

HPLC 法测定清化丸中绿原酸和黄芩苷

林 宏¹, 孙燕燕¹, 薛士荣², 李玉仿²

1. 天津市儿童医院, 天津 300074

2. 天津市大港区药品检验所, 天津 300270

摘要: 目的 建立同时测定清化丸中绿原酸和黄芩苷的方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Diamond C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱, 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 327 nm, 柱温 40 ℃。结果 绿原酸在 32.96~494.40 ng 呈线性关系, 平均回收率为 100.6%; 黄芩苷在 48.27~724.05 ng 呈线性关系, 平均回收率为 98.6%。结论 该方法简便、准确可靠, 能同时定量测定两种成分, 更全面地控制清化丸的质量。

关键词: 清化丸; 绿原酸; 黄芩苷; 金银花; 黄芩; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)06-1141-03

Determination of chlorogenic acid and baicalin in Qinghua Pills by HPLC

LIN Hong¹, SUN Yan-yan¹, XUE Shi-rong², LI Yu-fang²

1. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

2. Tianjin Dagang District Institute for Drug Control, Tianjin 300270, China

Key words: Qinghua Pills; chlorogenic acid; caicalin; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Scutellariae Radix*; HPLC

清化丸是天津市儿童医院的传统制剂, 由连翘、黄芩、金银花等 10 余味中药组成, 具有清热解毒、软坚消肿的功效, 用于治疗急性淋巴腺炎、疮疖化脓性皮肤病。该制剂为中药复方制剂, 成分极为复杂, 本品中的金银花、蒲公英、苦地丁均具有清热解毒的功效^[1], 且三者均含有绿原酸^[2-3]; 黄芩作为该制剂中的主药, 主要成分为黄芩苷^[4], 故以绿原酸和黄芩苷作为测定指标, 采用 HPLC 法梯度洗脱同时测定清化丸中绿原酸和黄芩苷的量^[5-6]。与等度洗脱法相比^[7], 该方法简单、灵敏度高、重现性好, 测定结果准确, 能够减少分析时间, 提高工作效率, 可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与材料

岛津 LC-2010C 高效液相色谱仪, 岛津高效液相色谱仪工作站 LC-Solution, 黄芩苷(批号 110715-201016, 质量分数为 94.0%)、绿原酸对照品(批号 110753-200413) 购于中国药品生物制品检定所, 甲醇、磷酸均为色谱纯, 水为纯化水。清化丸由天津市儿童医院自制(批号分别为 20100701、20100801、

20100901, 3 g/丸)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamond C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 线性梯度洗脱, 洗脱程序: 0~8 min、65% B, 8~25 min、65%~50% B, 25~30 min、50% B, 体积流量 1 mL/min, 检测波长 327 nm, 柱温 40 ℃, 进样量 5 μL。

2.2 混合对照品储备液的制备

取绿原酸对照品置五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h 后, 精密称取 5.10 mg, 精密称取黄芩苷对照品 9.52 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶解并稀释至刻度, 配制含绿原酸 20.4 μg/mL、黄芩苷 35.8 μg/mL 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取质量差异项下的清化丸, 剪碎, 混匀, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W,

收稿日期: 2010-10-15

作者简介: 林 宏 (1969—), 女, 高级工程师, 药剂科主任, 医学硕士学位, 研究方向为医院药学研究与药事管理。

Tel: (022)23519506 13102138750 E-mail: roylinvip@126.com

频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照液的制备

按处方比例分别称取除黄芩, 除金银花、蒲公英和苦地丁以外的其余药味, 按照清化丸的制备工艺分别制备缺黄芩, 缺金银花、蒲公英、苦地丁的阴性样品。按照“2.3”项下方法操作, 分

别制成缺黄芩, 缺金银花、蒲公英、苦地丁的阴性对照液。

2.5 系统适用性试验

分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照液, 进样分析, 结果阴性对照液在黄芩苷峰和绿原酸峰的位置上没有峰, 对供试品溶液测定均无干扰。结果见图 1。

2.6 线性关系的考察

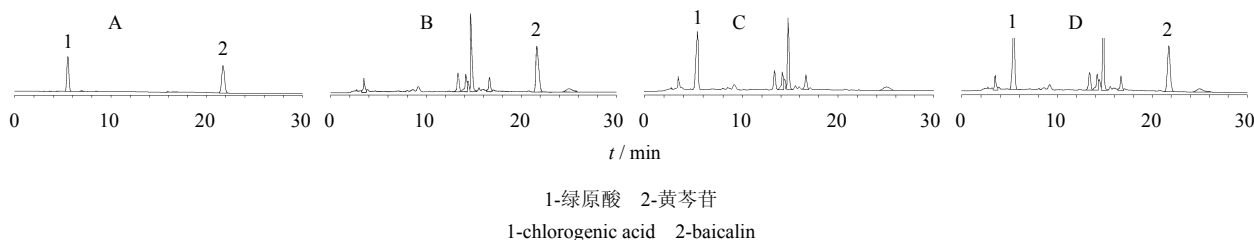


图 1 对照品 (A)、缺金银花、蒲公英、苦地丁阴性对照 (B)、缺黄芩阴性对照 (C) 和清化丸 (D) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), negative sample without *Lonicerae Japonicae Flos*, *Taraxaci Herba*, or *Corydalis Bungeanae Herba* (B), negative sample without *Scutellariae Radix* (C), and Qinghua Pills (D)

依次精密吸取 20.4 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸、35.8 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷的混合对照品储备液 1、2、5、10、15 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积。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: 绿原酸 $Y=3\ 280\ 229.7 X-595.0$, $r=0.999\ 9$; 黄芩苷 $Y=2\ 120\ 409.3 X-990.2$, $r=0.999\ 9$; 表明绿原酸在 32.96~494.40 ng, 黄芩苷在 48.27~724.05 ng 线性关系良好。

2.7 精密度试验

取混合对照品储备液 (绿原酸 20.4 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 35.8 $\mu\text{g/mL}$), 重复进样 5 次, 结果绿原酸和黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.12%、0.82%。

2.8 重现性试验

取同一样品 (批号 20100801), 平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 计算绿原酸和黄芩苷质量分数的 RSD 分别为 0.53%、0.42%。

2.9 稳定性试验

取同一样品 (批号 20100801) 的供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、4、8、12、16 h 进样分析, 计算绿原酸和黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.25%、0.28%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

称取批号 20100801 的样品 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别加入 20.4 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸及 35.8 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷的混合对照品储备液 50 mL, 制备供

试品溶液, 进样分析, 计算绿原酸及黄芩苷的回收率, 结果平均回收率分别为 100.4%、99.1%, RSD 分别为 0.80%、0.91%。

2.11 样品测定

取 3 批样品, 制备供试品溶液, 进样分析, 记录色谱峰, 按外标法计算绿原酸及黄芩苷的质量分数, 结果见表 1。

表 1 清化丸中绿原酸和黄芩苷的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of chlorogenic acid and baicalin in Qinghua Pills ($n=3$)

批 号	绿原酸/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄芩苷/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
20100701	1.934 8	3.256 7
20100801	2.321 2	3.329 0
20100901	2.315 1	3.300 5

3 讨论

3.1 检测波长的选择

以甲醇为溶剂, 分别测定了绿原酸和黄芩苷的紫外光谱图, 绿原酸的最大吸收波长为 327 nm, 黄芩苷的最大吸收波长为 312 nm 与 278 nm。分别选择 327、278 nm 波长同时测定, 在 278 nm 比在 327 nm 测定绿原酸的量低, 而黄芩苷的量在这两个波长分别测定时不受影响, 故实验选择 327 nm 进行测定, 各色谱峰分离良好, 基线平稳。

3.2 溶剂的选择

选择 50%甲醇、70%乙醇分别作为提取溶剂进行测定,结果绿原酸的质量分数没有明显变化,但采用 50%甲醇溶剂提取样品中黄芩苷的含量低于 70%乙醇溶剂提取的测定结果,故采用 70%乙醇作为提取溶剂。

3.3 提取时间的选择

将样品分别超声 30、40、60 min 后测定绿原酸和黄芩苷的量,结果无明显差别,故确定超声时间为 30 min。

3.4 取样量的选择

分别选择样品的取样量为 0.25、0.5、1 g 按样品测定方法进行测定,结果 3 种取样量的提取效率无明显差别,但 0.25、0.5 g 测得的峰面积偏小,故确定取样量为 1 g。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 张雪,何丙辉,杨宪,等. HPLC 法测定金银花中常春藤皂苷元、齐墩果酸、槲皮素、木犀草苷和绿原酸 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1576-1577.
- [3] 凌云,范国强,蔡少青,等. HPLC 法测定蒲公英中氯原酸的含量 [J]. 中草药, 1998, 29(8): 521-522.
- [4] 齐香君,郭乐康,陈微娜. 诱导子对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 801-803.
- [5] 汪洪武,刘艳清. HPLC 测定复方金银花颗粒中绿原酸与黄芩苷含量 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9): 706-708.
- [6] 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.
- [7] 郑志伟,周礼玲. HPLC 法测定双黄滴丸中黄芩苷和绿原酸的含量 [J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 757-758.

郑重声明

天津中草药杂志社(出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊)未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议,凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动,均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益,天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利,特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com”,切勿上当受骗;若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况,请检举揭发。

Tel: 022-27474913 E-mail: zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社