

HPLC-DAD 法同时测定栀子金花丸中 10 个成分的含量*

王福成¹, 李冬华^{1,2**}, 郭文宾³, 冯祥瑞¹, 马潇^{1,2}, 杨平荣^{1,2}

(1. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070; 2. 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 兰州 730070;

3. 甘肃省河西制药有限责任公司, 张掖 734000)

摘要 目的: 建立 HPLC-DAD 法同时测定栀子金花丸中栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 10 个成分的含量。方法: 采用 Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱 (0~15 min, 8%A → 40%A; 15~20 min, 40%A → 60%A; 20~30 min, 60%A → 90%A; 30~40 min, 90%A → 8%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 258 nm (检测栀子苷、芒果苷、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚), 280nm (检测黄芩苷和黄柏碱), 345 nm (检测绿原酸和小檗碱)。结果: 栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 10 个待测成分实现完全分离, 并与其他成分达到良好的分离; 上述成分线性范围分别为 0.66~16.43 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 7)、0.42~10.45 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 2)、0.30~7.50 μg · mL⁻¹ (*r*=0.995 7)、0.64~15.95 μg · mL⁻¹ (*r*=0.996 5)、0.59~15.06 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 6)、0.06~1.59 μg · mL⁻¹ (*r*=0.998 3)、0.27~6.78 μg · mL⁻¹ (*r*=0.993 8)、0.07~1.82 μg · mL⁻¹ (*r*=0.989 0)、0.04~1.03 μg · mL⁻¹ (*r*=0.995 2) 和 0.10~2.53 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 8); 平均加样回收率 (*n*=9) 分别为 100.4%、99.7%、99.0%、99.5%、99.2%、97.8%、97.9%、97.8%、97.8% 和 99.1%。5 批样品中上述 10 个成分的含量范围分别为 3.45~3.72、2.30~2.36、1.68~1.75、3.46~3.58、3.48~3.57、0.34~0.41、1.46~1.55、0.42~0.47、0.22~0.26、0.50~0.56 mg · g⁻¹。结论: 本法可为栀子金花丸的质量控制和考察提供参考。

关键词: 高效液相色谱-二极管阵列检测法; 栀子金花丸; 栀子苷; 绿原酸; 黄芩苷; 芒果苷; 小檗碱; 黄柏碱; 大黄酸; 大黄素; 芦荟大黄素; 大黄酚; 多成分同时测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2020) 01-0145-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.01.19

Simultaneous determination of ten components in Zhizi Jinhua pills by HPLC-DAD*

WANG Fu-cheng¹, LI Dong-hua^{1,2**}, GUO Wen-bin³,
FENG Xiang-rui¹, MA Xiao^{1,2}, YANG Ping-rong^{1,2}

(1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Inspection and Testing Technical Engineering Laboratory for Chinese Herbal and Tibetan Medicine, Lanzhou 730070, China; 3. Gansu Hexi Pharmaceutical Co., Ltd, Zhangye 734000, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of geniposide, chlorogenic

* 甘肃省科技重大专项 (项目编号: 17ZD2FA009)

** 通信作者 Tel: (0931) 7822987; E-mail: donghuamuzi@163.com

第一作者 Tel: (0931) 7822922; E-mail: 724320006@qq.com

acid, baicalin, mangiferin, berberine, phellodendrine, rhein, emodin, aloe emodin and chrysophanol in Zhizi Jinhua pills. **Methods:** HPLC separation was performed on a Luna C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile–0.2% acetic acid aqueous solution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ in a gradient elution mode (0–15 min, 8%A → 40%A; 15–20 min, 40%A → 60%A; 20–30 min, 60%A → 90%A; 30–40 min, 90%A → 8%A). The column temperature was at 35 °C and the detection wavelengths were set at 258 nm for geniposide, mangiferin, rhein, emodin, aloe emodin, and chrysophanol, 280 nm for baicalin and phellodendrine, and 345 nm for chlorogenic acid and berberine. **Results:** Geniposide, chlorogenic acid, baicalin, mangiferin, berberine, phellodendrine, rhein, emodin, aloe emodin and chrysophanol were completely separated, and well separated from other constituents. The linear ranges of above-mentioned components were 0.66–16.43 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 7), 0.42–10.45 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 2), 0.30–7.50 μg · mL⁻¹ (*r*=0.995 7), 0.64–15.95 μg · mL⁻¹ (*r*=0.996 5), 0.59–15.06 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 6), 0.06–1.59 μg · mL⁻¹ (*r*=0.998 3), 0.27–6.78 μg · mL⁻¹ (*r*=0.993 8), 0.07–1.82 μg · mL⁻¹ (*r*=0.989 0), 0.04–1.03 μg · mL⁻¹ (*r*=0.995 2) and 0.10–2.53 μg · mL⁻¹ (*r*=0.999 8), respectively. The average recoveries were 100.4%, 99.7%, 99.0%, 99.5%, 99.2%, 97.8%, 97.9%, 97.8%, 97.8% and 99.1%, respectively. The content ranges of ten ingredients were 3.45–3.72 mg · g⁻¹, 2.30–2.36 mg · g⁻¹, 1.68–1.75 mg · g⁻¹, 3.46–3.58 mg · g⁻¹, 3.48–3.57 mg · g⁻¹, 0.34–0.41 mg · g⁻¹, 1.46–1.55 mg · g⁻¹, 0.42–0.47 mg · g⁻¹, 0.22–0.26 mg · g⁻¹ and 0.50–0.56 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The established method provides references for the quality control and evaluate of Zhizi Jinhua pills.

Keywords: HPLC–DAD; Zhizi Jinhua pills; geniposide; chlorogenic acid; baicalin; mangiferin; berberine; phellodendrine; rhein; emodin; aloe emodin; chrysophanol; simultaneous determination of multicomponent

栀子金花丸收载于《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015年版一部,是由栀子、黄连、黄芩、黄柏、大黄、金银花、知母和天花粉8味中药制成的中药复方制剂,具有清热泻火、凉血解毒的功效,用于肺胃热盛、口舌生疮、牙龈肿痛、目赤眩晕、咽喉肿痛、吐血衄血和大便秘结的治疗^[1]。方中黄芩中含有黄芩苷等黄酮类化合物,金银花中主要含有绿原酸、槲皮素、木犀草素、木犀草苷等有机酸、黄酮和三萜皂苷类成分,知母中含芒果苷,栀子中含有栀子苷等环烯醚萜类成分及三萜类、黄酮类成分,其中小檗碱是黄连、黄柏中的共有成分,小檗碱、黄柏碱等生物碱成分具有较强的抗菌、消炎作用,栀子中的栀子苷具有保肝利胆、抗炎、抗氧化等多种作用^[2]。

对于栀子金花丸的测定,《中国药典》2015年版仅以栀子苷为指标进行含量测定,文献[3–10]采用同一波长进行测定。本文参考文献[11–15],建立 HPLC–DAD 法,利用 DAD 检测器设定 3 个检测通道,同时采用不同结构的化合物在不同紫外波长处检测,对栀子金花丸中含量较高的栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 10 个活性成分进行含量测定,为全面评价栀子金花丸的质量以及今后质量标准的提高提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(2695 溶剂管理系统,2996 二极管阵列检测器,Empower III 色谱工作站,Waters 公司);KQ-250 型超声波提取器(昆山市超声仪器有限公司);XR205SM–DR 型十万分之一分析天平(Pricisa 公司)。

1.2 对照品、样品及试剂

对照品栀子苷(批号 110749–201718,含量 97.6%)、绿原酸(批号 110753–201817,含量 96.8%)、黄芩苷(批号 110715–201016,含量 94.4%)、芒果苷(批号 110607–201702,含量 100.0%)、盐酸小檗碱(批号 110713–201814,含量 96.7%)、盐酸黄柏碱(批号 111895–201504,含量 98.0%)、大黄酸(批号 110756–201607,含量 99.3%)、大黄素(批号 110796–201512,含量 98.7%)、芦荟大黄素(批号 110795–201710,含量 98.1%)、大黄酚(批号 110796–201621,含量 99.2%)均购自中国食品药品检定研究院;栀子金花丸,批号 181203、181204、181205、180901、180902,由甘肃河西制药有限公司提供。

甲醇、乙腈为色谱纯(Merck 公司),水为超纯水,其余试剂(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)–0.2% 醋酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~15 min, 8%A → 40%A; 15~20 min, 40%A → 60%A; 20~30 min, 60%A → 90%A; 30~40 min, 90%A → 8%A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 258 nm (检测 栀子苷、芒果苷、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚)、280 nm (检测 黄芩苷、黄柏碱)、345 nm (检测 绿原酸、小檗碱), 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品储备液 分别精密称取 栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚的对照品适量, 加甲醇溶解并制成每 1 mL 分别含 栀子苷 657.0 μg, 绿原酸 418.0 μg, 黄芩苷 301.0 μg, 芒果苷 632.0 μg, 盐酸小檗碱 668.0 μg (小檗碱的量 = 盐酸小檗碱的量 / 1.1087), 盐酸黄柏碱 71.0 μg (黄柏碱的量 = 盐酸黄柏碱的量 / 1.1066), 大黄酸 271.0 μg, 大黄素 73.0 μg, 芦荟大黄素 41.0 μg, 大黄酚 101.0 μg 的混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品适量, 研细, 取约 0.5 g,

精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 20 min, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

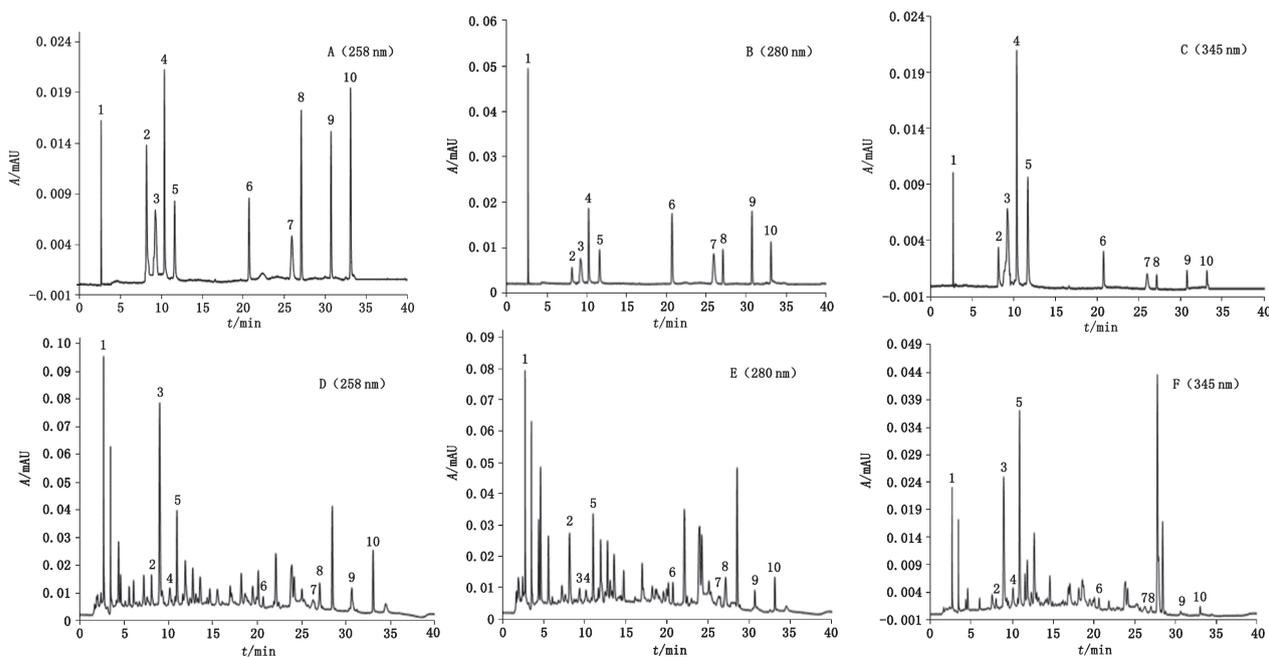
2.2.3 阴性样品溶液 按照 栀子金花丸 的处方比例分别制备不含 大黄、黄连和黄柏、黄芩、金银花、知母、栀子 以及只含 天花粉 (无 栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 10 个成分) 的 7 种阴性样品, 按 “2.2.2” 项下方法操作, 即得。

2.3 专属性试验

精密吸取 “2.2.1” 项下混合对照品储备液适量, 用甲醇稀释 100 倍, 配制成混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品溶液及 “2.2.2” 项下的供试品溶液及 “2.2.3” 项下的阴性样品溶液各 10 μL, 按 “2.1” 项下色谱条件进行试验, 结果见图 1、2。在上述色谱条件下, 栀子金花丸 中 10 个被测成分均达到基线分离, 与其他成分之间均无明显干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取上述混合对照品储备液适量, 用

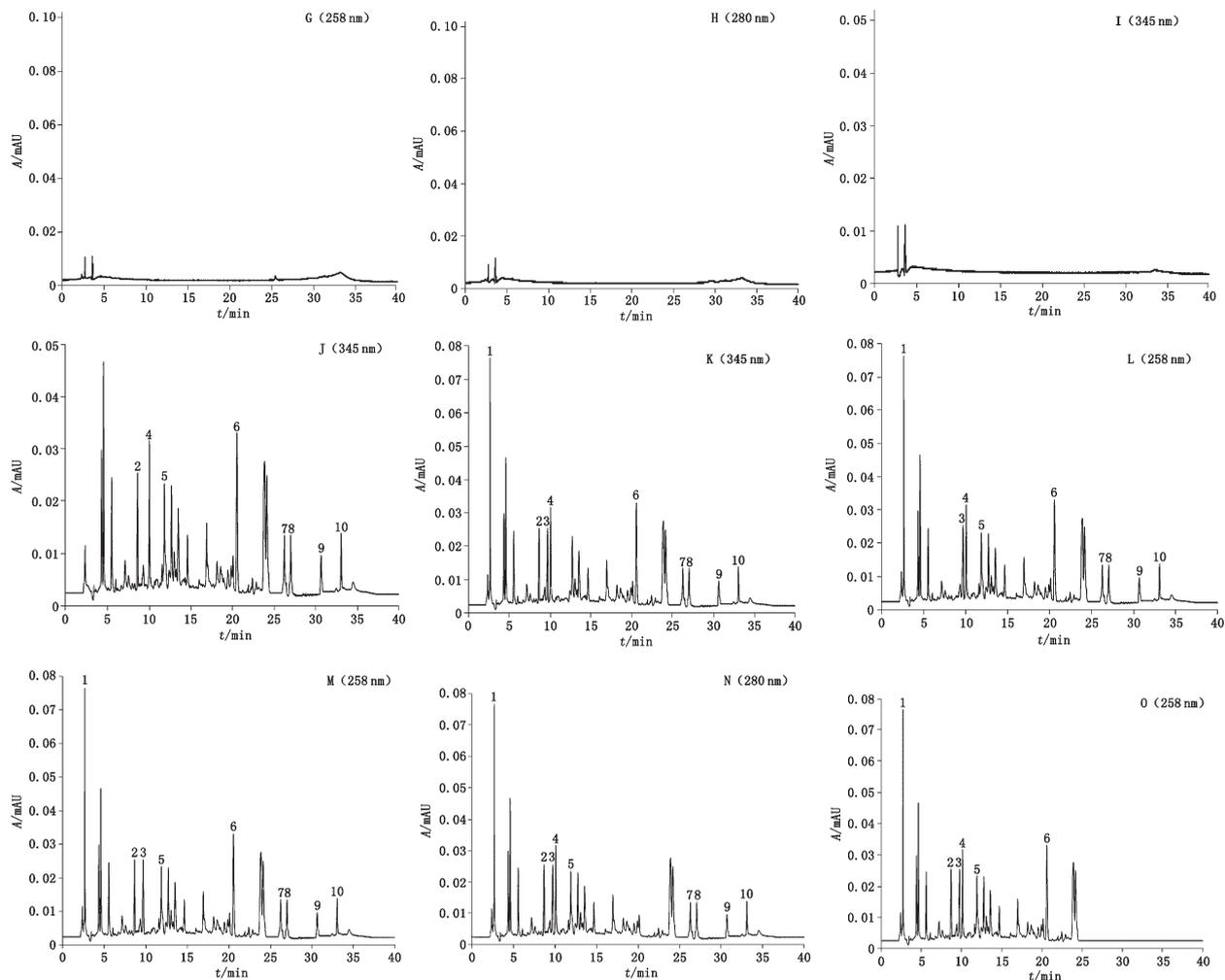


1. 黄柏碱 (phellodendrine) 2. 芒果苷 (mangiferin) 3. 小檗碱 (berberine) 4. 栀子苷 (geniposide) 5. 绿原酸 (chlorogenic acid) 6. 黄芩苷 (baicalin) 7. 芦荟大黄素 (aloe emodin) 8. 大黄酸 (rhein) 9. 大黄素 (emodin) 10. 大黄酚 (chrysophanol)

A. 混合对照品 (mixed reference substances, 258 nm) B. 混合对照品 (mixed reference substances, 280 nm) C. 混合对照品 (mixed reference substances, 345 nm) D. 样品 (sample, 258 nm) E. 样品 (sample, 280 nm) F. 样品 (sample, 345 nm)

图 1 混合对照品及样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances and sample



1~10. 同图 1 (same as Fig. 1)

G. 只含天花粉阴性样品 (negative sample without ten ingredients, 258 nm) H. 只含天花粉阴性样品 (negative sample without ten ingredients, 280 nm)
 I. 只含天花粉阴性样品 (negative sample without ten ingredients, 345 nm) J. 缺黄柏和黄连阴性样品 (negative sample without Coptidis Rhizoma and Phellodendri Cortex, 345 nm) K. 缺金银花阴性样品 (negative sample without Lonicerae Japonicae Flos, 345 nm) L. 缺知母阴性样品 (negative sample without Anemarrhena Rhizoma, 258 nm) M. 缺栀子阴性样品 (negative sample without Gardeniae Fructus, 258 nm) N. 缺黄芩阴性样品 (negative sample without Scutellariae Radix, 280 nm) O. 缺大黄阴性样品 (negative sample without Rhei Radix et Rhizoma, 258 nm)

图 2 阴性样品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of negative samples

甲醇逐级稀释, 配制成 6 个不同浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 每个浓度进样 2 次; 以对照品的进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程、相关系

数及线性范围见表 1。取混合对照品溶液, 逐级稀释并进样测定, 以仪器的信噪比 S/N 为 3 时计算检测下限 (LOD), 以仪器的信噪比 S/N 为 10 时计算定量下限 (LOQ), 结果见表 1。

表 1 10 个成分的线性关系、检测限和定量限结果

Tab. 1 Linear relationship, LOD and LOQ of ten constituents

| 成分 (component) | 回归方程 (regression equation) | r | 线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|----------------------|---|---------|---|--|--|
| 黄柏碱 (phellodendrine) | $Y=1.25 \times 10^3 X - 5.55 \times 10^3$ | 0.998 3 | 0.06~1.59 | 0.01 | 0.03 |
| 芒果苷 (mangiferin) | $Y=4.49 X - 5.55 \times 10^3$ | 0.996 5 | 0.64~15.95 | 0.03 | 0.08 |

表 1 (续)

| 成分 (component) | 回归方程 (regression equation) | r | 线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|------------------------|-------------------------------|---------|---|--|--|
| 小檗碱 (berberine) | $Y=12.77X+7.77 \times 10^4$ | 0.999 6 | 0.59~15.06 | 0.02 | 0.06 |
| 栀子苷 (geniposide) | $Y=6.13X+6.64 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.66~16.43 | 0.01 | 0.03 |
| 绿原酸 (chlorogenic acid) | $Y=12.88X+1.98 \times 10^4$ | 0.999 2 | 0.42~10.45 | 0.01 | 0.03 |
| 黄芩苷 (baicalin) | $Y=39.85X+8.75 \times 10^3$ | 0.995 7 | 0.30~7.50 | 0.01 | 0.03 |
| 芦荟大黄素 (aloe emodin) | $Y=273.44X+1.17 \times 10^4$ | 0.995 2 | 0.04~1.03 | 0.01 | 0.03 |
| 大黄酸 (emodin) | $Y=18.42X+6.78 \times 10^3$ | 0.993 8 | 0.27~6.78 | 0.01 | 0.03 |
| 大黄素 (emodin) | $Y=121.62X-2.79 \times 10^4$ | 0.989 0 | 0.07~1.82 | 0.01 | 0.03 |
| 大黄酚 (chrysophanol) | $Y=50.76X+2.48 \times 10^4$ | 0.999 8 | 0.10~2.53 | 0.01 | 0.03 |

2.5 精密度试验

吸取“2.2.1”项下混合对照品储备液适量,用甲醇稀释 100 倍,配制成的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件下连续重复进样 6 次,测得栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚峰面积 RSD 依次分别为 1.3%、0.45%、1.2%、0.63%、0.32%、1.8%、0.64%、1.3%、1.6% 和 0.86%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温下于 0、2、4、6、8、10 h 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,测得栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚峰面积 RSD 依次分别为 1.5%、0.73%、1.1%、1.1%、1.4%、1.2%、1.6%、1.2%、0.92% 和 0.74%,表明供试品溶液在 10 h 内测定,稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批栀子金花丸(批号 181203),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条

件进样测定,测得栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚平均含量分别为 3.68、2.32、1.71、3.52、3.51、0.35、1.46、0.44、0.23、0.54 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.0%、1.3%、2.6%、1.0%、1.6%、1.6%、2.3%、1.6%、2.2% 和 1.4%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的栀子金花丸(批号 181203) 9 份,每份 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,每 3 份一组,分别精密加入 10 个被测成分的混合对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法,自“加入甲醇 50 mL”起操作,制得低、中、高 3 个浓度的供试溶液各 3 份。按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果见表 2,表明回收率良好。

2.9 样品含量测定

目前,本地市场上销售的栀子金花丸均为甘肃河西制药有限公司产品,因条件所限,仅从该公司收集到 5 批样品,按“2.1”项方法进行 10 个成分的测定,外标法计算各成分的含量,结果见表 3。

表 2 10 个成分的加样回收率

Tab. 2 Recovery for ten components

| 成分 (component) | 样品中量 (content) / μg | 加入量 (added) / μg | 测得量 (measured) / μg | 回收率 (recovery) / % | 平均回收率 (average recovery) / % (n=3) | RSD/% (n=3) | 平均回收率 (average recovery) / % (n=9) |
|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--|----------------|--|
| 栀子苷 (geniposide) | 188.43 | 93.86 | 281.67 | 99.8 | 100.1 | 0.90 | 100.4 |
| | 193.07 | 93.86 | 287.56 | 100.2 | | | |
| | 191.64 | 93.86 | 286.53 | 100.4 | | | |
| | 199.61 | 187.71 | 385.54 | 99.5 | 99.6 | 1.43 | |

表 2(续)

| 成分 (component) | 样品中量 (content)/ µg | 加入量 (added)/ µg | 测得量 (measured)/ µg | 回收率 (recovery)/ % | 平均回收率 (average recovery)/ %(n=3) | RSD/% (n=3) | 平均回收率 (average recovery)/% (n=9) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--|----------------|--|
| | 201.08 | 187.71 | 387.66 | 99.7 | | | |
| | 189.17 | 187.71 | 375.11 | 99.5 | | | |
| | 188.17 | 281.57 | 476.32 | 101.4 | 101.4 | 0.60 | |
| | 188.19 | 281.57 | 475.87 | 101.3 | | | |
| | 193.05 | 281.57 | 482.21 | 101.6 | | | |
| 绿原酸 (chlorogenic acid) | 119.10 | 59.71 | 177.67 | 99.4 | 99.7 | 0.89 | 99.7 |
| | 122.03 | 59.71 | 180.74 | 99.5 | | | |
| | 121.12 | 59.71 | 181.32 | 100.3 | | | |
| | 126.16 | 119.43 | 242.40 | 98.7 | 99.0 | 1.47 | |
| | 128.25 | 119.43 | 245.70 | 99.2 | | | |
| | 119.77 | 119.43 | 237.10 | 99.1 | | | |
| | 118.93 | 179.14 | 300.16 | 100.7 | 100.4 | 0.26 | |
| | 118.95 | 179.14 | 299.58 | 100.5 | | | |
| | 122.02 | 179.14 | 301.46 | 100.1 | | | |
| 黄芩苷 (baicalin) | 87.20 | 43.00 | 128.69 | 98.8 | 98.5 | 0.54 | 99.0 |
| | 89.34 | 43.00 | 130.38 | 98.5 | | | |
| | 88.68 | 43.00 | 129.40 | 98.3 | | | |
| | 92.37 | 86.00 | 175.87 | 98.6 | 98.6 | 1.71 | |
| | 95.36 | 86.00 | 179.87 | 99.2 | | | |
| | 89.76 | 86.00 | 172.53 | 98.2 | | | |
| | 87.08 | 129.00 | 215.56 | 99.8 | 99.9 | 0.68 | |
| | 87.09 | 129.00 | 215.77 | 99.9 | | | |
| | 89.34 | 129.00 | 218.78 | 100.2 | | | |
| 芒果苷 (mangiferin) | 180.49 | 90.29 | 269.43 | 99.5 | 99.4 | 0.65 | 99.5 |
| | 184.93 | 90.29 | 273.76 | 99.5 | | | |
| | 183.55 | 90.29 | 271.98 | 99.3 | | | |
| | 191.19 | 180.57 | 369.34 | 99.4 | 99.3 | 1.50 | |
| | 197.38 | 180.57 | 376.02 | 99.5 | | | |
| | 185.45 | 180.57 | 362.43 | 99.0 | | | |
| | 180.23 | 270.86 | 448.74 | 99.5 | 99.8 | 0.60 | |
| | 180.25 | 270.86 | 451.02 | 100.0 | | | |
| | 184.91 | 270.86 | 455.31 | 99.9 | | | |

表 2(续)

| 成分 (component) | 样品中量 (content)/ μg | 加入量 (added)/ μg | 测得量 (measured)/ μg | 回收率 (recovery)/ % | 平均回收率 (average recovery)/ % (n=3) | RSD/% (n=3) | 平均回收率 (average recovery)/% (n=9) |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---|----------------|--|
| 小檗碱 (berberine) | 179.25 | 86.07 | 262.45 | 98.9 | 99.0 | 0.96 | 99.2 |
| | 183.66 | 86.07 | 267.49 | 99.2 | | | |
| | 182.30 | 86.07 | 265.53 | 98.9 | | | |
| | 189.88 | 172.14 | 358.83 | 99.1 | 98.9 | 1.24 | |
| | 196.03 | 172.14 | 363.24 | 98.7 | | | |
| | 184.25 | 172.14 | 352.43 | 98.9 | | | |
| | 180.23 | 258.22 | 436.52 | 99.6 | 99.6 | 0.70 | |
| | 180.25 | 258.22 | 436.06 | 99.5 | | | |
| 184.91 | 258.22 | 441.58 | 99.7 | | | | |
| 黄柏碱 (phellodendrine) | 18.00 | 9.17 | 26.53 | 97.6 | 97.9 | 0.97 | 97.8 |
| | 18.45 | 9.17 | 27.16 | 98.4 | | | |
| | 18.31 | 9.17 | 26.86 | 97.7 | | | |
| | 19.07 | 18.33 | 36.18 | 96.7 | 97.3 | 1.42 | |
| | 19.69 | 18.33 | 37.10 | 97.6 | | | |
| | 18.50 | 18.33 | 35.89 | 97.5 | | | |
| | 17.98 | 27.5 | 44.78 | 98.5 | 98.3 | 0.60 | |
| | 17.98 | 27.5 | 44.68 | 98.2 | | | |
| 18.44 | 27.5 | 45.18 | 98.4 | | | | |
| 大黄酸 (rhein) | 74.77 | 38.71 | 110.76 | 97.6 | 97.9 | 0.97 | 97.9 |
| | 76.61 | 38.71 | 113.41 | 98.3 | | | |
| | 76.04 | 38.71 | 112.16 | 97.7 | | | |
| | 79.20 | 77.43 | 151.48 | 96.7 | 97.2 | 1.10 | |
| | 81.77 | 77.43 | 155.30 | 97.6 | | | |
| | 78.68 | 77.43 | 152.08 | 97.4 | | | |
| | 74.66 | 116.14 | 188.05 | 98.6 | 98.6 | 0.47 | |
| | 74.67 | 116.14 | 188.44 | 98.8 | | | |
| 76.60 | 116.14 | 189.75 | 98.5 | | | | |
| 大黄素 (emodin) | 23.03 | 10.43 | 33.05 | 98.8 | 97.4 | 0.67 | 97.8 |
| | 23.60 | 10.43 | 33.03 | 97.1 | | | |
| | 23.43 | 10.43 | 32.66 | 96.5 | | | |
| | 24.40 | 20.86 | 44.12 | 97.5 | 97.8 | 1.88 | |
| | 25.19 | 20.86 | 45.27 | 98.3 | | | |
| | 23.39 | 20.86 | 43.24 | 97.7 | | | |
| | 23.00 | 31.29 | 53.33 | 98.2 | 98.3 | 0.61 | |
| | 23.00 | 31.29 | 53.38 | 98.3 | | | |
| 23.60 | 31.29 | 53.92 | 98.2 | | | | |

表 2(续)

| 成分 (component) | 样品中量 (content)/ μg | 加入量 (added)/ μg | 测得量 (measured)/ μg | 回收率 (recovery)/ % | 平均回收率 (average recovery)/ %(n=3) | RSD/% (n=3) | 平均回收率 (average recovery)/% (n=9) |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--|----------------|--|
| 芦荟大黄素 (aloe emodin) | 11.93 | 5.86 | 17.15 | 96.4 | 99.4 | 2.36 | 97.8 |
| | 12.02 | 5.86 | 18.11 | 101.3 | | | |
| | 11.98 | 5.86 | 17.92 | 100.5 | | | |
| | 12.42 | 11.71 | 23.21 | 96.2 | 96.4 | 0.93 | |
| | 12.23 | 11.71 | 23.08 | 96.4 | | | |
| | 11.80 | 11.71 | 22.71 | 96.6 | | | |
| | 11.71 | 17.57 | 28.53 | 97.4 | 97.5 | 0.64 | |
| | 11.71 | 17.57 | 28.56 | 97.5 | | | |
| | 12.01 | 17.57 | 28.86 | 97.6 | | | |
| 大黄酚 (chrysophanol) | 27.45 | 10.43 | 37.13 | 98.0 | 98.4 | 0.98 | 99.1 |
| | 28.12 | 10.43 | 37.88 | 98.3 | | | |
| | 27.91 | 10.43 | 37.93 | 98.9 | | | |
| | 29.07 | 20.86 | 49.38 | 98.9 | 99.2 | 0.51 | |
| | 30.02 | 20.86 | 50.00 | 98.3 | | | |
| | 28.68 | 20.86 | 49.68 | 100.3 | | | |
| | 27.41 | 43.29 | 70.39 | 99.6 | 99.7 | 0.65 | |
| | 27.41 | 43.29 | 70.45 | 99.7 | | | |
| | 28.12 | 43.29 | 71.40 | 100.0 | | | |

表 3 栀子金花丸中 10 个成分的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 3 Determination results of ten components in Zhizi Jinhua pills

| 成分 (component) | lot No. 181203 | lot No. 181204 | lot No. 181205 | lot No. 180901 | lot No. 180902 |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 栀子苷 (geniposide) | 3.68 | 3.72 | 3.66 | 3.45 | 3.52 |
| 绿原酸 (chlorogenic acid) | 2.33 | 2.35 | 2.30 | 2.31 | 2.36 |
| 黄芩苷 (baicalin) | 1.70 | 1.72 | 1.68 | 1.75 | 1.73 |
| 芒果苷 (mangiferin) | 3.52 | 3.56 | 3.46 | 3.49 | 3.58 |
| 小檗碱 (berberine) | 3.50 | 3.57 | 3.55 | 3.48 | 3.54 |
| 黄柏碱 (phellodendrine) | 0.35 | 0.38 | 0.40 | 0.41 | 0.34 |
| 大黄酸 (rhein) | 1.46 | 1.52 | 1.52 | 1.49 | 1.55 |
| 大黄素 (emodin) | 0.45 | 0.42 | 0.47 | 0.45 | 0.46 |
| 芦荟大黄素 (aloe emodin) | 0.23 | 0.25 | 0.26 | 0.24 | 0.22 |
| 大黄酚 (chrysophanol) | 0.54 | 0.52 | 0.50 | 0.56 | 0.54 |

3 讨论

3.1 测定指标的确定

在现行栀子金花丸的质量标准中,仅以栀子苷为指标进行定量质控,不能全面反映该药物中多组分共同作用起效的特点,本实验以栀子金花丸处方中的主要成分栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 10 个测定成分作为栀子、金银花、黄芩、知母、黄柏、黄连、大黄 7 个中药材法定质量评价指标。通过方法学的研究,建立了栀子金花丸中栀子苷、绿原酸等 10 个活性成分的测定指标。

3.2 色谱柱和流动相的选择

本实验分别比较了 3 种不同品牌不同型号的色谱柱 [Agilent ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)]。由 3 名实验人员,分别采用 3 种不同色谱柱分别对同一批样品进行测定,测定样品栀子苷含量的 RSD ($n=9$) 为 1.1%,结果表明 Luna C₁₈ 色谱柱对栀子金花丸水溶性成分的分离效果最佳。

其次本试验测定指标为生物碱盐、有机酸和苷类,故分别对流动相中的酸(磷酸、甲酸、醋酸)进行了考察,将流动相体系的 pH 由低到高调节至不同值进行分析,最终确定采用 0.2% 醋酸 (pH 约 3) 酸度较为适宜,故选择乙腈 -0.2% 醋酸溶液作为流动相。

3.3 DAD 检测波长的选择

栀子金花丸中栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚的紫外吸收波长差异较大^[1],栀子苷在 238 nm,大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚在 254 nm,黄芩苷、黄柏碱在 280 nm,绿原酸和小檗碱在 345 nm 有强吸收,为使这些成分在一次进样中同时得到测定,本研究综合考虑,利用 DAD 检测器进行全波长扫描后,设定 258、280 和 345 nm 3 个检测通道,有效地分离并定量了栀子金花丸中的 10 个成分,经方法学考察,证实了该方法的准确性与可靠性,从而为栀子金花丸更全面的质量评价和控制提供了参考。

3.4 小结

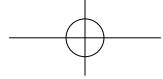
含量测定结果表明,栀子苷、绿原酸、黄芩苷、芒果苷、小檗碱、黄柏碱、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 10 个成分为不同批次栀子金花丸,栀子苷含量均符合《中国药典》2015 年版一部该品种项下

规定(不得低于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),5 批次样品的 HPLC 色谱行为相似度较高,各批次样品间待测成分含量差异较小,说明栀子金花丸的药材来源和生产工艺均较为稳定。

本研究采用 3 个不同波长切换,一种色谱条件和系统适用性试验,同时测定,有良好的分离效果,样品提取方法简便,可作为该产品质量考察和控制的参考。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版.一部[S].2015:1538
ChP 2015. Vol I [S]. 2015:1538
- [2] 肖培根,李大鹏,杨世林.新编中药志.第三卷[M].北京:化学工业出版社,2002
XIAO PG, LI DP, YANG SL. Modern Chinese Materia Medica. Vol III [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002
- [3] 曲蕃升,邢丽媛,许丽娜.栀子金花丸多指标成分 HPLC 含量测定方法研究[J].现代中药研究与实践,2017,31(1):56
QU FS, XING LY, XU LN. Multiple compounds determination of Zhizi-Jinhua pills by high-performance liquid chromatography [J]. Res Pract Chin Med, 2017, 31(1):56
- [4] 赵倩,冯伟红,张启伟,等.“一测多评”法用于栀子金花丸多成分含量测定的可行性研究[J].中国中药杂志,2014,39(10):1826
ZHAO Q, FENG WH, ZHANG QW, et al. Feasibility study of QAMS for quantitative analysis of multiple structural types of ingredients in Zhizi Jinhua pill [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(10):1826
- [5] 陈帅,王慧竹,薛健飞,等.栀子金花丸 HPLC 指纹图谱及其与体外抗氧化活性的相关性分析[J].中国药房,2016,27(22):3077
CHEN S, WANG HZ, XUE JF, et al. Analysis of the relationship of HPLC fingerprint of Zhizi Jinhua pills with its *in vitro* antioxidant activity [J]. China Pharm, 2016, 27(22):3077
- [6] 黎晓玲,彭瑞光. HPLC 同时测定栀子金花丸中 4 种成分的含量[J].安徽农业科学,2014,42(6):1665
LI XL, PENG RG. Simultaneous determination of 4 components in Zhizijinhua pill by HPLC [J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(6):1665
- [7] 蒋范任,蔡洪鲲,周翀,等.反相高效液相色谱法同时测定栀子金花丸中栀子苷、小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚的含量[J].中南药学,2015,13(2):172
JIANG FR, CAI HK, ZHOU C, et al. Determination of geniposide, berberine, baicalin, rhein, emodin and chrysophanol in Zhizi Jinhua pill by RP-HPLC [J]. Cent South Pharm, 2015, 13(2):172
- [8] 高晓燕,卢建秋.栀子金花丸中栀子苷、黄芩苷、番泻苷 A 和番泻苷 B 的含量测定方法研究[J].中国中药杂志,2009,34(20):2649



- GAO XY, LU JQ. Study on determination of geniposide, baicalin, sennoside A and sennoside B in Zhizijinhua Wan [J]. *China J Chin Mater Med*, 2009, 34(20): 2649
- [9] 温金莲, 周清, 宋粉云. RP-HPLC 测定栀子金花丸中芒果苷的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(17): 65
- WEN JL, ZHOU Q, SONG FY. Determination of mangiferin in Zhizi Jinhua Wan by RP-HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2011, 17(17): 65
- [10] 郑峰, 徐成志. HPLC 法测定栀子金花丸中大黄素和大黄酚的含量 [J]. *安徽医药*, 2007, 1(11): 1006
- ZHENG F, XU CZ. Determination of emodin and chrysophanol in Zhizijinhua Wan by HPLC [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2007, 1(11): 1006
- [11] 何昱, 周惠芬, 黄丽娜, 等. HPLC-DAD 法同时测定谷红注射液中 7 个组分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(6): 954
- HE Y, ZHOU HF, HUANG LN, *et al.* Simultaneous quantification of seven components in Guhong injection by HPLC-DAD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(6): 954
- [12] 郭小龙, 蔡敏, 陈勇, 等. 液相色谱法同时测定栀子金花丸中栀子苷和盐酸小檗碱的含量 [J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(3): 283
- GUO XL, CAI M, CHEN Y, *et al.* Simultaneous determination of geniposide and berberine hydrochloride in Zhizijinhua Wan by high performance liquid chromatography [J]. *J Hubei Univ (Nat Sci)*, 2007, 29(3): 283
- [13] 王常顺, 刘永利, 段吉平, 等. 双波长-UPLC 法同时测定知柏地黄丸中 6 个成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(2): 256
- WANG CS, LIU YL, DUAN JP, *et al.* Simultaneous quantification of six components in Zhibai Dihuang pills by dual-wavelength UPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(2): 256
- [14] 郝乘仪, 于蕾, 昌盛, 等. HPLC-DAD 法同时测定栀芩清热合剂中多指标成分含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(9): 1601
- HAO CY, YU L, CHANG S, *et al.* Simultaneous determination of index compounds in Zhiqin Qingre mixture by HPLC-DAD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(9): 1601
- [15] 陈晓虎, 苏晶, 王慧, 等. UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分 [J]. *中草药*, 2014, 45(6): 955
- CHEN XH, SU J, WANG H, *et al.* Simultaneous determination of 11 components in Zhizijinhua pill by UPLC [J]. *China Tradit Herb Drugs*, 2014, 45(6): 955

(本文于 2019 年 7 月 31 日收到)