 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

枇杷叶口服液(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-C<sub>18</sub>(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、

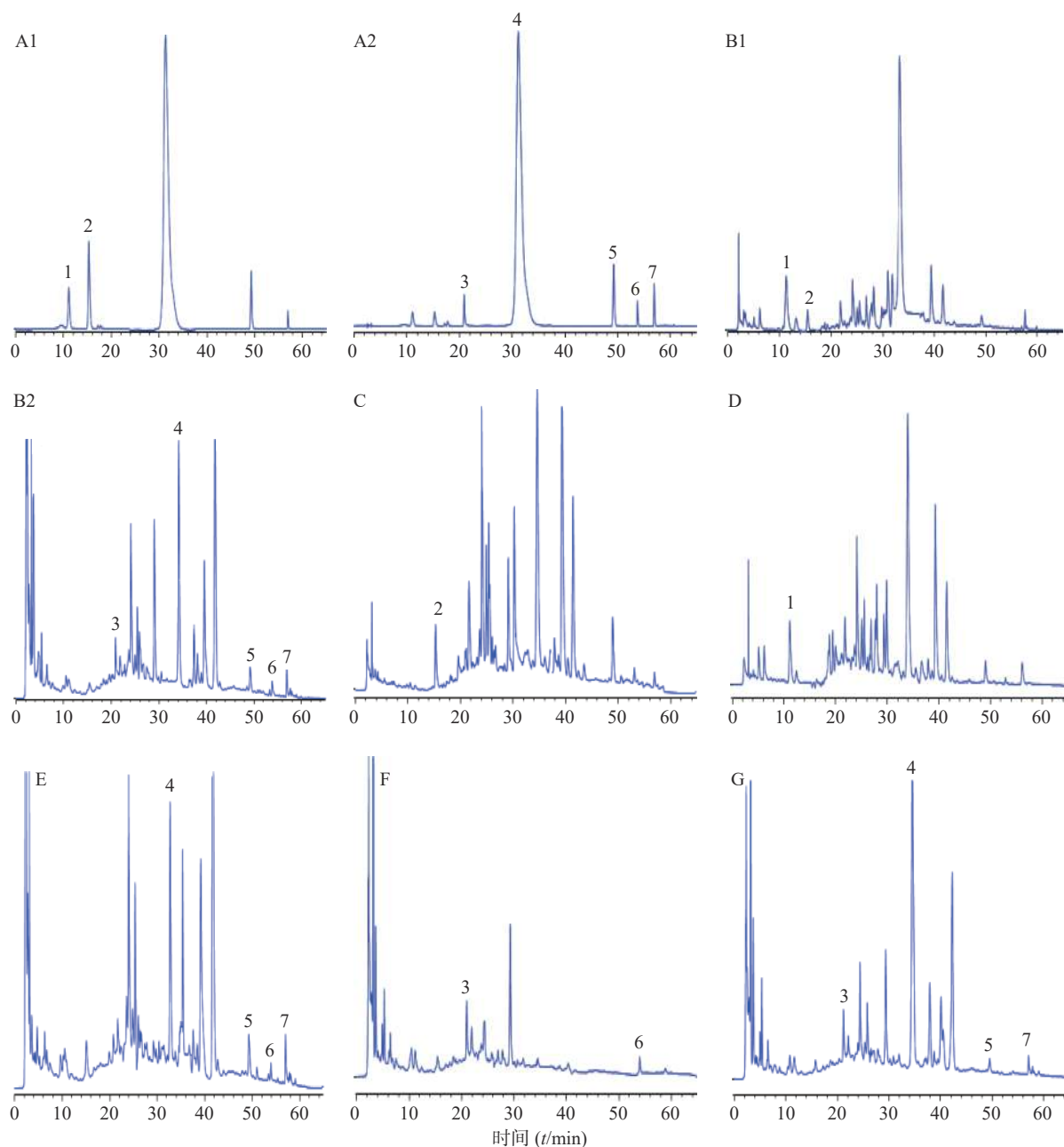


图 1 牡丹口服液 HPLC 色谱图

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.芍药苷阴性样品、F.黄芩苷阴性样品、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 牡丹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               | $r$    | 线性范围( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|------|--------------------|--------|--------------------------|
| 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<br>( $\mu\text{g}$ ) | 加入量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 测得量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 回收率<br>(%) | 平均回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------|------------|
| 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  
( $n=3$ ,  $\mu\text{g/ml}$ )

| 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. 枇杷颗粒剂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,刘烨,等. HPLC 法同时测定茵陈蒿口服液中 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