

HPLC 法测定银黄滴丸中绿原酸和黄芩苷

郑敏霞¹, 诸葛周², 戴德雄², 朱莹²

1. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006

2. 浙江维康药业有限公司, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 采用 HPLC 法建立银黄滴丸的质量标准。方法 绿原酸色谱条件: 色谱柱为 ZorBax SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸 (10:90), 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 327 nm; 黄芩苷色谱条件: 色谱柱为 Kromatek C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2), 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 280 nm。结果 绿原酸线性范围为 0.143~2.288 μg, 平均加样回收率为 99.3%, RSD 为 1.54%; 黄芩苷线性范围为 0.067 5~1.080 μg, 平均加样回收率为 99.9%, RSD 为 1.07%。结论 该方法简便、灵敏、专属性强、重复性好, 可作为银黄滴丸的质量控制方法。

关键词: 银黄滴丸; 绿原酸; 黄芩苷; HPLC; 质量控制

中图分类号: R286.02

文献标志码: B

文章编号: 0253-2670(2011)06-1138-03

Determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang Pills by HPLC

ZHENG Min-xia¹, ZHUGE Zhou², DAI De-xiong², ZHU Ying²

1. Zhejiang Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China

2. Zhejiang Welcome Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui 323000, China

Key words: Yinhuang Pills; chlorogenic acid; baicalin; HPLC; quality control

银黄滴丸由金银花提取物和黄芩提取物组成, 具有清热, 解毒, 消炎的作用。可用于上呼吸道感染、急慢性咽炎等症的治疗, 临床效果显著。其中金银花的主要成分和特征成分是绿原酸, 黄芩的主要成分和特征成分是黄芩苷。为了有效地控制该产品的质量, 参照文献方法^[1], 针对银黄滴丸中主要有效成分绿原酸和黄芩苷, 建立 HPLC 法进行定量测定。实验结果表明该方法简便、准确、重复性好, 可作为银黄滴丸质量控制的方法。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 浙江大学 N2000 色谱工作站; BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); JL—180DTH 超声波清洗器 (南京科捷分析仪器有限公司)。银黄滴丸 (批号 20080901、20080903、20080905) 由浙江维康药业有限公司提供。绿原酸 (批号 715-200010)、黄芩苷 (10715-200212) 中国药品生物制品检定所提供。乙腈、甲醇为色谱纯, 水为双蒸水 (自制), 其余试

剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 绿原酸的测定^[2-4]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量, 置棕色量瓶中, 加 50% 甲醇制成 50 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取银黄滴丸内容物, 适当研细, 取 0.3 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇约 40 mL, 超声处理 (功率 150 W, 频率 50 kHz) 20 min, 放冷, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.3 阴性对照液的制备 按处方制备缺金银花的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制备缺金银花阴性对照液。

2.1.4 色谱条件的选择 取绿原酸对照品溶液进行紫外 (波长 200~400 nm) 扫描, 结果绿原酸色谱峰在 327 nm 波长处有最大吸收, 故选择 327 nm 作为检测波长。

收稿日期: 2010-09-26

作者简介: 郑敏霞 (1963—), 女, 浙江中医药大学附属第一医院中药房副主任。Tel: (0571)87073482 E-mail: zmxxyx@126.com

2.1.5 色谱条件^[5] 色谱柱为 ZorBax SB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸 (10:90), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 327 nm, 进样量 10 μL。理论板数按绿原酸峰计算不低于 3 000。

2.1.6 方法专属性考察 按上述色谱条件分别进样对照品溶液、供试品溶液和缺金银花阴性对照液进行分析, 结果阴性对照无干扰。色谱图见图 1。

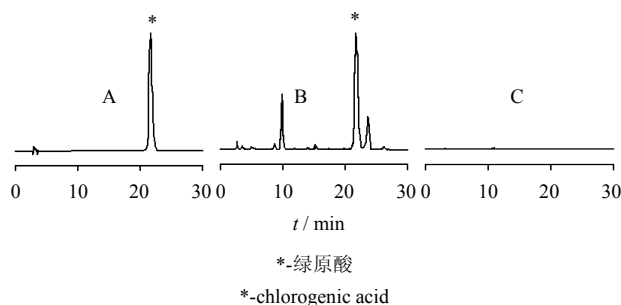


图1 对照品(A)、银黄滴丸(B)和缺金银花阴性对照(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), Yinhuang Pills (B), and negative sample without *Lonicerae Japonicae Flos* (C)

2.1.7 线性关系考察 精密称取绿原酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成不同质量浓度的系列对照品溶液, 摇匀, 分别精密进样 0.143、0.286、0.572、1.144、1.716、2.288 μg, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=2.253\ 8\times 10^4+2\times 10^6\ X$, $r=0.999\ 8$, 表明绿原酸在 0.143~2.288 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.8 精密度试验 精密吸取 57.2 μg/mL 对照品溶液 10 μL, 依法测定, 连续 5 次, 记录色谱峰, 计算得绿原酸峰面积的 RSD 为 0.07%。

2.1.9 稳定性试验 取批号 030101 的供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、6、8、16 h 后进样测定, 记录峰面积, 计算得绿原酸峰面积的 RSD 为 0.47%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.1.10 重现性试验 取批号 030101 样品 0.3 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 平行 5 份, 分别进样测定, 计算得绿原酸质量分数的 RSD 为 0.59%。

2.1.11 加样回收率试验 取批号 030101 样品 9 份, 每份 0.15 g, 精密称定, 平分 3 组, 分别精密加入绿原酸对照品 1.048、1.310、1.572 mg, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得绿原酸的平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.54%。

2.1.12 样品测定 取 3 批样品, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果见表 1。

2.2 黄芩苷的测定^[6-9]

2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品适量, 用甲醇溶解制成 20 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取银黄滴丸内容物, 适当研细, 取 0.3 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇约 80 mL, 超声处理 (功率 150 W, 频率 50 kHz) 20 min, 放冷, 用 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 色谱条件的选择 取黄芩苷对照品溶液进行紫外 (波长 200~400 nm) 扫描, 结果黄芩苷峰在 280 nm 波长处有最大吸收, 故选择 280 nm 作为检测波长。

2.2.4 阴性对照液的制备 按处方制备缺黄芩的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制备缺黄芩阴性对照液。

2.2.5 色谱条件 色谱柱为 Kromatek C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL。

2.2.6 方法专属性考察 按上述色谱条件分别进样对照品溶液、供试品溶液和缺黄芩阴性对照液进行分析, 结果阴性对照无干扰。色谱图见图 2。

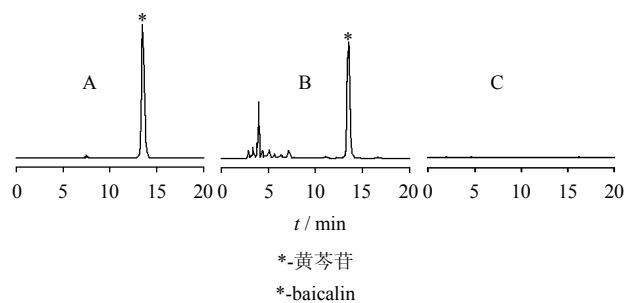


图2 对照品(A)、银黄滴丸(B)和缺黄芩阴性对照(C)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substance (A), Yinhuang Pills (B), and negative sample without *Scutellariae Radix* (C)

2.2.7 线性关系考察 精密称取黄芩苷对照品适量, 加甲醇制成不同质量浓度的系列对照品溶液, 摇匀, 分别精密进样 0.067 5、0.135、0.202 5、0.270、0.540、1.080 μg, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=151.7+2\times 10^6\ X$,

$r=0.999\ 9$, 表明黄芩苷在 $0.067\ 5\sim 1.080\ \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.8 精密度试验 精密吸取 $0.027\ \text{mg/mL}$ 对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 重复进样 5 次, 记录峰面积, 计算得黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.05%。

2.2.9 稳定性试验 取批号 030101 的供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、6、8、16 h 后进样测定, 计算得黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.14%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.2.10 重现性试验 取批号 021201 样品 $0.3\ \text{g}$, 精密称定, 制备供试品溶液, 平行 5 份, 分别进样测定, 计算得黄芩苷质量分数的 RSD 为 0.37%。

2.2.11 加样回收率试验 取批号 030101 样品 9 份, 每份 $0.15\ \text{g}$, 精密称定, 平分 3 组, 分别精密加入黄芩苷对照品 9.10 、 11.40 、 $13.50\ \text{mg}$, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得绿原酸的平均回收率为 99.9%, RSD 为 1.07%。

2.2.12 样品测定 取 3 批样品, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果见表 1。

表 1 银黄滴丸中绿原酸和黄芩苷的测定 ($n=3$)
Table 1 Determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang Pills ($n=3$)

批 号	绿原酸/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	黄芩苷/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
20080901	4.54	36.50
20080903	4.16	33.96
20080905	4.44	34.57

3 讨论

曾以甲醇-水-磷酸 (60:40:0.2)、甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2) 为流动相测定黄芩苷, 结果均能达到满意的分离效果, 黄芩苷峰达到基线分离, 峰形对称; 前者黄芩苷峰略有拖尾, 因此选用甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2) 为流动相。

曾分别以乙腈-0.4%磷酸溶液 (11:89:10:90) 为流动相测定绿原酸, 结果均能达到满意的分离效果, 绿原酸峰达到基线分离, 峰形对称; 前者绿原酸峰略有拖尾, 因此选用乙腈-0.4%磷酸溶液

(10:90) 为流动相。

对绿原酸的提取方法进行了考察, 分别比较了超声处理与加热回流两种提取方法, 结果发现这两种方法的提取结果中绿原酸的含量几乎无差异。由于超声处理简便、快捷, 耗时短, 因此选用超声处理作为提取方法, 并对提取时间 10、20、30 min 进行了考察, 结果发现超声处理 20 min 后绿原酸提取率几乎无变化, 因此选择提取时间为 20 min。

对黄芩苷的提取方法进行了考察, 分别比较了超声处理与加热回流两种提取方法, 结果发现这两种方法的提取结果中黄芩苷的含量几乎无差异。由于超声处理简便、快捷, 耗时短, 因此选用超声处理作为提取方法, 并对提取时间进行了考察, 分别超声处理 10、20、30 min, 结果发现超声处理 20 min 后黄芩苷提取率几乎无变化, 因此选择提取时间为 20 min。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 褚文静, 张 雪, 王 伟, 等. HPLC 法测定抗感胶囊中绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 66-68.
- [3] 毛泉明, 张钰泉, 吴 倩, 等. 高效液相色谱法测定银翘解毒片中绿原酸含量 [J]. 黑龙江医药, 1997, 10(1): 19-20.
- [4] 阎 姝, 田书霞, 徐茂玲, 等. HPLC 法测定注射用双黄连中黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、咖啡酸和绿原酸 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 907-909.
- [5] 杨 荣, 周 晶, 宁 娜, 等. RP-HPLC 法测定金银花及金芪降糖片中的绿原酸 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 237-240.
- [6] 李 欣, 吴 毅. HPLC 法测定小柴胡颗粒剂中黄芩苷的含量 [J]. 广西医学, 2002, 24(4): 462-463.
- [7] 王 鸽, 张洪霞, 薛秋霞, 等. RP-HPLC 法测定复方百部止咳颗粒中 5 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 498-501.
- [8] 胡晓斌, 贺 林, 刘智勇, 等. RP-HPLC 测定辛芩颗粒中黄芩苷的含量 [J]. 华西药学杂志, 2002, 16(6): 464-65.
- [9] 褚文静, 张 雪, 黄喜茹. RP-HPLC 法测定湿毒清片中 7 种活性成分 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1809-1811.