

HPLC-MS/MS 法测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷

张 婷^{1,2}, 美尔哈巴·热西提¹, 林 潇², 解军波^{1*}, 张彦青¹

1. 天津商业大学 制药工程系, 天津 300134

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 建立 HPLC-MS/MS 检测银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的方法。方法 应用超声提取和 Agilent G6410B Triple Quad LC/MS 检测。Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm) 分析柱, 流动相为甲醇-0.1%醋酸水溶液 (60:40), 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量为 20 μL; 以液相色谱分离、电喷雾离子化串联质谱进行检测。结果 绿原酸和黄芩苷分别在 50~800 ng/mL、125~2 000 ng/mL 线性关系良好, 银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的平均加样回收率分别为 102.96%、100.69%。结论 该方法快速简便、精密度好、灵敏度高, 可用于银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的定量测定。

关键词: 银黄颗粒; 绿原酸; 黄芩苷; HPLC-MS/MS; 超声提取

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0711-03

Determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang Granule by HPLC-MS/MS

ZHANG Ting^{1,2}, REXIT·Marhaba¹, LIN Xiao², XIE Jun-bo¹, ZHANG Yan-qing¹

1. Department of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Key words: Yinhuang Granule; chlorogenic acid; baicalin; HPLC-MS/MS; ultrasonic extraction

银黄颗粒是由金银花提取物、黄芩提取物加工制成的复方制剂, 具有清热、解毒、消炎的功效, 用于治疗急慢性扁桃体炎、急慢性咽喉炎、上呼吸道感染等^[1]。本制剂中的主要药效指标成分为黄芩苷和绿原酸, 有文献报道采用 HPLC 法分别测定银黄颗粒及相关制剂中绿原酸和黄芩苷的量^[2-5], 但 HPLC-MS/MS 法对银黄颗粒的质量控制研究未见文献报道。本实验建立了 HPLC-MS/MS 法同时测定银黄颗粒剂中绿原酸和黄芩苷的定量方法, 研究结果显示该法快速简便、精密度好、灵敏度高, 可用于银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的测定。

1 仪器与材料

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 含 G1322A 在线脱气机、G1312B 二元泵、G1316B 柱温箱、G1315C DAD 紫外检测器、G1367D 自动进样器 (美国 Agilent 公司); G6410B Triple Quad LC/MS、Masshunter 色谱工作站 (美国 Agilent 公

司); BP211D 型十万分之一电子天平 (德国 Satorius 公司); ZH—2 型涡流混合器 (天津大学无线电厂); AS10200A 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。绿原酸 (批号 110753-200412)、黄芩苷 (批号 715-200010) 对照品均购自中国药品生物制品检定所; 银黄颗粒剂样品由市场购得, 分别为四川三精升和制药有限公司 (批号 20080904)、湖南麓山天然植物制药有限公司 (批号 20090205)、天津太平洋制药有限公司 (批号 090604), 规格均为 4 g/袋; 色谱纯甲醇与超纯水均购自 J. T. Baker 公司。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 柱温为 25 °C, 流动相为 0.1%醋酸水溶液-甲醇 (60:40), 体积流量 0.2 mL/min, 进样量为 20 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾 ESI 离子源, 多反应检测

收稿日期: 2011-08-09

作者简介: 张 婷 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂。Tel: 13602196583 E-mail: zhangting19860511@126.com

*通讯作者 解军波 Tel: 13902153236 E-mail: junboxie@yahoo.com.cn

(MRM) 方式, 电喷雾电压 4 000 V, 雾化气体为氮气, 雾化气压 241.325 kPa, 干燥气体为氮气, 干燥气体流量 8 L/min, 离子源温度 350 °C, 碰撞气体高纯氮气, 碰撞气压 0.15 MPa。绿原酸和黄芩苷质谱分析的条件参数见表 1。

按上述色谱和质谱条件对银黄颗粒样品中各成分进行测定, 记录色谱图。图 1 为混合对照品和银黄颗粒样品总离子流图及 2 种目标化合物的提取离子流图。由图 1 可知银黄中各组峰型良好, 方法具有较好的分离度和灵敏度, 可以进行定量分析。

表 1 绿原酸和黄芩苷质谱分析的条件参数

Table 1 MS parameters of chlorogenic acid and baicalin

化合物	时间 / min	ESI (+/-)	MRM 反应	碎裂电压 / V	碰撞能量 / V	驻留时间 / s
绿原酸	0~2.6	ESI (-)	353.1→191.0	100	10	0.2
黄芩苷	2.6~3.8	ESI (+)	447.1→271.2	160	10	0.2

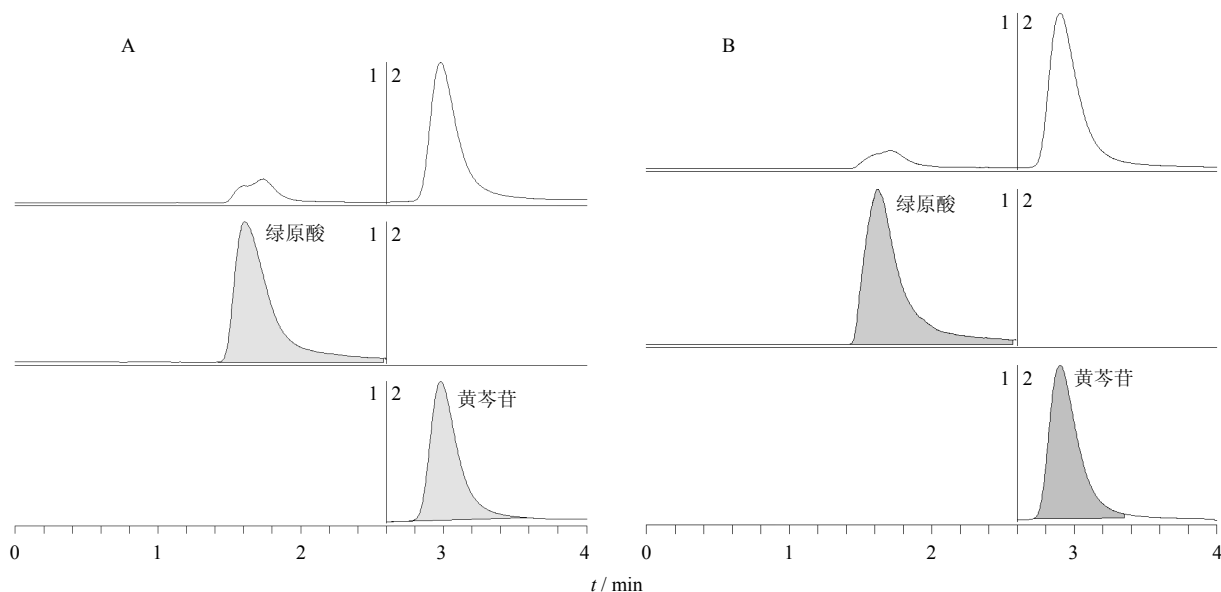


图 1 混合对照品 (A) 和银黄颗粒样品 (B) 的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 HPLC-MS/MS chromatograms of mixed reference substances (A) and Yinhuang Granule sample (B)

2.2 对照品溶液的配制

分别精密称量绿原酸、黄芩苷 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀后即得质量浓度分别为 100 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取银黄颗粒研成细粉, 精密称取 10 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声处理 30 min, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 针芯式微孔滤膜滤过, 加流动相稀释 50 倍后即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察

分别精密量取各对照品溶液适量置 100 mL 量瓶中, 配成含绿原酸 1 μg/mL 和黄芩苷 2.5 μg/mL 的混合对照品溶液。精密量取上述混合对照品溶液 8、4、2、1、0.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱和质谱条件进行测定。

以进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程: 绿原酸 $Y=105 X-1.25$, $r=0.999 6$; 黄芩苷 $Y=391.81 X+19.67$, $r=0.999 8$; 表明绿原酸在 50~800 ng/mL、黄芩苷在 125~2 000 ng/mL 线性关系良好。

2.5 精密度试验

按照“2.3”项制备方法, 制备批号 20090205 银黄颗粒的供试品溶液, 精密吸取该供试品溶液, 进样 20 μL, 连续 5 次, 测定峰面积, 计算得绿原酸、黄芩苷离子流色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.28%、2.69%。

2.6 稳定性试验

按照“2.3”项制备方法, 制备批号 20090205 银黄颗粒的供试品溶液, 精密吸取该供试品溶液, 进样 20 μL, 分别于 0、2、4、6、8 h 进行分析, 测

定色谱峰面积, 计算得绿原酸和黄芩苷提取离子流色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.83%、2.55%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

按照“2.3”项制备方法, 制备批号 20090205 银黄颗粒的供试品溶液, 共 5 份, 依法测定, 结果绿原酸和黄芩苷质量分数的 RSD 分别为 2.15%、2.91%。

2.8 加样回收率试验

制备批号 20090205 银黄颗粒的供试品溶液, 按检出量精密加入质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的绿原酸和黄芩苷对照品溶液各 1.2、2.9 mL, 按照“2.3”项制备供试品溶液, 共 5 份, 依法测定, 结果绿原酸和黄芩苷的平均加样回收率分别为 $(102.96 \pm 2.57)\%$ 、 $(100.69 \pm 2.16)\%$ 。

2.9 样品测定

取 3 批银黄颗粒, 按照“2.3”项制备方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液, 进样 20 μL , 测定峰面积。每批重复测定 3 次, 按回归方程计算绿原酸和黄芩苷的量, 结果见表 2。

表 2 银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的测定 ($n=3$)
Table 2 Determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang Granule ($n=3$)

批 号	绿原酸 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	黄芩苷 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
20080904	6.47	33.31
20090205	11.52	29.35
090604	3.85	28.04

3 讨论

银黄颗粒是由金银花提取物、黄芩提取物加工制成的复方制剂, 本制剂中的主要药效指标成分为黄芩苷和绿原酸, 本实验应用 HPLC-MS/MS 方法建立了同时检测银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的定量测定方法。研究结果发现, 以甲醇-0.1%醋酸水溶液 (60:40) 作为流动相, 体积流量 0.2 mL/min, 得到较好的分离度, 且保留时间适当。方法学考察发现本方法可以很好地测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的量, 不仅为银黄颗粒的质量控制提供了一定参考和依据, 同时为下一步研究大鼠口服银黄颗粒后体内指标成分的药动学特征奠定了基础。

参考文献

- [1] 宣铁锋. 银黄颗粒质量标准研究 [J]. 中国药业, 2006, 15(5): 52-53.
- [2] 黄 雄, 黄 嫒, 黄 佳, 等. HPLC 同时测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(5): 417-419.
- [3] 魏 清, 康红英. 高效液相色谱法测定银黄颗粒中绿原酸的含量 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1689-1670.
- [4] 马纪伟, 闫冬良. HPLC 测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2008, 22(4): 34-35.
- [5] 杨克迪, 王丽君, 龙云飞. 高效液相色谱程序可变波长法测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(7): 992-993.
- [6] 罗 雄, 胡瑞刚, 陈兰英, 等. 大鼠灌服炙甘草汤后甘草次酸药动学研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1580-1584.