

HPLC 法同时测定双黄连制剂中绿原酸、连翘苷、黄芩苷

方海红¹, 赵柳入¹, 吴杰连¹, 饶毅², 魏惠珍²

1. 江西科技师范学院药学院, 江西 南昌 330013

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 建立同时测定双黄连制剂中绿原酸、连翘苷和黄芩苷的 HPLC 方法。方法 色谱柱为 Agilent ZORBAX XDB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液, 线性梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 324、280 nm, 柱温 30 ℃。结果 绿原酸、连翘苷、黄芩苷的线性范围分别为 0.093~1.860、0.022~0.440、0.328~6.560 μg, 平均加样回收率分别为 98.8%、98.4%、99.3%。结论 该方法简便、快速、准确, 可作为双黄连制剂的质量控制方法。

关键词: 双黄连制剂; 双波长高效液相色谱法; 绿原酸; 连翘苷; 黄芩苷

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)02-0113-04

Simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythin, and baicalin in Shuanghuanglian preparations by dual-wavelength HPLC

FANG Hai-hong¹, ZHAO Liu-ru¹, WU Jie-lian¹, RAO Yi², WEI Hui-zhen²

1. College of Pharmaceutical Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneously determining chlorogenic acid, forsythin, and baicalin in Shuanghuanglian preparations. **Methods** HPLC assay was carried out using an Agilent ZORBAX XDB C₁₈ column with column temperature at 30℃; The mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid solution as gradient elution with flowing rate of 1.0 mL/min; And the detection wavelengths were 324 and 280 nm. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, forsythin, and baicalin were 0.093—1.860, 0.022—0.440, and 0.328—6.560 μg respectively, and the average recoveries of three components were 98.8%, 98.4%, and 99.3% respectively. **Conclusion** The method is simple, quick, and accurate, and may be used for the quality control of Shuanghuanglian preparations.

Key words: Shuanghuanglian preparation; dual-wavelength HPLC; chlorogenic acid; forsythin; aicalin

双黄连制剂由金银花、黄芩及连翘三味中药提取精制而成, 具有清热解毒, 疏风解表的功效, 常用的剂型有口服液、胶囊、颗粒剂和注射液。用于外感风热所致的感冒、上呼吸道感染、轻型肺炎、扁桃体炎等^[1]。《中国药典》2010 年版中规定: 双黄连口服液、片剂和粉针的质量要求对黄芩苷、连翘苷和绿原酸的量进行控制; 颗粒剂和栓剂的质量要求对黄芩苷和连翘苷的量进行控制。药典中对 3 种成分都采用在不同流动相系统下进行测定的方法, 这在很大程度上给分析带来麻烦, 而目前文献报道的有关双黄连制剂中指标成分定量测定方法主要是同时测定绿原酸和黄芩苷的量或测定某一种

成分的量, 或相对较复杂的流动相体系测定 3 种成分^[2-7]。本实验采用双波长、线性梯度洗脱高效液相色谱法, 同时测定双黄连口服液、注射液、颗粒剂和胶囊剂中绿原酸、连翘苷和黄芩苷的量, 方法简便、快速、准确, 可用于双黄连制剂的质量控制。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, HP1100 型二极管阵列检测器, Agilent Chem-Station 色谱工作站 (美国 Agilent 公司), XS205 电子天平 (梅特勒-托利多公司)。

绿原酸 (批号 110753-200413)、连翘苷 (批号 110821-200711)、黄芩苷 (批号 110715-201016) 对

收稿日期: 2011-12-15

基金项目: 江西科技师范学院重点科研项目 (KY2009ZZ04)

作者简介: 方海红 (1979—), 女, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制研究。Tel: (0791)83802393 E-mail: fanghh2006@126.com

照品均购于中国食品药品检定研究院。双黄连口服液(哈药集团三精制药股份有限公司,批号 10092952、11072017,规格 10 mL/支;黑龙江瑞格制药有限公司,批号 091203、101004、110107,规格 10 mL/支),双黄连注射液(哈尔滨珍宝制药有限公司,批号 20091123,规格 20 mL/支),双黄连颗粒(哈尔滨儿童制药厂有限公司,批号 110907、111001、111003,规格 5 g/袋),双黄连胶囊(北京京海药业有限责任公司,批号 101110、110108、110507,规格 0.4 g/粒);甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱为 Agilent Zorbax XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B),线性梯度洗脱,0~35 min,10%~65% A;检测波长 0~16 min,324 nm,16~35 min,280 nm;柱温 30 ℃,体积流量 1.0 mL/min,进样量为 10 μL。在上述色谱条件下,3种待测组分与邻近组分达到了基线分离,各对照品的理论塔板数均大于 3 000。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、连翘苷和黄芩苷对照品适量,加 50%甲醇溶解,制成质量浓度为 0.093、0.022、0.328 mg/mL 的混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密吸取双黄连口服液 2 mL 置于 50 mL 量瓶,加 50%甲醇适量,超声处理 5 min,放置至室温,加 50%甲醇稀释至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得口服液供试溶液。精密吸取双黄连注射液 2 mL 置于 50 mL 量瓶中,加 50%甲醇适量,超声处理 5 min,放置至室温,加 50%甲醇稀释至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得注射液供试溶液。取装量差异项下的双黄连颗粒 5 g,研细,取约 0.5 g 置于 50 mL 量瓶,加入适量 50%甲醇,超声提取 30 min,放置至室温,加 50%甲醇稀释至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得颗粒剂供试溶液。取装量差异项下的双黄连胶囊 10 粒,研细,取约 0.5 g 置于 50 mL 量瓶中,加入适量 50%甲醇,超声提取 30 min,放置至室温,加 50%甲醇稀释至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得胶囊剂供试溶液。

2.4 阴性对照液的制备

按处方比例及工艺,分别制成不含金银花、连

翘和黄芩的阴性样品,按“2.3”项下口服液溶液制备方法制成阴性对照溶液,依“2.1”项下方法测定。结果阴性对照在与对照品色谱峰相应保留时间处无干扰,表明供试品溶液中的其他成分对测定结果无影响,结果见图 1。

2.5 线性关系考察

精密吸取绿原酸、连翘苷和黄芩苷混合对照品溶液 1、5、10、15、20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行分析,记录色谱图。以峰面积为纵坐标,各组分的质量为横坐标,进行线性回归,得回归方程:绿原酸 $Y=3\ 042.5 X-7.263\ 3$; $r=0.999\ 9$;连翘苷 $Y=583.76 X+1.204\ 2$, $r=0.999\ 9$;黄芩苷 $Y=3\ 256.2 X+175.3$, $r=0.999\ 8$;结果表明绿原酸、连翘苷和黄芩苷分别在 0.093~1.860、0.022~0.440、0.328~6.560 μg 线性关系良好。

2.6 精密度试验

精密吸取绿原酸、连翘苷和黄芩苷混合对照品溶液注入液相色谱仪,连续进样 5 次,绿原酸、连翘苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.12%、0.72%、1.86%。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 11072017),分别在 0、2、4、8、10、24 h 进样测定,结果样品中绿原酸、连翘苷和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.74%、1.81%、1.04%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取批号为 11072017 的双黄连口服液,按“2.3”项下方法平行制备 5 份供试品溶液,进样测定,结果绿原酸、连翘苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.48%、1.34%、1.53%。

2.9 加样回收试验

取批号为 11072017 双黄连口服液 9 份,每份 1 mL,分别按相当于样品中各组分的 80%、100%、120%加入各对照品(各加入量各 3 份),按“2.3”项下口服液供试溶液制备方法制备,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果绿原酸、连翘苷、黄芩苷的加样回收率分别为 98.8%、98.4%、99.3%。

2.10 样品测定

分别取不同厂家、不同剂型的双黄连制剂,按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,结果见表 1。

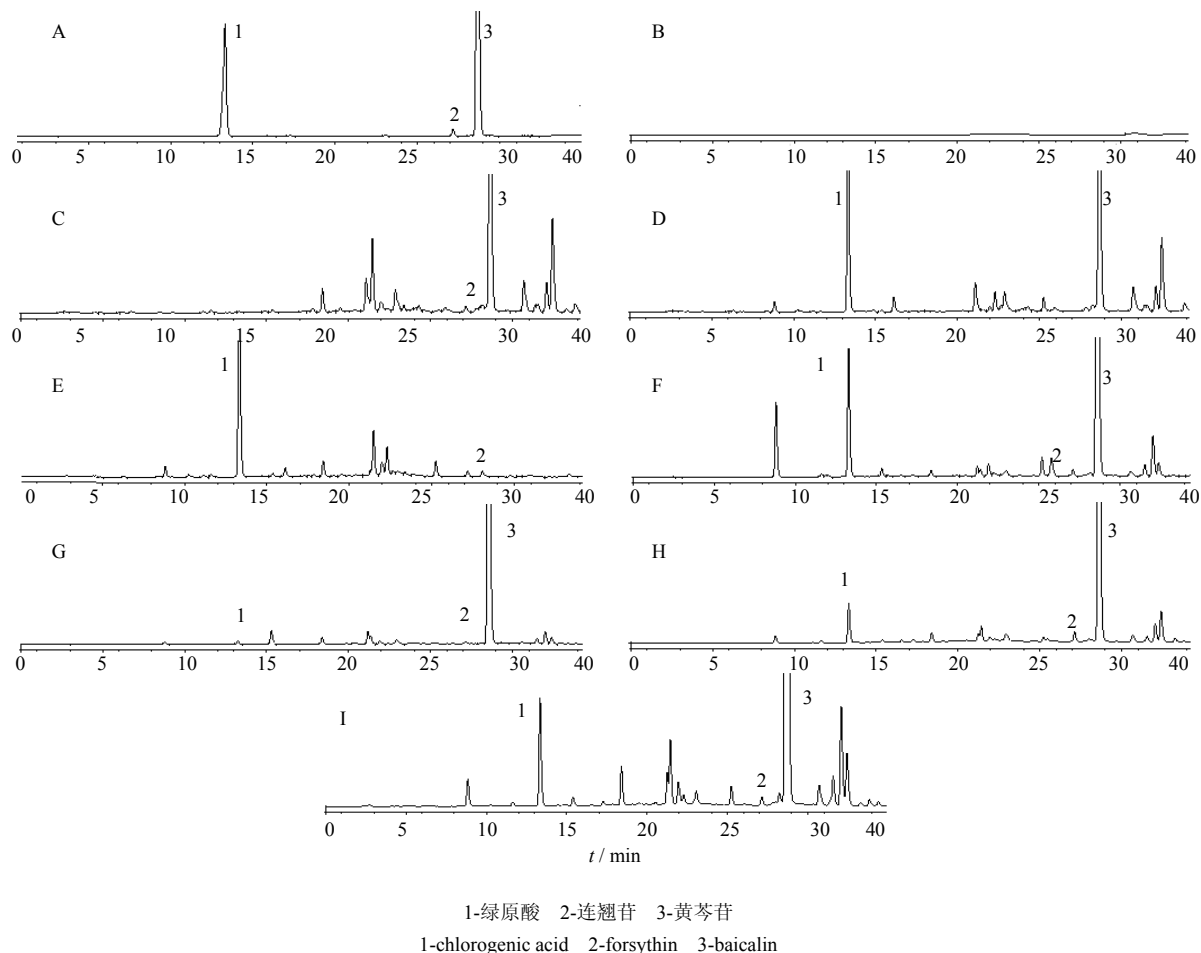


图1 混合对照品(A)、甲醇空白(B)、缺金银花(C)、缺连翘(D)、缺黄芩(E)阴性样品、双黄连口服液(F)、注射液(G)、颗粒剂(H)、胶囊剂(I)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), negative control sample (B), samples without *Lonicerae japonicae* fols (C), without *Forsythiae fructus* (D), without *Scutellariae radix* (E), and oral liquid (F), injection (G), granules (H), and capsula (I) of Shuanghuanglian

表1 双黄连制剂中绿原酸、连翘苷、黄芩苷测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of chlorogenic acid, forsythoside and baicalin in Shuanghuanglian preparations (n = 3)

剂型	批号	绿原酸/ (mg·支 ⁻¹)	连翘苷/ (mg·支 ⁻¹)	黄芩苷/ (mg·支 ⁻¹)	剂型	批号	绿原酸/ (mg·袋 ⁻¹)	连翘苷/ (mg·袋 ⁻¹)	黄芩苷/ (mg·袋 ⁻¹)
口服液	11072017 (三精)	17.64	4.23	116.71	颗粒	110907	10.84	15.72	134.34
	10092952 (三精)	17.55	4.17	113.28		111001	10.21	15.81	129.07
	091203 (瑞格)	18.05	5.19	113.19		111003	10.58	15.29	136.41
	101004 (瑞格)	18.27	5.34	114.58	胶囊	101110	2.59	0.98	40.09
	110107 (瑞格)	18.13	4.98	113.77		110108	2.84	1.06	41.25
注射液	20091123	0.86	2.50	157.85		110507	2.73	1.02	40.87

3 讨论

3.1 检测波长的选择

经二极管阵列检测器全波长扫描, 得各待测物质最大吸收波长分别为: 绿原酸 324 nm, 连翘苷

280 nm, 黄芩苷 274 nm, 由于连翘苷的量较低, 并且在 324 nm 基本无吸收, 因此确定连翘苷与黄芩苷的检测波长为 280 nm; 但绿原酸在 280 nm 左右吸收弱, 而且在注射液中绿原酸量很低, 故绿原酸

的检测波长设定为 324 nm。综合考虑各峰高及峰面积的比例,选择 324 nm 和 280 nm 为检测波长,在不同的时间段进行双波长切换检测。

3.2 流动相的考察

参考文献[6-8]分别比较甲醇-1%冰醋酸、乙腈-1%冰醋酸、甲醇-0.2%磷酸、乙腈-0.2%磷酸等不同流动相,并进行梯度洗脱考察。通过比较发现,以甲醇-0.2%磷酸为流动相,在 0~35 min 进行线性梯度洗脱色谱峰峰形较好,3 种成分均达到基线分离,而且时间短,操作简便。

3.3 提取方式的考察

参考文献报道[6-7],分别对提取溶剂(纯水、25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇、甲醇)和超声提取时间(5、10、20、30、45 min)进行考察,结果以 50%甲醇为提取溶剂,颗粒剂与胶囊剂超声 30 min 提取效率较高,而口服液与注射液超声 5~45 min 提取效率接近,因此,确定口服液与注射液超声提取 5 min,颗粒剂与胶囊剂超声提取 30 min。

3.4 小结

由表 2 可知,不同剂型的双黄连制剂 3 种成分相差较大,可见生产工艺对本品内在质量有较大影响,另由于 2009 年双黄连注射液出现严重不良反应事件,目前临床与市场上较少使用和销售该制剂,

因此对现仅有的一批双黄连注射液样品进行了测定。本实验方法分析时间短、简便快速、准确,可应用于双黄连制剂的质量评价与质量控制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 黄敬群, 杨娟, 李红. 高效液相色谱法测定双黄连口服液中绿原酸、黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(5): 53-55.
- [3] 孙永慧, 李文春. HPLC 同时测定双黄连粉针剂中 5 种成分的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(1): 65-68.
- [4] 覃薛文. RP-HPLC 测定双黄连颗粒中连翘苷的含量 [J]. 中国药师, 2008, 11(5): 550-551.
- [5] 林敏. RP-HPLC 法同时测定双黄连胶囊中的绿原酸及黄芩苷的含量 [J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 78-79.
- [6] 水彦芳, 魏玉辉, 王晓华, 等. 高效液相色谱法同时测定双黄连制剂中三种指标成分含量 [J]. 兰州大学学报, 2008, 34(2): 44-46.
- [7] 汤须崇, 肖美添, 叶静. HPLC 法同时测定双黄连制剂中绿原酸、黄芩苷和连翘苷的含量 [J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(3): 64-66.
- [8] 周伟, 狄留庆, 毕肖林, 等. 双波长高效液相色谱法同时测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 的含量 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 2111-2113.