

HPLC 同时测定银黄颗粒中 7 种有机酸及 4 种黄酮类成分

杨世艳¹, 何 兵^{2*}, 张 燕³

1. 泸州医学院附属中医医院, 四川 泸州 646000
2. 泸州医学院 药物研究中心, 四川 泸州 646000
3. 泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000

摘要: 目的 建立同时测定银黄颗粒中 7 种有机酸类成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和异绿原酸 A、B、C)和 4 种黄酮类成分(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素)的 HPLC 方法。方法 色谱柱为 AkzoNobel Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 分段变波长测定; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min。结果 11 种成分的线性关系均良好, 精密度、稳定性、重复性的 RSD 均低于 2%, 加样回收率为 97.35%~99.23%。结论 该方法简便、准确、灵敏, 可用于银黄颗粒质量标准提高研究。

关键词: HPLC; 银黄颗粒; 绿原酸; 异绿原酸; 黄芩苷; 黄芩素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0000-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.000

Simultaneous determination of seven organic acids and four flavonoids in Yinhuang Granules by HPLC

YANG Shi-yan¹, HE Bing², ZHANG Yan³

1. Hospital (TCM) Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China
2. Research Center for Drug, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China
3. Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Key words: HPLC; Yinhuang Granules; chlorogenic acid; isochlorogenic acid; baicalin; baicalein

银黄颗粒是《中国药典》2010 年版一部收载的品种, 由金银花提取物、黄芩提取物制成, 具有清热疏风、利咽解毒之功效, 临床用于外感风热、肺胃热盛所致的咽干、咽痛、喉核肿大、口渴、发热; 急慢性扁桃体炎、急慢性咽炎、上呼吸道感染^[1]。金银花提取物是从金银花中提取的有机酸类活性成分, 主要为绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和异绿原酸 A、B、C。黄芩提取物的主要活性成分为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素。药理研究表明异绿原酸类同绿原酸类均具有抗菌、抗病毒活性^[2], 而汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素也同样具有黄芩苷的部分药理活性^[3]。目前《中国药典》2010 年版及相关文献对银黄颗粒或银黄类制剂的质量控制主要为采用 HPLC 测定绿原酸和黄芩苷的量^[4-7],

而鲜有报道银黄颗粒中其他活性成分的定量检测。由于绿原酸类成分在储存过程中与其异构体之间会相互转化^[8], 黄芩苷类也会降解为其苷元黄芩素, 单以绿原酸及黄芩苷 2 种成分来衡量银黄颗粒的质量具有一定片面性, 故本实验采用 HPLC 法同时测定上述 11 种活性成分的量, 为更全面控制银黄颗粒的质量提供参考依据。

1 仪器与材料

DIONEX 高效液相色谱仪(包括 P680A 四元梯度泵, PDA—100 二极管阵列检测器, TCC—100 柱温箱和 Chromeleon 色谱工作站)。新绿原酸(批号 070915)、绿原酸(批号 080620)、隐绿原酸(批号 080923)、咖啡酸(批号 071026)、异绿原酸 A(批号 080530)、异绿原酸 B(批号 071129)、异绿

收稿日期: 2012-05-02

基金项目: 泸州市重点科技项目(泸市财企[2010]41号); 泸州医学院青年基金(泸医院[2010]108号)

作者简介: 杨世艳(1980—), 女, 住院医师, 研究方向为纳米脂质超声微泡。Tel: 13619045209 E-mail: lyssy2010@126.com

*通讯作者 何 兵 Tel: 13982770721 E-mail: lyhb2008@126.com

原酸 C (批号 071115) 均由成都普瑞法有限公司提供; 黄芩苷(批号 080721)、汉黄芩苷(批号 071008)、黄芩素 (批号 080316)、汉黄芩素 (批号 071215) 由成都曼思特生物科技有限公司提供; 所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法检测质量分数均在 98% 以上。银黄颗粒 (规格: 4 g/袋, 湖南爱生制药有限公司生产, 批号为 090902、091004、091118); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 AkzoNobel Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈, 梯度洗脱: 0~30 min, 5%~40% 乙腈; 30~40 min, 40%~80% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长: 分段变波长测定, 0~25 min 为 326 nm, 25~40 min 为 275 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和异绿原酸 A、B、C 及黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量, 以 75% 甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为

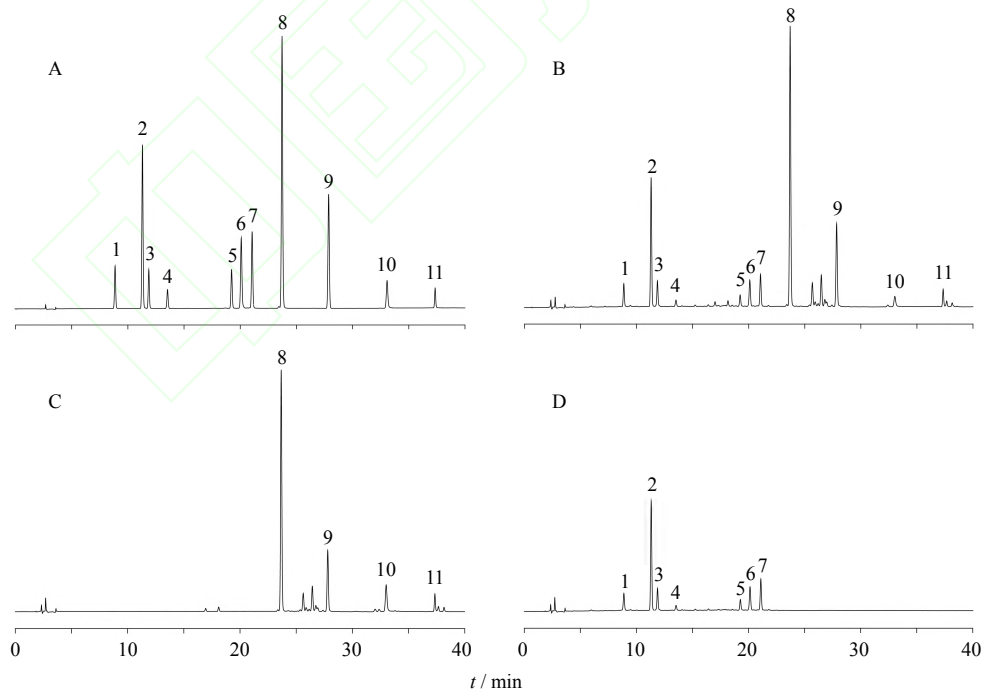
新绿原酸 0.519 mg/mL、绿原酸 1.938 mg/mL、隐绿原酸 0.510 mg/mL、咖啡酸 0.163 mg/mL、异绿原酸 A 0.764 mg/mL、异绿原酸 B 0.394 mg/mL、异绿原酸 C 0.812 mg/mL、黄芩苷 5.895 mg/mL、汉黄芩苷 1.264 mg/mL、黄芩素 0.286 mg/mL 及汉黄芩素 0.138 mg/mL 的对照品储备液; 分别精密量取 0.1、0.5、1、2、4、5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 以 50% 甲醇稀释至刻度, 制得系列对照品溶液, 避光保存。

2.2.2 供试品溶液 取银黄颗粒 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 超声处理 5 min, 滤过, 避光保存, 临用前 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 取按银黄颗粒工艺方法制备的缺金银花提取物、缺黄芩提取物的阴性对照样品, 按“2.2.2”项方法操作, 即得。

2.3 系统适应性及专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL, 按“2.1”项色谱条件分析, 结果见图 1。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和异绿原酸 A、B、C 及黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素与其相邻色谱峰的分度度均大于 1.5,



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-异绿原酸 B 6-异绿原酸 A 7-异绿原酸 C 8-黄芩苷 9-汉黄芩苷 10-黄芩素 11-汉黄芩素
1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-cafferic acid 5-isochlorogenic acid B 6-isochlorogenic acid A
7-isochlorogenic acid C 8-baicalin 9-wogonoside 10-baicalein 11-wogonin

图 1 混合对照品 (A)、银黄颗粒 (B) 和缺金银花提取物 (C)、缺黄芩提取物 (D) 阴性对照样品的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Yinhuang Granules (B), negative sample without *Lonicerae Japonicae Flos* extract (C), or negative sample without *Scutellariae Radix* extract (D)

拖尾因子在 1.00~1.10, 理论塔板数以各色谱峰计均在 30 000 以上。阴性对照在相应位置上未见色谱峰, 银黄颗粒中其他组分不干扰 11 种成分的测定, 方法专属性良好。

2.4 线性关系考察

在“2.1”项色谱条件下, 分别精密量取系列质

量浓度的混合对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程。同系列对照品制备方法逐级稀释, 分别以信噪比 3 和 10 标准考察检测限和定量限, 见表 1。

2.5 精密度试验

表 1 11 种成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of 11 components

成 分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/μg	检测限/ng	定量限/ng
新绿原酸	$Y=51.885\ 2\ X-0.197\ 3$	0.999\ 7	0.021~1.038	0.21	0.71
绿原酸	$Y=53.192\ 5\ X-0.375\ 9$	0.999\ 8	0.078~3.876	0.20	0.65
隐绿原酸	$Y=52.369\ 9\ X-0.281\ 2$	0.999\ 7	0.020~1.020	0.19	0.64
咖啡酸	$Y=92.458\ 4\ X-0.275\ 9$	0.999\ 5	0.007~0.326	0.12	0.41
异绿原酸 B	$Y=64.997\ 6\ X-0.197\ 9$	0.999\ 6	0.016~0.788	0.16	0.53
异绿原酸 A	$Y=65.741\ 7\ X-0.470\ 9$	0.999\ 6	0.031~1.528	0.17	0.56
异绿原酸 C	$Y=65.356\ 4\ X-0.380\ 5$	0.999\ 7	0.032~1.624	0.16	0.55
黄芩苷	$Y=30.473\ 4\ X-0.235\ 2$	0.999\ 8	0.236~11.790	0.35	1.16
汉黄芩苷	$Y=66.169\ 8\ X-0.278\ 9$	0.999\ 6	0.051~2.528	0.39	1.31
黄芩素	$Y=93.294\ 9\ X+0.191\ 8$	0.999\ 5	0.011~0.572	0.38	1.28
汉黄芩素	$Y=94.963\ 1\ X+0.296\ 0$	0.999\ 5	0.006~0.276	0.22	0.74

取混合对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下, 连续进样 6 次, 分别计算各组分色谱峰峰面积 RSD, 结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.16%、0.33%、0.50%、0.41%、0.49%、0.38%、0.25%、0.37%、0.46%、0.57%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取本品 (批号 090902) 的供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、24、36 h 注入液相色谱仪, 测定各组分的量。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素峰面积 RSD 分别为 0.91%、0.76%、0.85%、1.26%、1.16%、1.07%、1.01%、0.86%、1.02%、1.50%、1.73%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号为 090902 的样品, 照“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及

汉黄芩素平均质量分数分别为 0.258 8、1.444 9、0.309 1、0.048 2、0.112 5、0.269 6、0.316 1、5.854 0、0.859 6、0.101 0、0.103 5 mg/g, RSD 分别为 0.68%、0.55%、0.72%、1.07%、0.92%、0.86%、0.77%、0.49%、0.81%、1.13%、1.35%, 表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密称取批号为 090902 已知质量分数的银黄颗粒 9 份, 每份 1.0 g, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别精密添加含新绿原酸 0.104 mg/mL、绿原酸 0.579 mg/mL、隐绿原酸 0.125 mg/mL、咖啡酸 0.019 mg/mL、异绿原酸 B 0.045 mg/mL、异绿原酸 A 0.108 mg/mL、异绿原酸 C 0.128 mg/mL、黄芩苷 2.340 mg/mL、汉黄芩苷 0.344 mg/mL、黄芩素 0.040 mg/mL 及汉黄芩素 0.041 mg/mL 的混合对照品溶液 2.0、2.5、3.0 mL, 照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 并分别计算回收率。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的平均回收率分别为 98.43%、99.23%、98.69%、97.70%、98.60%、98.57%、98.83%、99.15%、98.52%、97.60%、97.35%。RSD

分别为 0.84%、0.76%、0.85%、1.25%、1.03%、0.97%、0.87%、0.62%、0.73%、1.47%、1.69%。试验结果表明, 本法具有良好的回收率。

2.9 样品的测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 10

μL, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的峰面积, 并用外标法计算其含量, 结果见表 2。

表 2 银黄颗粒中 11 种成分测定结果 (n=3)
Table 2 Determination of 11 components in Yinhuang granules (n=3)

批 号	质量分数 / (mg·g ⁻¹)										
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
090902	0.259	1.445	0.309	0.048	0.113	0.270	0.316	5.854	0.860	0.101	0.104
091004	0.203	1.167	0.250	0.033	0.088	0.195	0.262	4.660	0.590	0.117	0.069
091118	0.215	1.232	0.263	0.037	0.104	0.233	0.301	4.976	0.624	0.246	0.103

3 讨论

采用二极管阵列检测器在 190~380 nm 分别扫描混合对照品溶液中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素色谱峰的紫外吸收, 其最大吸收波长分别为 325.1、326.2、326.3、323.9、325.1、327.9、327.4、278.0、274.5、276.2、275.4 nm。为使各成分均在其最大吸收波长下进行测定, 提高分析方法的灵敏度, 采用分段变波长检测法对此 11 种化学成分进行测定, 根据各成分保留时间差异, 在 0~23 min 设定检测波长为 326 nm, 以测定绿原酸类有机酸, 在 23~40 min 设定检测波长为 275 nm, 以测定黄芩苷类。但实验发现由于黄芩苷的量较高, 紫外吸收较强, 若黄芩苷以 275 nm 测定, 其色谱峰较高, 使其他色谱峰相对较低, 不利于色谱图的整体输出显示, 故黄芩苷仍以测定绿原酸的 326 nm 测定, 同时变波长时间点改为 25 min, 其峰高合适。

目前《中国药典》^[1]及国内文献对于金银花提取物和黄芩提取物及其制剂, 其质量控制普遍采用 HPLC 测定绿原酸和黄芩苷的量^[4-7], 由于绿原酸类成分在储存过程中与其异构体之间会相互转换, 特别是绿原酸的量会有所下降, 黄芩苷类也会降解为其苷元黄芩素。单以绿原酸和黄芩苷来衡量其质量具有一定片面性, 故本实验采用 HPLC 同时测定银黄颗粒中 7 种绿原酸类有机酸和 4 种黄芩苷类黄酮

的量。该方法较《中国药典》方法更科学合理, 也为含金银花提取物和黄芩提取物制剂质量标准的提高研究提供参考依据。

《中国药典》2010 年版规定金银花尚需测定木犀草苷, 但木犀草苷本身的量甚微, 紫外吸收不强, 且以绿原酸的量为指标的提取纯化方法, 在提取过程中, 木犀草苷等黄酮类可能已损失, 经测定待测 3 批银黄颗粒中并不含木犀草苷, 故并将其列入同时测定项。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 李祖晟, 朱志安. 二咖啡酰奎宁酸药理实验研究进展 [J]. 医学综述, 2004, 10(4): 249-251.
[3] 李 敏, 杨瑞芳. 黄芩药理学研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(1): 137-138.
[4] 张 婷, 美尔哈巴·热西提, 林 潇, 等. HPLC-MS/MS 法测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 711-713.
[5] 郑敏霞, 诸葛周, 戴德雄, 等. HPLC 法测定银黄滴丸中绿原酸和黄芩苷 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1138-1140.
[6] 林 宏, 孙燕燕, 薛士荣, 等. HPLC 法测定清化丸中绿原酸和黄芩苷 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1141-1143.
[7] 王玲玲, 王 凌, 杨 菲, 等. RP-HPLC 测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 126-126.
[8] 陈 钢, 侯世祥, 胡 平, 等. 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 223-226.