

HPLC 法同时测定双黄连颗粒中 9 种成分

安益强¹, 汤道权^{1,2*}, 印晓星^{2,3}, 江相兰^{1,2}, 吴静¹, 陈辉¹

1. 徐州医学院 新药与临床应用重点实验室, 江苏 徐州 221004

2. 徐州医学院 药物分析教研室, 江苏 徐州 221004

3. 徐州医学院 临床药理教研室, 江苏 徐州 221004

摘要: 目的 建立同时测定双黄连颗粒中绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素 9 种成分的 HPLC 方法。方法 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 278 nm, 柱温 35℃。结果 9 种成分均达到基线分离, 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系 ($r>0.999\ 8$); 回收率在 97.9%~102.1%。结论 本方法准确、灵敏、可靠, 重现性较好, 可用于双黄连颗粒的质量控制。

关键词: 双黄连颗粒; 连翘酯苷; 野黄芩苷; 汉黄芩素; 黄芩苷; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0091-03

Simultaneous determination of nine chemical components in Shuanghuanglian Granule by HPLC

AN Yi-qiang¹, TANG Dao-quan^{1,2}, YIN Xiao-xing^{2,3}, JIANG Xiang-lan^{1,2}, WU Jing¹, CHEN Hui¹

1. Key Laboratory of New Drug and Clinic Application, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

2. Department of Pharmaceutical Analysis, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

3. Department of Clinical Pharmacology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

Key words: Shuanghuanglian Granule; forsythoside; scutellarin; wogonin; baicalin; HPLC

双黄连方剂由银翘散(《瘟病调辨》)精简化裁而来, 其颗粒剂是由金银花、黄芩、连翘经现代提取工艺精制而成, 其制剂尚有片剂、胶囊剂、软胶囊、粉针、口服液、栓剂等。方中金银花为君药, 辅以黄芩、连翘, 三药同用, 共奏辛凉解表、清热解毒的功效, 常用于病毒或细菌感染引起的肺炎、呼吸道感染、扁桃体炎等疾病的治疗, 是抗病毒、抗菌常用中成药^[1-2]。《中国药典》2010 年版一部采用 HPLC 法只测定了双黄连颗粒中黄芩苷、连翘苷的量^[3], 而且是采用包括甲醇-醋酸-水、乙腈-水的不同流动相分别测定。中药, 尤其是复方中药, 其发挥作用的物质基础是活性物质群, 经多途径的整合而发挥疗效^[4]。对于双黄连颗粒仅测定黄芩苷、连翘苷的量并不能完全反映双黄连颗粒的质量。为了更好地控制双黄连颗粒的质量, 本实验采用梯度洗脱建立了同时测定双黄连颗粒中绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素 9 种成分^[5-6]的 HPLC 法, 具有简便

可行、准确、快速的特点, 减少了配制流动相的步骤和进样次数, 提高了工作效率, 可用于双黄连颗粒的质量控制。本实验同时将所建立的色谱条件及样品处理方法为双黄连其他制剂的质量控制研究提供了方法学参考。

1 仪器与材料

Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津, 包括四元泵, 自动进样器, DAD 二极管阵列检测器); KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 梅特勒托利多 XS3DU 分析电子天平(德国 Sartorius 公司, 百万分之一)。

绿原酸(批号 20091001, 质量分数≥98%, 四川维克奇生物科技有限公司), 咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素对照品(质量分数均≥98%, 成都曼斯特生物科技有限公司, 批号分别为 A0096、A0103、A0012、A0017、A0023、A0017、A0018、A0502); 双黄连颗粒(批号分别为 100202、100301、100502, 哈药

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 徐州市战略性新兴产业发展专项引导资金计划项目 (XX10A052)

作者简介: 安益强 (1982—), 男, 河南开封人, 助教, 硕士, 主要从事中药活性成分筛选及其适宜剂型设计研究。

Tel: (0516)83262251 15252000965 E-mail: anyhe2006@yahoo.com.cn

*通讯作者 汤道权 Tel/Fax: (0516)83262136 13952159997 E-mail: tdq993@hotmail.com

集团中药二厂)。乙腈(色谱纯, Tedia 公司), 甲醇、乙醇、甲酸(分析纯, 南京化学试剂有限公司), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[7]

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶

液(B), 梯度洗脱: 0~7 min, 7% A; 7~10 min, 7%~10% A; 10~15 min, 10%~14% A; 15~20 min, 14%~15% A; 20~35 min, 15%~16% A; 35~40 min, 16%~20% A; 40~58 min, 20% A; 58~75 min, 20%~28% A; 75~90 min, 28%~37% A; 90~105 min, 37% A; 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长 278 nm, 柱温 35 ℃。色谱图见图 1。

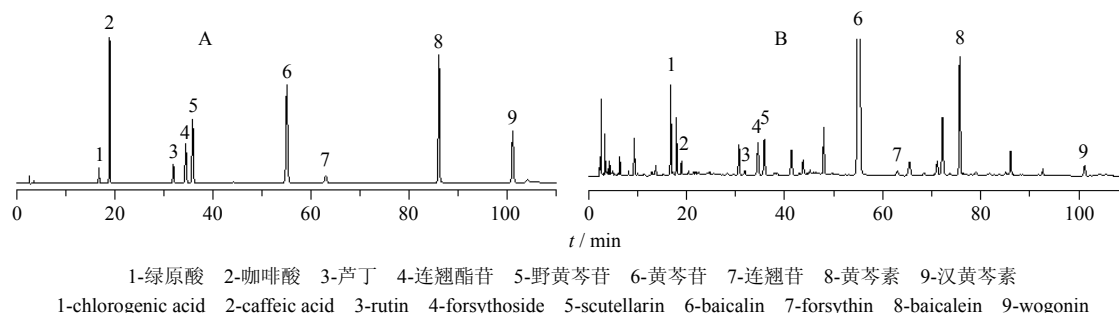


图 1 对照品 (A) 和双黄连颗粒 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and Shuanghuanglian Granule (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别称取绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素对照品 2.6、0.7、1.3、3.0、1.2、1.5、0.8、0.5 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 106.44、30.26、50.89、121.06、48.72、58.76、32.09、21.52 μg/mL 混合对照品溶液。

称取黄芩苷对照品 5.2 mg, 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 1 048.00 μg/mL 黄芩苷对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取重量差异项下的双黄连颗粒, 混匀, 研细, 干燥至恒定质量, 取粉末约 1.2 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加 50%甲醇 10 mL, 称定质量, 超声提取(功率 250 W, 频率 45 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 称定质量, 并用 50%甲醇水溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液、黄芩苷对照品溶液各 1、2、4、8、12、20、30 μL, 分别按照“2.1”项下色谱条件依次进样, 以进样量(μg)为横坐标(X), 峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归, 回归方程见表 1。结果表明, 各对照品在测定范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液及黄芩苷对照品溶液,

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship

成分	回归方程	线性范围 / μg	r 值
绿原酸	$Y=1 \times 10^6 X-4\ 511$	0.11~3.19	1.000 0
咖啡酸	$Y=3 \times 10^6 X-19\ 403$	0.03~0.91	0.999 8
芦丁	$Y=814\ 335 X-2\ 802$	0.05~1.50	0.999 9
连翘酯苷	$Y=991\ 503 X-13\ 931$	0.12~3.63	1.000 0
野黄芩苷	$Y=4 \times 10^6 X+8\ 709.1$	0.05~1.46	0.999 9
黄芩苷	$Y=3 \times 10^6 X-236\ 298$	1.68~20.96	0.999 9
连翘苷	$Y=623\ 312 X+1\ 526.4$	0.06~1.76	1.000 0
黄芩素	$Y=5 \times 10^6 X-19\ 757$	0.03~0.96	0.999 9
汉黄芩素	$Y=4 \times 10^6 X-3\ 999.8$	0.03~0.90	1.000 0

分别在“2.1”项色谱条件下重复进样 6 次, 进样体积为 10 μL, 以对照品峰面积进行计算, 绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.6%、1.3%、1.2%、0.7%、0.7%、1.2%、0.8%、1.2%、1.2%。

2.6 稳定性试验

取待测双黄连颗粒(批号 100202)供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件操作, 分别在 0、2、4、8、16、20、24 h 进样, 测定绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积, 按峰面积计算得 RSD 分别为 2.1%、1.5%、1.9%、1.7%、2.2%、1.5%、1.2%、1.8%、1.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取同一批次(批号 100202)双黄连颗粒约 1.2 g,

平行称定 6 份,按“2.3”项下方法操作,制备供试品溶液 6 份,每份精密吸取 10 μ L 按“2.1”项下色谱条件测定,分别测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素质量分数的 RSD 分别为 1.8%、2.1%、1.4%、0.7%、1.3%、1.7%、1.4%、1.5%、1.2%。

2.8 加样回收率试验

称取批号 100202 的双黄连颗粒 9 份,精密称定,每份 0.6 g,每 3 份加入相同量的绿原酸、咖啡酸、芦丁、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、黄芩素、汉黄芩素对照品,按“2.3”项下方法操作,

制备供试品溶液,按“2.1”项条件测定,结果平均回收率分别为 99.5%、100.6%、99.1%、100.4%、98.5%、97.9%、102.1%、98.3%、101.4%,RSD 分别为 1.5%、1.8%、2.1%、2.1%、2.5%、1.6%、1.8%、1.9%、2.2%。

2.9 样品测定

分别称取双黄连颗粒约 1.2 g,按“2.3”项下方法操作,制成供试品溶液,每个批号 3 份,按“2.1”项下色谱条件进行测定,并计算样品中 9 种成分的质量分数,结果见表 2。

3 讨论

本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-醋酸水

表 2 不同批号双黄连颗粒中 9 种成分测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of nine components in different batches of Shuanghuanglian Granula ($n=3$)

批 号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)								
	绿原酸	咖啡酸	芦丁	连翘酯苷	野黄芩苷	黄芩苷	连翘苷	黄芩素	汉黄芩素
100202	1.337	0.161	0.207	1.528	0.258	18.805	0.473	0.116	0.081
100301	1.329	0.166	0.212	1.510	0.241	18.779	0.482	0.110	0.078
100502	1.345	0.170	0.214	1.533	0.257	18.814	0.482	0.101	0.088

溶液、乙腈-甲酸水溶液洗脱系统,结果表明以乙腈-甲酸水溶液洗脱系统分离效果最好。又分别比较了乙腈-0.2%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液洗脱系统,结果表明两者无明显差别,故选用乙腈-0.1%甲酸水洗脱系统。通过在 220、254、278、320、360 nm 波长下检测比较,发现 220、254 nm 下基线不稳,且干扰峰较多;278、320、360 nm 相比较,278 nm 下峰分离较好,丰度较高,故选用 278 nm 作为检测波长。

在样品处理过程中,参照了《中国药典》2010 年版中定量测定项下的样品处理方法,比较了甲醇、50%甲醇、水 3 种提取溶媒,结果表明以 50%甲醇为最佳提取溶媒;以 50%甲醇为提取溶媒,比较了 3 种不同的提取方法,冷浸法、回流提取法、超声提取法,结果后者提取率明显优于前两种提取方法;采用超声提取法,分别考察了加入 5、10、15、20 mL 50%甲醇的提取效果,结果表明 10、15、20 mL 提取量无明显差别,故选择 10 mL 50%甲醇进行提取;采用超声提取法,加入 10 mL 50%甲醇,又分别考察了提取 15、30、45、60 min 的提取效率,结果表明从超声提取 30 min 后,延长提取时间,提取量无明显差别,故提取时间选择 30 min。

中药特别是中药复方,包含许多化学成分,其疗效是整体协同的结果,应尽可能多地对其成分进

行说明,故同时测定多种成分的量是实现中药复方有效质控的重要途径之一。双黄连为中药抗菌抗病毒的著名方剂,由金银花、黄芩、连翘 3 味中药组成,具有清热解毒、清宣风热的功效。本实验以双黄连颗粒剂为研究对象,建立了 HPLC 法同时测定其中 9 种成分的方法,避免了测定单个成分的繁琐步骤,该方法准确、可靠、简便易行,可用于双黄连颗粒的质量控制,本研究同时可为双黄连复方中物质基础的研究提供色谱分离上的参考。

参考文献

- [1] 王全利. 双黄连粉针剂治疗妊娠期上呼吸道感染临床观察 [J]. 中医药研究, 1999, 15(3): 33-35.
- [2] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准-新药转正标准 (第 16~26 册) [S]. 2003.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 安益强, 贾晓斌, 袁海建, 等. 板蓝根抗病毒物质基础研究思路 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 616-619.
- [5] 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.
- [6] 钮旭升. 注射用双黄连指纹图谱的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [7] Cao Y H, Wang L C, Yu X J, et al. Development of the chromatographic fingerprint of herbal preparations Shuang-Huang-Lian oral liquid [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(3): 845-856.