

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.10.06

HPLC 法同时测定茵栀解毒颗粒中 3 种有效成分的研究

钟寒辉¹, 王彬², 陈晓林², 余功富³, 林仙军^{1*}

(1. 绿城农科检测技术有限公司, 杭州 310051; 2. 浙江省动物疫病预防控制中心, 杭州 311101;

3. 台州市路桥区横街动物卫生所, 浙江台州 318020)

[收稿日期] 2023-03-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 09-0040-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了建立同时测定中兽药茵栀解毒颗粒中绿原酸、栀子苷和黄芩苷的方法, 研究采用高效液相色谱法, 选用 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈和 0.05% 磷酸溶液为流动相, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 230 nm。结果表明, 栀子苷在 3.110 ~ 155.5 μg/mL、黄芩苷在 1.897 ~ 94.86 μg/mL、绿原酸在 2.478 ~ 123.9 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999, 平均加样回收率分别为 97.1%、96.2% 和 95.3%。该试验操作简便、快捷、定性、定量准确, 能满足中兽药茵栀解毒颗粒中 3 种有效成分同时检测的需要。

[关键词] 茵栀解毒颗粒; 绿原酸; 栀子苷; 黄芩苷; 高效液相色谱法

Research on the Simultaneous Determination of Three Active Ingredients in Gardenia Jasminoides Granules by HPLC

ZHONG Han-hui¹, WANG Bin², CHEN Xiao-lin², YU Gong-fu³, LIN Xian-jun^{1*}

(1. Greentown Agricultural Testing Technology Co., Ltd., Hangzhou 310051, China;

2. Zhejiang Province Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feed, Hangzhou 311101, China;

3. Hengjie Animal Health Supervision Institute Luqiao District Taizhou, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

Corresponding author: LIN Xian-jun, E-mail: lxj1000@163.com

Abstract: In order to establish a method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, gardenia glucoside and baicalin in the Chinese veterinary medicine gardenia antidotes, a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile and 0.05% phosphoric acid as the mobile phases was used, the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 10 μL, the column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 230 nm. The linearity of the method was good in the range of 3.110 μg/mL to 155.5 μg/mL for gardenia glucoside, 1.897 μg/mL to 94.86 μg/mL for baicalin and 2.478 μg/mL to 123.9 μg/mL for chlorogenic acid, with the correlation coefficients greater than 0.999. The average recoveries were 97.1%, 96.2% and 95.3%, respectively. The test is simple, rapid, qualitative and quantitative, and can meet the needs of the simultaneous determination of the three active ingredients in the Chinese veterinary medicine gardenia antidote granules.

作者简介: 钟寒辉, 工程师, 从事食品、农产品和药品质量安全检测技术研究和管理工作。

通讯作者: 林仙军。E-mail: lxj1000@163.com

Key words: yinzhi jiedu granule; chlorogenic acid; gardenia glycosides; baicalin; high performance liquid chromatography

中兽药茵栀解毒颗粒由 5 味药材(茵陈、栀子、黄芩、虎杖和钩藤)通过一定的生产工艺制得^[1-2]。具有清热解毒、疏肝解痉功效^[3],兽医临床上用于雏鸭病毒性肝炎的治疗^[4-5]。《兽药质量标准(2017 年版)中药卷》收录了该标准^[1],标准采用 4 个薄层色谱系统,分别鉴别栀子苷、黄芩苷、茵陈对照药材和虎杖对照药材,操作繁琐并且需要用到三氯甲烷、丙酮等多种管制试剂和一般有机试剂,试剂使用量也较大,对操作人员不友好。在含量测定方面,标准仅测定来自处方中茵陈的有效成分绿原酸的含量,评价药物质量方面不够全面。

高效液相色谱法作为一种较成熟的分离技术^[6],具有分离速度快、效率高、灵敏度高^[7-8]、定性定量准确等优势^[9-10],在兽药检验和质量监控中发挥越来越大的作用^[11-12]。本试验采用高效液相色谱法对中兽药茵栀解毒颗粒中栀子苷、黄芩苷和绿原酸同时检测的方法进行了研究,建立方法的基础上开展了实际样品检测。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司,型号 1260,配 G4212A 检测器);色谱柱(Agilent Eclipse XDB-C18,250 mm×4.6 mm,5 μm);电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司,型号 AG-285);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司 KQ-500E 型)。

1.2 主要试剂 黄芩苷对照品(中国兽医药品监察所生产,批号为 Z0271705,含量为 96.8%);栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院生产,批号为 110749-201115,含量为 99.7%);绿原酸对照品(中国兽医药品监察所生产,批号为 Z0261702,含量为 98.3%)。茵栀解毒颗粒(浙江企业生产,批号为 20210822、20210823 和 20210824 等 3 批次)。

1.3 对照品贮备溶液 取黄芩苷 9.80 mg、绿原酸 12.60 mg 和栀子苷 15.60 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,震荡使溶解并定容。

1.4 供试品溶液 称取茵栀解毒颗粒约 1 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇溶液约 15 mL,超声约 20 min,用 50% 甲醇溶液定容。

1.5 色谱条件 采用 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:0.05% 磷酸溶液(A)和乙腈(B),梯度洗脱程序见表 1;进样量 10 μL,柱温 30 ℃,流速为 1.0 mL/min,用二极管阵列检测器进行扫描,扫描范围为 210 nm~400 nm,记录 230 nm 波长处的色谱图。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Mobile phase gradient elution procedure			
时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	流速(mL/min)
0.0	90	10	1.0
8.0	90	10	1.0
25.0	40	60	1.0
35.0	40	60	1.0
35.1	90	10	1.0
40.0	90	10	1.0

1.6 方法学考察

1.6.1 线性范围 取对照品贮备溶液用 50% 甲醇溶液分别稀释 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍和 50 倍,作为线性实验溶液,取 10 μL 进样,记录色谱图和峰面积,以峰面积对浓度作图,绘制标准曲线。

1.6.2 精密度和稳定性试验 按照建立的方法测定同一份样品 6 次(批号为 20210822),计算批内相对标准偏差,作为精密度试验;取精密度试验的样品溶液于间隔 2 h、2 h、2 h、6 h 和 12 h 测定其含量,每次测定 3 次,取平均值,计算批内相对标准偏差,作为溶液稳定性试验。

1.6.3 方法专属性 取茵栀解毒颗粒样品 3 份,每份各 1 g,置于 25 mL 量瓶中,分别加 1 mol/L 盐酸溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液和 5% 过氧化氢溶液,各 1 mL,摇匀,放置 1 h^[6],进行酸、碱和氧化破坏,加入 50% 甲醇溶液 15 mL,超声 20 min,50% 甲醇溶液定容,依法测定。

1.6.4 加样回收率试验 根据前期试验分析,3 种药物的含量均约为 1 mg/g。因此,加样回收率的添加浓度定为 1 mg/g。在准确测定本底的情况下(测定 6 次,取平均值),开展加样回收率试验。取 3 种对照品加甲醇配制成每毫升各约含 1 mg 的溶液。另取样品 6 份,各 1 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,分别加入相应对照品溶液各 1.00 mL,按照建立的方法检测,结果减去相应本底,计算平均回收率和批内相对标准偏差。

1.6.5 实际样品的测定 取 3 批次供试品,每批次各 3 个平行,取每份样品各 1 g,按照 1.4 项配制供试品溶液,依法检测,计算平均含量。

1.7 提取溶剂的选择 本试验设计时考虑到提取目标药物的性质,选择水、甲醇和 50% 甲醇超声 20 min 以及水、甲醇和 50% 甲醇水浴回流 20 min 等方式提取药物中有效成分,另外参考文献[5]采用热水加甲醇提取 20 min。

2 结果与分析

2.1 系统适用性试验 在 1.5 色谱条件下,对照品溶液和实际样品图谱中绿原酸、栀子苷和黄芩苷峰型对称,对称因子均在 0.95 至 1.05 之间,3 种药物和其边上的峰,两者之间的分离度均大于 1.5,理论板数以 3 种药物计均大于 3000,系统适用性试验各项指标符合要求,典型色谱图和光谱图见图 1 - 图 8。

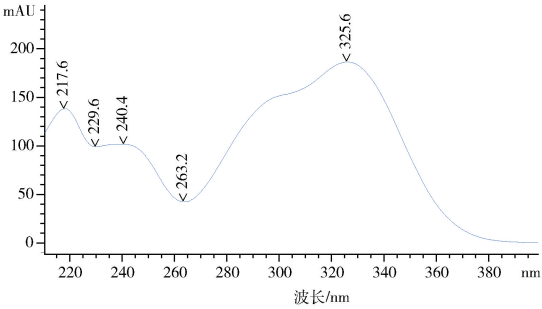


图 2 绿原酸对照品溶液光谱图

Fig 2 Spectrum of chlorogenic acid control solution

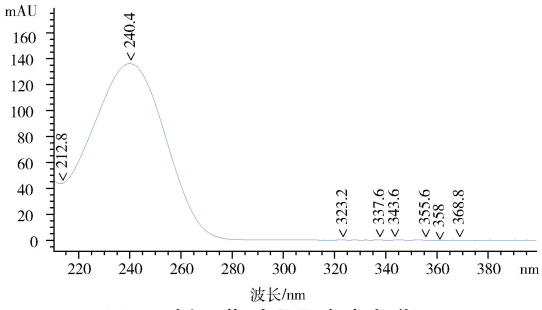
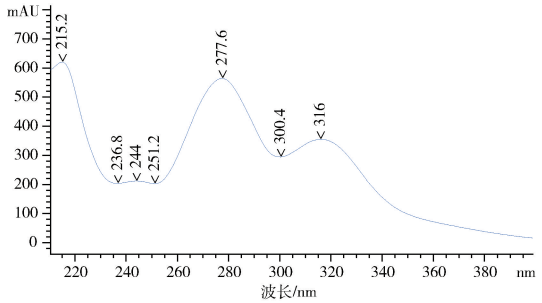


图 3 栀子苷对照品溶液光谱图

Fig 3 Spectrum of Gardenia jasminoides control solution

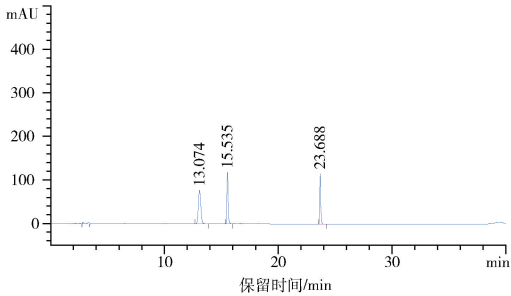


注:出峰顺序为绿原酸、栀子苷和黄芩苷

Note:The order of peaks is chlorogenic acid, gardenia glucoside and baicalin

图 4 黄芩苷对照品溶液光谱图

Fig 4 Spectrum of baicalin control solution



注:出峰顺序为绿原酸、栀子苷和黄芩苷

Note: The order of peaks is chlorogenic acid, gardenia glucoside and baicalin

图 1 绿原酸、栀子苷和黄芩苷对照品溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of chlorogenic acid, gardenia glucoside and baicalin control solution

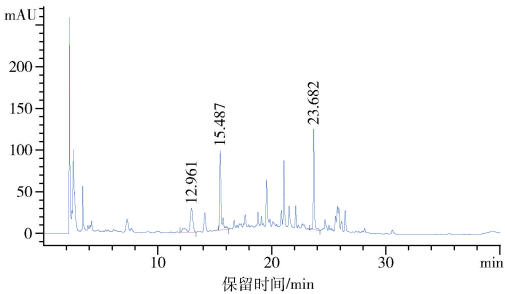


图 5 茵栀解毒颗粒色谱图

Fig 5 Chromatogram of Gardenia jasminoides

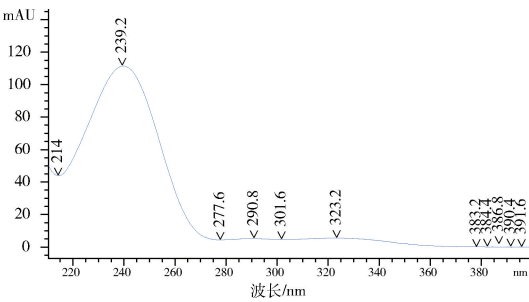


图 6 茵栀解毒颗粒中栀子苷光谱图

Fig 6 Spectrum of gardenia glycosides in gardenia antidote granules

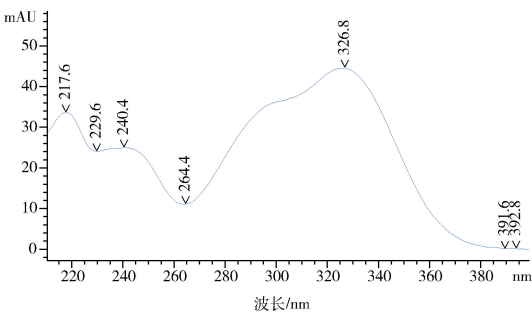


图 8 茵栀解毒颗粒中绿原酸光谱图

Fig 8 Spectrum of chlorogenic acid in Gardenia jasminoides pellets

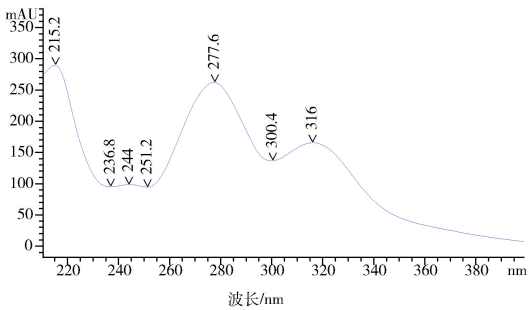


图 7 茵栀解毒颗粒中黄芩苷光谱图

Fig 7 Spectrum of baicalin in Yinjian Jiexing granules

2.2 标准曲线的绘制 根据 1.2、1.3 和 1.6.1 数据以及方法配制标准曲线线性溶液,依法测定,绘

制标准曲线,见图 9。结果栀子苷在 3.110 ~ 155.5 μg/mL 浓度范围内线性良好,线性方程为 $Y=3.7946X-1.4586$,相关系数 $r=0.9999$;黄芩苷在 1.897 ~ 94.86 μg/mL 浓度范围内线性良好,线性方程为 $Y=17.222X+5.4359$,相关系数 $r=0.9999$;绿原酸在 2.478 ~ 123.9 μg/mL 浓度范围内线性良好,线性方程为 $Y=6.255X+1.3125$,相关系数 $r=0.9997$ 。

2.3 精密度试验结果 按 1.6.2 方法测定,结果栀子苷、黄芩苷、绿原酸精密度分别为 0.9%、0.7% 和 0.9%,表明方法精密度良好,结果见表 2。

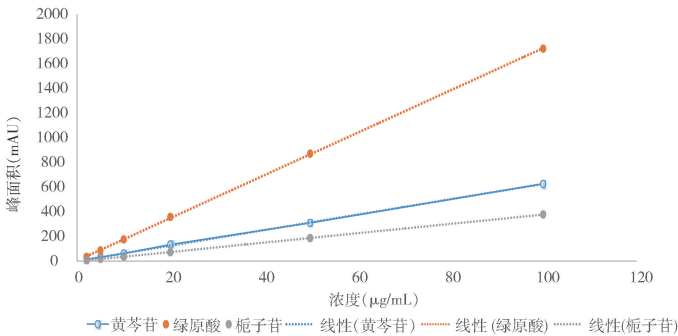


图 9 3 种药物标准曲线图

Fig 9 Standard curve for three drugs

表 2 精密度试验结果 (n=6)

Tab 2 Precision test results (n=6)

药物名称	(1)mg·g ⁻¹	(2)mg·g ⁻¹	(3)mg·g ⁻¹	(4)mg·g ⁻¹	(5)mg·g ⁻¹	(6)mg·g ⁻¹	RSD(%)
栀子苷	1.58	1.60	1.61	1.61	1.59	1.58	0.9
黄芩苷	1.10	1.11	1.11	1.12	1.10	1.10	0.7
绿原酸	0.81	0.82	0.82	0.80	0.81	0.81	0.9

2.4 稳定性试验结果 取精密度试验的样品溶液于间隔 2 h、2 h、2 h、6 h 和 12 h 测定其含量,计算批内相对标准偏差,作为溶液稳定性试验。栀子

苷、黄芩苷和绿原酸溶液峰面积的 *RSD* 分别为 1.2%、1.1% 和 1.4%,表明溶液稳定性良好,结果见表 3。

表 3 稳定性试验结果(*n* = 3)
Tab 3 Stability test results (*n* = 3)

药物名称	(0 h)mg · g ⁻¹	(2 h)mg · g ⁻¹	(4 h)mg · g ⁻¹	(6 h)mg · g ⁻¹	(12 h)mg · g ⁻¹	(24 h)mg · g ⁻¹	<i>RSD</i> (%)
栀子苷	1.58	1.56	1.57	1.59	1.61	1.60	1.2
黄芩苷	1.10	1.11	1.11	1.13	1.12	1.10	1.1
绿原酸	0.79	0.82	0.81	0.81	0.80	0.81	1.4

2.5 专属性结果 按 1.6.3 方法测定,结果显示,在盐酸溶液和过氧化氢溶液中这 3 种药物均能保持稳定,峰面积减少小于 3%;氢氧化钠溶液中,黄芩苷和栀子苷均减少 50% 以上,绿原酸几乎降解 100%。

2.6 加样回收率试验结果 根据设计的试验方法开展加样回收率试验,3 种药物的平均加样回收率均在 95% 以上,6 份样品批内相对标准偏差均在 4% 以内,表明方法可靠性较好,结果见表 4。

表 4 平均加样回收率试验结果(*n* = 6)
Tab 4 Results of mean spiked recovery tests (*n* = 6)

药物名称	平均加样回收率/%	相对标准偏差/%
栀子苷	97.1	4.0
黄芩苷	96.2	3.8
绿原酸	95.3	2.9

2.7 实际样品测定结果 依法测定,结果 3 批次样品栀子苷的含量范围为 1.57 mg/g ~ 1.60 mg/g 之间;黄芩苷的含量范围为 1.11 mg/g ~ 1.16 mg/g 之间;绿原酸的含量范围为 0.81 mg/g ~ 0.82 mg/g 之间。《兽药质量标准(2017 年版)中药卷》规定,茵栀解毒颗粒中绿原酸的含量限量为每 1 g 不得少于 0.35 mg,表明该企业生产的 3 批次样品绿原酸的含量均符合标准。因栀子苷和黄芩苷没有相关限量标准,待收集足够数据以后作为制定标准限量的参考,结果见表 5。

表 5 实际样品含量测定结果(*n* = 3)

Tab 5 Results of actual sample content determination (*n* = 3)

批号	栀子苷/mg · g ⁻¹	黄芩苷/mg · g ⁻¹	绿原酸/mg · g ⁻¹
20210822	1.58	1.11	0.81
20210823	1.60	1.15	0.82
20210824	1.57	1.16	0.82

2.8 提取溶剂选择的结果 根据设计的试验方法,对 7 种提取溶剂进行了考察,结果绿原酸在甲醇中的提取效率较低,黄芩苷在水超声和水回流中的提取效率较低,栀子苷在甲醇超声和水回流的情况下结果含量较低,见图 10, 图中序号 1 ~ 7 分别对应 7 种提取溶剂及相应的提取方式。综合分析,本试验选择 50% 甲醇超声 20 min,作为样品的提取方式。

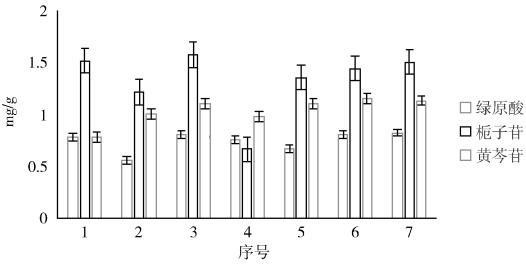


图 10 提取溶剂和提取方式对各组分含量的影响
Fig 10 Effect of extraction solvent and extraction method on the content of each component

2.9 定量限 根据 1.6.1 方法配制稀释 50 倍的溶液,为标准曲线的最低点浓度,依法测定,计算 3 种药物的信噪比。结果该浓度下 3 种药物的信噪比

均大于 10, 满足含量检测分析要求的最小浓度, 把此浓度对应样品中药物的含量, 作为相应药物的定量限。此时, 栀子苷的浓度为 $3.110 \mu\text{g/mL}$, 黄芩苷的浓度为 $1.897 \mu\text{g/mL}$, 绿原酸的浓度为 $2.478 \mu\text{g/mL}$; 根据 1.4 供试品溶液的配制方法, 折算到实际样品中, 3 种药物的定量限, 分别为栀子苷 0.08 mg/g 、黄芩苷 0.05 mg/g 和绿原酸 0.06 mg/g 。

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 本试验在查阅相关文献的基础上, 基本了解药物的性质, 3 种药物的紫外吸收明显, 能够采用液相色谱法对其进行检测。因此, 我们选择在 $210 \text{ nm} \sim 400 \text{ nm}$ 范围内对 3 种药物进行扫描, 以确定 3 种药物的最佳检测波长。图 2 ~ 图 4 结果显示, 栀子苷的最大吸收波长在 240 nm 附近, 黄芩苷的最大吸收波长在 $215 \text{ nm} \sim 277 \text{ nm}$ 范围内, 绿原酸的最大吸收在 $210 \text{ nm} \sim 240 \text{ nm}$ 范围内。综合考虑 3 种药物的含量和吸收值, 选择 3 种药物均有较大吸收值的波长, 使 3 种药物能用同一波长同时检测。因此本试验选择 230 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择 本试验考察了磷酸溶液 (0.01% 、 0.05% 、 0.2% 和 0.4%) 作为流动相的情况, 不同浓度磷酸溶液, 对 3 种药物的保留时间和峰型的影响不大, 而 0.4% 和 0.2% 磷酸溶液浓度较高, pH 值小于 2.0, 对 C_{18} 色谱柱有不利影响。选择 pH 值为 2.3 左右的 0.05% 磷酸溶液和乙腈配比作为流动相。实际样品检测中, 因样品中含有其他药物或者杂质, 易影响药物和其他组分的分离度, 调节梯度洗脱程序, 3 种药物峰型对称、分离度满足要求。

3.3 结论 试验建立了高效液相色谱法测定畜禽用中兽药茵栀解毒颗粒中栀子苷、黄芩苷和绿原酸的方法, 采用 50% 甲醇作为提取溶剂, 超声波清洗器超声 20 min 作为提取方式, 230 nm 作为检测波长, 3 种药物加样回收率均达到 95% 以上, 试验操作简便、快捷, 定性定量准确, 能满足中兽药茵栀解毒颗粒的栀子苷、黄芩苷和绿原酸等 3 种有效成分的同时检测。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2017 年 (中药卷). [M]. 北京: 中国农业出版社. 2017.
Commission of chinese veterinary pharmacopoeia. Veterinary drug quality standards (2017). [M]. Beijing. China Agriculture Press. 2017.
- [2] 兰新财, 赵丽丽, 叶志惠, 等. 茵栀解毒颗粒保护肝损伤药理作用的研究[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(6): 56-63.
Lan X C, Zhao L L, Ye Z H, et al. The Pharmacological Action Study of Yinzhi Jiedu Granules to Protect Liver Injury [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(6): 56-63.
- [3] 叶志惠, 兰新财, 赵丽丽, 等. 茵栀解毒颗粒对母猪肝功能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(2): 53-54.
Ye Z H, Lan X C, Zhao L L, et al. Effects of Yinzhi Jiedu granules on liver function in sow [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2017, 36(2): 53-54.
- [4] 刘浩, 刘小静, 刘畅. 茵栀解毒颗粒防治母猪肝损伤作用效果研究[J]. 北方牧业, 2021(21): 28.
Liu H, Liu X J, Liu C. Study on the effect of Gardenia jasminoides pellets on the control of liver injury in sows [J]. Northern Journal of Animal Husbandry, 2021(21): 28.
- [5] 刘发全, 吴昊, 张莉, 等. HPLC 法同时测定茵栀解毒颗粒中绿原酸、栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(3): 70-71.
Liu F Q, Wu H, Zhang L, et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid, gardenia glucoside and baicalin in gardenia antidote granules by HPLC [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts, 2018, 34(3): 70-71.
- [6] 林仙军, 张航俊, 罗成江, 等. 高效液相色谱法测定卡巴匹林钙可溶性粉中卡巴匹林钙和游离水杨酸的含量[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(7): 28-33.
Lin X J, Zhang H J, Luo C J, et al. Determination of Carbasalate Calcium and Free Salicylic Acid in Carbasalate Calcium Soluble Powder by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(7): 28-33.
- [7] 余功富. 高效液相色谱法测定黄连解毒散中栀子苷和黄芩苷[J]. 浙江畜牧兽医, 2020, 45(5): 4-6+3.
Yu G F. Determination of gardenia glucoside and baicalin in Huang Lian Jie Po San by high performance liquid chromatography [J]. Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine, 2020, 45(5): 4-6+3.
- [8] 郑举, 刘红云, 陈静, 等. 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[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(21): 198-201.

- Zheng J, Liu H Y, Chen J, *et al.* Simultaneous Determination of 3 Constituents in Yinzhi Jiedu Granules by Gradient Elution HPLC Method with Switching Wavelength [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(21): 198 – 201.
- [9] 赵雪宁, 雷浩, 贺习文, 等. 高效液相色谱法同时测定牛奶中阿苯达唑、氟苯达唑、噻苯达唑及 4 种代谢物残留量[J]. 中国奶牛, 2022(7): 49 – 52.
- Zhao X N, Lei H, He X W, *et al.* Simultaneous Determination of Albendazole, Flubendazole, Thiabendazole and Four Metabolites in Milk by High Performance Liquid Chromatography [J]. China Dairy Cattle, 2022(7): 49 – 52.
- [10] 骆海春, 陈高健, 朱飞如, 等. 高效液相色谱技术在药品检验中的应用研究[J]. 中国药物经济学, 2022, 17(2): 125 – 128.
- Luo H C, Chen G J, Zhu F R, *et al.* Research Status of Application of High Performance Liquid Chromatography in Drug Inspection [J]. China Journal of Pharmaceutical Economics, 2022, 17(2): 125 – 128.
- [11] 刘秀清. 高效液相色谱法测量药物中阿莫西林含量的分析[J]. 黑龙江医药, 2021, 34(5): 1040 – 1042.
- Liu X Q. Determination of Amoxicillin in Medicines by HPLC [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2021, 34(5): 1040 – 1042.
- [12] 于艳丽. 高效液相色谱 – 二极管阵列检测器测定兽药、保健食品中茶碱、二羟丙茶碱和盐酸二氧丙嗪[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(7): 2679 – 2685.
- Yu Y L. Determination of theophylline, diprophylline and dioxopromethazine in veterinary drugs and health food by high performance liquid chromatography – photodiode array detector [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(7): 2679 – 2685.

(编辑: 陈希)