

HPLC 法测定病毒合剂中黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A

佟若菲, 张 囡, 林 宏*

天津市儿童医院, 天津 300074

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定病毒合剂中黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 的方法。方法 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.5%磷酸水溶液-乙腈, 采用梯度洗脱, 检测波长为 300 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL。结果 黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 分别在 9.84~82 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、2.64~22.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 和 4.32~36.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 线性关系良好, 平均回收率分别为 99.94%、101.1%、99.77%, RSD 值分别为 1.44%、1.68%、1.44% ($n=6$)。结论 本法操作简便、结果准确、重复性好, 可用于病毒合剂的质量控制。

关键词: 病毒合剂; 黄芩苷; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)03-0259-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.03.010

Determination of baicalin, chlorogenic acid, and forsythoside A in Bingdu Mixture by HPLC

TONG Ruo-fei, ZHANG Nan, LIN Hong

Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of baicalin, chlorogenic acid, and forsythoside A in Bingdu Mixture. **Methods** HPLC was carried out on a Shim pack VP-ODS column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 0.5% phosphoric acid-acetonitrile as mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 300 nm. The injection volume was 10 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. **Results** The liner ranges of baicalin, chlorogenic acid, and forsythoside A were 9.84 — 82 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), 2.64 — 22.0 μg/mL ($r = 0.999\ 9$) and 4.32 — 36.0 μg/mL ($r = 0.999\ 9$); The average recoveries were 99.94%, 101.1%, and 99.77%, with RSD values of 1.44%, 1.68%, and 1.44% ($n = 6$), respectively. **Conclusion** The established method is simple, accurate, and reproducible and could be used for the quality control of Bingdu Mixture.

Key words: Bingdu Mixture; baicalin; chlorogenic acid; forsythoside A; HPLC

病毒合剂为常用医院制剂, 由黄芩、金银花、连翘、前胡等 14 味中药制成, 具有清热解表、止咳定喘的功效, 主要用于治疗感冒发烧, 有汗或无汗鼻流清涕及病毒性肺炎。原质量标准^[1]含量测定项中仅有黄芩苷的测定。为提高其标准, 有效控制产品质量, 本实验采用高效液相色谱法 (HPLC) 同时测定本品中黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A, 以此作为该制剂的质量控制指标。

1 仪器与材料

LC—2010A 高效液相色谱仪 (日本岛津); LC Solution 色谱工作站; XS—205 电子天平 (瑞士梅

特勒托利多公司)。黄芩苷 (批号 110715-201016)、绿原酸 (批号 110753-200413)、连翘酯苷 A (批号 110810-201103) 对照品均由中国食品药品检定研究院提供, 病毒合剂 (批号分别为 20130701、20130702、20130801、20130802, 规格 100 mL×2, 天津市儿童医院)。甲醇、乙腈、磷酸 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 水为去离子水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.5%磷酸水溶液 (A) - 乙

收稿日期: 2013-10-08

作者简介: 佟若菲 (1977—), 女, 本科, 研究方向为临床药学。Tel: 13512413802 E-mail: coco_trf@sina.com

*通信作者 林 宏, 女, 主任药师。Tel: (022)58917111 E-mail: roylinvip@126.com

腈(B), 梯度洗脱, 0~8 min, 10%~21%B; 8.0~15.0 min, 21%~25%B; 15.0~23.0 min, 25%~40%B, 23.0~25.0 min, 40%~10%B; 检测波长: 300 nm; 柱温: 40 ℃; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷、绿原酸、连翘酯苷 A 对照品 4.1、1.1、1.8 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 制成含黄芩苷 0.082 mg/mL、绿原酸 0.022 mg/mL、连翘酯苷 A 0.036 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取病毒合剂 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方配比, 制备不含黄芩、金银花和连翘的病毒合剂阴性样品, 按“2.2.2”项下制备方法, 制得阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 按照上述色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。理论板数按黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 峰计算均应不低于 2 500。

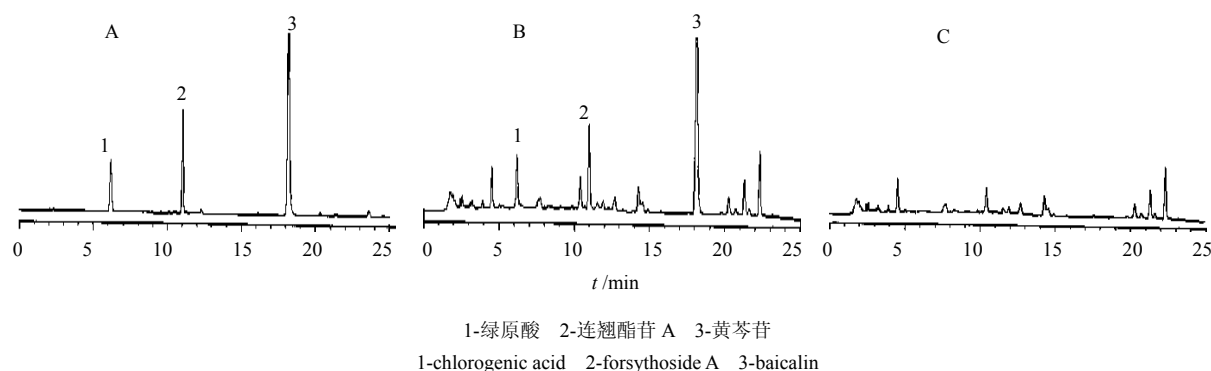


图 1 混合对照品(A)、病毒合剂(B)和阴性对照(C)的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A), Bingdu Mixture (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液 3.0、6.0、9.0、12.0、20.0、25.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按照上述色谱条件进样。以峰面积为纵坐标, 进样质量浓度为横坐标绘制标准曲线。黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 的回归方程分别为: $Y=20\,850.6X-2\,140.5$ ($r=0.999\,8$)、 $Y=21\,421.8X+343.7$ ($r=0.999\,9$) 和 $Y=14\,996.8X-216.6$ ($r=0.999\,9$)。结果表明, 黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 分别在 9.84~82.0、2.64~22、4.32~36.0 μ g/mL 与峰面积呈现良好线性关系。

2.5 精密度试验

取含黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 分别为 0.041、0.011、0.018 mg/mL 混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算得黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 值分别为 0.75%、0.35%、0.44%。

2.6 稳定性试验

取批号 20130701 样品 1 份, 制备供试品溶液, 分别放置 0、2、4、6、8、12、24 h 后, 按上述色

谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算得黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 值分别为 0.89%、0.74%、1.21%, 表明样品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

称取批号 20130701 样品平行 6 份, 分别制备供试品溶液, 进样测定。测得样品中黄芩苷、绿原酸、连翘酯苷 A 平均质量浓度分别为 2.487 0、0.450 2、0.981 3 mg/mL, RSD 值分别为 1.07%、0.95%、1.22%。

2.8 回收率试验

分别精密量取质量浓度为 0.165 8、0.032 0、0.065 6 mg/mL 黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 50% 甲醇溶液 15 mL, 每种 6 份, 分别置 50 mL 圆底烧瓶中, 减压蒸干。分别精密加入批号 20130701 样品 1 mL, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件分析测定, 计算回收率, 结果黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 的平均回收率分别为 99.94%、101.1%、99.77%, RSD 值分别为 1.44%、1.68%、1.44%。

2.9 样品测定

取病毒合剂样品 3 批 (批号分别为 20130702、

20130801、20130802), 每批各 2 份, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样, 用外标法计算样品中黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 的质量分数, 结果见表 1。根据测定结果暂定本品含黄芩以黄芩苷计不得少于 2.0 mg/mL; 含金银花以绿原酸计不得少于 0.4 mg/mL; 含连翘以连翘酯苷 A 计不得少于 0.9 mg/mL。

表 1 病毒合剂中黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 的测定结果 (n=2)

Table 1 Determination of baicalin, chlorogenic acid, and forsythoside A in Bingdu Mixture (n=2)			
批号	黄芩苷/ (mg·mL ⁻¹)	绿原酸/ (mg·mL ⁻¹)	连翘酯苷 A/ (mg·mL ⁻¹)
20130702	2.477	0.4545	0.987 6
20130801	2.426	0.4403	0.980 3
20130802	2.405	0.4588	0.993 6

3 讨论

黄芩苷为方中黄芩中主要成分, 具有抗菌抗炎、清热解毒的作用^[2-3]; 绿原酸为方中金银花有效成分之一, 具有抗氧化、抗炎、抗菌等作用^[4]; 连翘酯苷 A 为方中连翘的有效成分之一, 具有很强的抗菌活性, 对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、白色念珠菌有明显的抑制作用, 且体外抑病毒作用较强, 尤其对呼吸道最常见病毒合胞病毒具有明显的体外抑

制作用, 同时对活性氧具有较强的清除能力, 是一种有效的天然抗氧化剂^[5]。因此选择对黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 进行测定, 可以有效控制黄芩、金银花和连翘的质量, 进而控制病毒合剂的质量。

黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A 在药典测定方法中检测波长分别为 280、328、330 nm^[6], 综合考虑这 3 种成分的波长及色谱峰的峰形、分离度等, 最终选定 300 nm 作为检测波长。

本实验考虑到成品制剂工艺中无醇沉步骤, 不宜使用稀醇溶液进行稀释, 故确定用水直接稀释后测定黄芩苷、绿原酸和连翘酯苷 A。该方法经济、环保, 而且满足定量分析准确度的要求。

参考文献

- [1] 天津市食品药品监督管理局. 天津市医疗机构制剂规范 [S]. 2008 年版. 2008: 31.
- [2] 李玉萍, 熊向源, 刘建涛, 等. 黄芩活性成分的制备工艺和检测方法研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 12(4): 972-974.
- [3] Tian S, Du L D, Wang S B, *et al.* Pharmacokinetic study of baicalein and its major metabolites after *iv* administration in dogs [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 196-201.
- [4] 张鞍灵, 马 琼, 高锦明. 绿原酸及其类似物与生物活性 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-176.
- [5] 于 和, 陈双璐. HPLC 法测定苍耳丸中连翘酯苷 A 和绿原酸 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 341-343
- [6] 中国药典 [S]. 二部. 2010: 282, 205, 159.