



HPLC同时测定小儿金宁口服液中绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷和蒙花苷

汪晶¹, 张新庄¹, 吴晓燕¹, 赵晓莉¹, 狄留庆^{1*}, 郭青², 汪受传¹

(1. 南京中医药大学, 江苏南京 210029; 2. 江苏省药品检验所, 江苏南京 210029)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定小儿金宁口服液中绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷、蒙花苷 6 个成分的方法。方法:Lichrospher C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(10:90~18:82~27:73),流速(0.8~1.1~0.8) mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长 300 nm。结果:6 种成分均能达到基线分离,各成分都有较宽的线性范围和良好的线性关系,加样回收率在 95%~105%。结论:本法快速、准确、可靠、重复性好,可为小儿金宁口服液的质量控制提供参考依据。

[关键词] 绿原酸;隐绿原酸;咖啡酸;柚皮苷;橙皮苷;蒙花苷

小儿金宁口服液系汪受传教授在《温病条辨》经典名方银翘散^[1]基础上形成的有效验方,由金银花^[2]、荆芥^[3]、薄荷^[4]、野菊花^[5]、桔梗等 8 味中药组成,根据儿科用药的特殊性研制而成的口服液,具有清热解毒、抗病毒、抗炎等功效,临床用于小儿感冒中多见证型风热感冒的治疗。据文献报道^[6-8],复方中的有机酚酸类、黄酮苷类成分可能是该制剂中主要活性成分的来源,主要含有绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷、蒙花苷等,其中含量较高的隐绿原酸^[9],关于其含量测定和活性研究较少。本实验建立了用 HPLC 单波长梯度洗脱法 1 次进样同时测定小儿金宁口服液中 6 个成分的含量测定方法,所测 6 个成分的色谱峰与相邻色谱峰均能得到良好的分离,对小儿金宁制剂的质量控制具有重要的意义。

1 材料与方

1.1 仪器 Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BP211D 型电子分析天平(德国 Satorius 公司);AS20500 型超声波清洗器(天津奥特塞恩斯有限公司);TU-1800S 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 药品及试剂 乙腈(美国 Tedia 公司,色谱纯);重蒸去离子水(实验室制备);乙醇(上海化学试剂有限公司,分析纯);磷酸(上海化学试剂有限公司,分析纯);甲醇(上海化学试剂有限公司,分析纯);绿原酸(批号 110753-200212)、咖啡酸(批号 110885-200203)、柚皮苷(批号 110722-200309)、橙皮苷(批号 110721-200507)、蒙花苷(批号 111528-200504)对照品均由中国药品生物制品检定所提供。隐绿原酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,纯度>98%,批号 070918)。小儿金宁口服液由本院自制(每毫升折合生药 0.637 5 g)。

1.3 混合对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的绿原酸 5.63 mg、隐绿原酸 3.17 mg、咖啡酸 1.62 mg、柚皮苷 3.75 mg、橙皮苷 1.67 mg、蒙花苷 2.02 mg,用 50% 甲醇溶解制成绿原酸 375.3 mg·L⁻¹、隐绿原酸 211.3 mg·L⁻¹、咖啡酸 108.0 mg·L⁻¹、柚皮苷 250.0 mg·L⁻¹、橙皮苷 111.3 mg·L⁻¹、蒙花苷 134.7 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液,备用。

1.4 供试品溶液的制备 精密吸取小儿金宁口服液 2.5 mL,置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,备用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱 Lichrospher C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.4%磷酸(B)梯度洗脱见表 1,流速(0.8~1.1~0.8) mL·min⁻¹,检测波长 300 nm,柱温 30℃。

[稿件编号] 20100308005

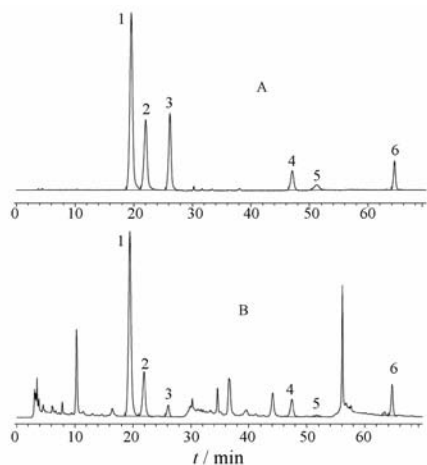
[基金项目] 江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划;中医儿科重点学科项目(EZK2009019)

[通信作者] *狄留庆,教授,博士研究生导师,主要从事中药剂型理论与应用研究,Tel:(025)85811071,E-mail:diliuqing928@163.com

表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%	流速/mL · min ⁻¹
0 ~ 24	10	90	0.8
26 ~ 52	18	82	1.1
54 ~ 68	27	73	0.8

结果表明,绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷、蒙花苷都能达到基线分离,6 个成分与相邻色谱峰的分度均大于 1.5,保留时间在 68 min 内,峰形较好。对照品与供试品的 HPLC 图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸; 2. 隐绿原酸; 3. 咖啡酸;
4. 柚皮苷; 5. 橙皮苷; 6. 蒙花苷。

图 1 对照品与供试品 HPLC 图

2.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.4, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇定容至刻度, 制成不同浓度的对照品溶液。分别精密吸取 20 μL, 进样测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度 (mg · L⁻¹) 为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 回归方程见表 2。

表 2 各成分的回归方程和相关系数 (n=6)

成分	回归方程	r	线性范围/mg · L ⁻¹
绿原酸	Y = 54.389X + 675.83	0.999 0	30.0 ~ 375.3
隐绿原酸	Y = 45.705X + 177.78	0.999 1	16.9 ~ 211.3
咖啡酸	Y = 82.532X + 38.758	0.999 8	8.6 ~ 108.0
柚皮苷	Y = 11.128X + 28.977	0.999 9	20.0 ~ 250.0
橙皮苷	Y = 11.701X + 25.264	0.999 5	8.9 ~ 111.3
蒙花苷	Y = 21.759X - 40.38	0.999 0	10.8 ~ 134.7

2.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20

μL, 连续进样 6 次, 在上述色谱条件下测定, 记录峰面积, 计算绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷、蒙花苷峰面积的 RSD (n = 6) 分别为 1.1%, 0.84%, 1.7%, 1.2%, 2.7%, 2.3%, 表明精密度良好。

2.4 稳定性试验 取供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 在上述色谱条件下进样测定, 结果绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷、蒙花苷峰面积的 RSD (n = 6) 分别为 0.80%, 1.0%, 1.3%, 1.1%, 2.8%, 1.9%, 表明供试品溶液中 6 种成分在室温条件下 24 h 内测定结果稳定。

2.5 重复性试验 取同一批号 (081221) 样品适量, 供 6 份, 按照 1.4 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下分别进样 20 μL 测定。结果供试品中绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柚皮苷、橙皮苷、蒙花苷的平均质量浓度分别为 313.0, 99.2, 11.7, 167.2, 18.5, 108.7 mg · L⁻¹; RSD 分别为 0.69%, 0.90%, 1.0%, 1.0%, 3.0%, 2.2%, 重复性良好。

2.6 加样回收率试验 精密吸取同一批号已知含量的供试品溶液 2 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加入含绿原酸 250.0 mg · L⁻¹、隐绿原酸 80.0 mg · L⁻¹、咖啡酸 8.8 mg · L⁻¹、柚皮苷 133.7 mg · L⁻¹、橙皮苷 14.8 mg · L⁻¹、蒙花苷 87.0 mg · L⁻¹ 的混合对照品 2.5 mL, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 精密吸取 20 μL 进样, 在上述色谱条件下测定, 计算回收率, 见表 3。

2.7 样品的测定 取 3 批小儿金宁口服液, 按照 1.4 项下操作制备供试品液, 每批平行 3 份, 精密吸取供试液 20 μL, 进样, 每份进样 2 次, 计算每批样品中各成分的质量浓度, 见表 4。

3 小结与讨论

本实验首次研究建立了 HPLC 一次进样同时测定小儿金宁口服液中 6 种活性成分的方法, 方法简便, 结果可靠, 可作为小儿金宁口服液多指标含量测定方法。

对小儿金宁口服液中隐绿原酸的含量较高, 但其测定方法迄今未能研究建立, 本研究实现了对隐绿原酸及其他 5 个成分的分离。

应用同一测定方法检测多个活性成分时, 分析方法研究过程中检测波长的选择以及流动相的设定非常关键。本实验分别对 6 个成分进行紫外扫描图谱分析, 确定了各成分的最大吸收波长分别为绿原酸、隐绿原酸和咖啡酸为 (326 ± 2) nm, 柚皮苷和橙



表3 小儿金宁口服液液中6种成分加样回收率

测定成分	样品量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	626.2	625.0	1 245.7	99.12	101.02	1.65
	628.3		1 260.8	101.19		
	625.9		1 267.6	102.68		
	623.1		1 252.2	100.65		
	623.9		1 244.8	99.34		
	629.0		1 273.6	103.14		
隐绿原酸	197.9	200.0	395.8	98.96	99.46	1.86
	198.0		395.5	98.73		
	197.7		399.6	100.93		
	198.1		399.7	100.82		
	196.9		398.9	101.01		
	199.7		392.3	96.31		
咖啡酸	22.2	22.0	44.6	102.01	101.98	1.17
	21.5		43.7	101.02		
	22.5		45.3	103.68		
	22.3		44.7	101.97		
	22.1		44.7	102.83		
	22.3		44.4	100.36		
柚皮苷	333.2	334.3	665.8	99.50	102.33	1.73
	334.1		671.6	100.97		
	335.0		678.7	102.81		
	334.5		678.2	102.82		
	334.9		681.8	103.78		
	333.8		681.8	104.12		
橙皮苷	36.2	37.0	72.7	98.62	100.51	2.53
	37.5		75.7	103.30		
	35.9		72.3	98.44		
	37.4		76.0	104.18		
	38.2		74.9	99.15		
	36.9		73.7	99.38		
蒙花苷	216.8	217.5	430.0	98.02	100.07	1.80
	215.0		429.9	98.85		
	218.2		442.9	103.29		
	218.7		437.0	100.36		
	216.9		434.7	100.16		
	219.4		436.4	99.75		

表4 小儿金宁口服液液中有效成分的测定($n=3$)

批号	绿原酸		隐绿原酸		咖啡酸		柚皮苷		橙皮苷		蒙花苷	
	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%
081120	1 253.2	1.72	397.8	1.16	47.1	1.58	665.6	1.60	72.0	2.33	435.2	2.14
081127	1 254.3	1.68	398.6	1.37	44.3	1.76	667.8	1.21	70.5	2.76	431.6	1.78
081204	1 252.5	1.28	396.4	1.83	46.8	1.90	667.9	0.96	73.0	2.64	432.8	1.80

皮苷为 283 nm, 蒙花苷 334 nm。通过分别在 283, 330 nm 进行测定, 发现均有响应值较低的色谱峰, 经过多次试验, 发现在 300 nm 检测波长下, 6 个成

分的灵敏度较高, 峰形较好。在文献[9]研究基础上, 选用乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.5% 磷酸水等不同溶剂系统进行试验, 经等度或梯



度试验比较,最终确定了本实验中的梯度洗脱程序,所检测的6个成分色谱峰既能达到基线分离,又缩短了分析时间。

[参考文献]

[1] 周江.《温病条辨》银翘散及类方辨析[J]. 中国中医急症, 2008,17(1):87.
[2] 陈辉. HPLC 测定复方感冒颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(5):583.
[3] 欧阳荣,张志国,王芳. HPLC 测定荆芥中橙皮苷的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(6):524.
[4] 张援虎,刘颖,胡俊,等. 薄荷中黄酮类成分的研究[J]. 中草药,2006,37(4):512.

[5] 崔兰冲,李小芳,韩莹,等. HPLC 测定野菊花中蒙花苷与木犀草素的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(1):33.
[6] 石钺,石任兵,刘斌,等. 银翘散抗病毒有效部位群中黄酮类成分研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(5):320.
[7] 石钺,石任兵,刘斌,等. 银翘散抗病毒有效部位群化学成分的分离与鉴定[J]. 中国中药杂志,2003,28(1):43.
[8] 樊宏伟,肖大伟,余黎. 金银花及其有机酚酸类化合物的体外抗血小板聚集作用[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(2):145.
[9] 张蕙,李祥,周红燕,等. 反相高效液相色谱法同时测定脉络宁注射液中6种酚酸类成分的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(2):54.

Simultaneous determination of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, naringin, hesperidin and linarin in Xiao'erjinning oral liquid by an HPLC method

WANG Jing¹, ZHANG Xinzhuang¹, WU Xiaoyan¹, ZHAO Xiaoli¹, DI Liuqing^{1*}, GUO Qing², WANG Shouchuan¹

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, naringin, hesperidin and linarin in Xiao'erjinning oral liquid. **Method:** The chromatographic separation was achieved on a Lichrospher C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a mobile phase which was composed of acetonitrile (A) and 0.4% phosphoric acid (B) for gradient elution (10:90-18:82-27:73). The flow rate was (0.8-1.1-0.8) mL · min⁻¹, the column temperature was 30 °C and the detection wavelength was set at 300 nm. **Result:** The results showed that 6 effective components were separated well and showed good linearity. The average recoveries were between 95%-105%. **Conclusion:** The method is proved to be rapid, accurate, credible and repeatable. It can be used for the quality control of Xiao'erjinning oral liquid.

[Key words] chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; naringin; hesperidin; linarin

doi: 10.4268/cjcmm20101311

[责任编辑 周驰]