

HPLC 同时测定双黄连注射剂中氯原酸和黄芩苷 2 种指标成份含量

张华年 杨少芳 陈继业 宋新文(武汉 430016 武汉市儿童医院)

摘要 目的:探讨双黄连注射液 2 种指标成分含量的测定方法,控制其质量。方法:应用甲醇-水溶液(磷酸调 pH 至 2.7)为流动相,在 ODS C_{18} 柱上梯度洗脱,外标法定量,绿原酸和黄芩苷 2 种指标成分含量可以同时定量。结果:3 批样品中氯原酸的含量分别为 0.70%,0.74%和 0.75%(mg/mg),黄芩苷的含量分别为 10.67%,10.25%和 11.38%(mg/mg)。结论:该方法简便、快速、灵敏,适合于双黄连粉针剂的质量控制。

关键词 双黄连;绿原酸;黄芩苷;高效液相色谱法

Determination of chlorogenic acid and baicalin in Shuanghuanglian injection by HPLC

Zhang Huanian(Zhang HN), Yang Shaofang(Yang SF), Chen Jiye(Chen JY), *et al*(Children's Hospital of Wuhan, Wuhan 430016)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To develop a method for the determination of chlorogenic acid and baicalin in Shuanghuanglian injection, to control its quality. **METHOD:** The column was packed with ODS C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm). Methanol-water (pH 2.7) was used as mobile phase. Chlorogenic acid and baicalin were separated by HPLC with gradient elution. **RESULTS:** The content of chlorogenic acid in Shuanghuanglian injection was 0.70% ~ 0.75% (mg/mg), and that of baicalin was 10.25% ~ 11.38% (mg/mg). **CONCLUSION:** The method was rapid, convenient and accurate, and is suitable for the quality control of Shuanghuanglian injection.

双黄连注射剂是供注射用的中药粉针剂,由金银花、黄芩和连翘组成,主要成份为氯原酸、黄芩苷和连翘苷,质量控制多采用黄芩苷和/或氯原酸作为指标,含量测定的方法有紫外分光光度法和 HPLC^[1-3]。本文通过优化色谱条件,同时测定制剂中氯原酸和黄芩苷含量,方法简便、快速和准确,为该制剂工艺研究和质量控制提供了有价值的手段。

1 仪器、材料和药品

HP1100 系列高效液相色谱仪(美国惠普公司),可变紫外波长检测器、7725 进样器。

绿原酸、黄芩苷化学对照品(归一化法测定纯度均为 99 %以上,中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,磷酸为优级纯,水为重蒸馏水。

双黄连粉针(哈尔滨中药二厂,批号:970601,970813 和 970513)。

2 色谱条件

色谱柱为 ODS- Hypersil 卡套柱(5μm,150mm×4.6mm),柱前加保护柱(5μm,4mm×4mm);流动相:A- 甲醇,B- 水,洗脱梯度 0~8min,A30 %,8~9min A30 %~40 %,9~19min,A40 %~50 %,流速 1ml/min,柱温 30℃,检测波长 326nm,进样量 10μl。其分离色谱见图 1~3。

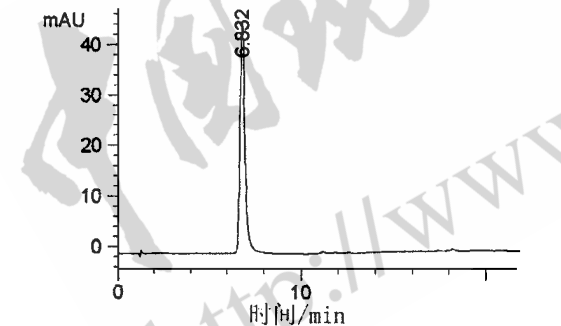


图 1 绿原酸化学对照品 HPLC 图

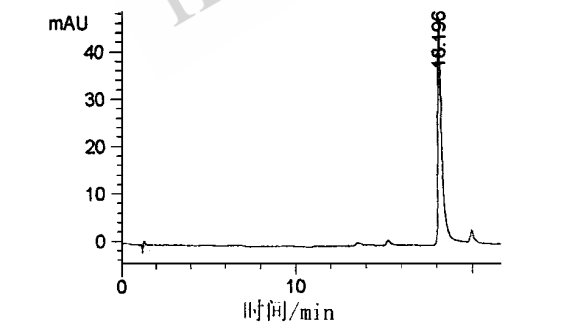


图 2 黄芩苷化学对照品 HPLC 图

3 标准溶液的配制

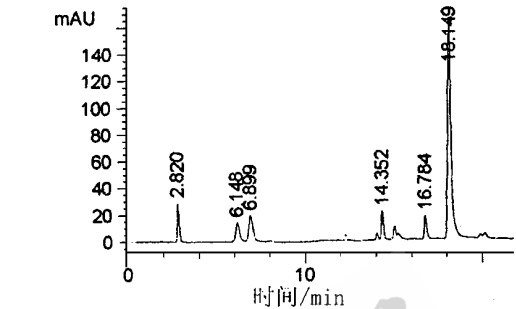


图 3 样品 HPLC 图

精密称取绿原酸对照品 11.6mg 置棕色量瓶中,加甲醇溶解定容至 50ml,黄芩苷对照品 49.0mg 加甲醇溶解定容至 100ml,配制浓度分别为 0.23 和 0.49mg/ml 的贮备液,置冰箱低温保存。

4 线性关系考察

精密量取上述贮备液适量,以甲醇稀释成系列标准溶液,按上述色谱条件进行测定。绿原酸在 9.28~37.12μg/ml 浓度范围内呈线性关系;黄芩苷在 9.82~58.92μg/ml 浓度范围呈线性关系。回归方程分别为:
 $A_{\text{绿原酸}} = 31.03 C - 14.3, r = 0.9996$
 $A_{\text{黄芩苷}} = 29.07 C - 16.2, r = 0.9997$ 。

5 加样回收率测定

精密称取已知含量双黄连粉针样品 30mg,分别加入绿原酸和黄芩苷贮备液,绿原酸的加样量分别为 0.16 和 0.23mg,黄芩苷的加样量分别为 0.68 和 0.34mg,加 50 %甲醇溶解,定容至 100ml。按上述色谱条件进样测定,外标法计算含量,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

	样品原含量/mg	加样量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.23	0.16	0.391±0.002	100.6	1.7
	0.23	0.23	0.461±0.008	100.4	2.5
黄芩苷	3.20	0.68	3.879±0.014	99.6	2.1
	3.20	0.34	3.541±0.007	100.3	1.9

6 精密度试验

取上述加样样品溶液每份隔 2h 测定 1 次,共 6 次,隔日测定 1 次,共 3d。日内、日间 RSD 绿原酸分别为 3.45 %和 5.43 %,黄芩苷 2.4 %和 5.1 %。

7 灵敏度测定

按色谱峰信噪比(S/N)为 3 作为检测下限,进样 10μl,结果显示绿原酸的最低检测限为 5ng。

8 样品测定

精密称取双黄连粉针 30mg 3 份,分别用 50 %甲醇溶解,定容至 100 ml,其余操作同加样回收率测定项,结果见表 2。

表 2 双黄连粉针样品测定结果(mg/ mg , $n = 3$)

	绿原酸/ %	RSD/ %	黄芩苷/ %	RSD/ %
970513	0.75	1.6	10.67	1.6
970601	0.70	2.1	11.38	2.2
970817	0.74	2.7	10.25	1.8

9 讨 论

9.1 样品中绿原酸的含量相对较低,约为黄芩苷含量的 6.5 %左右,绿原酸的最大吸收波长为 326nm;黄芩苷的含量相对较高,在 276 和 315nm 处有最大吸收。因此,选择绿原酸的最大吸收波长 326nm 作为检测波长,可以提高绿原酸的灵敏度。

9.2 绿原酸的 HPLC 测定,其流动相有磷酸盐-甲醇

(75: 25)、甲醇-水-冰醋酸-三乙醇(15: 85: 1: 0.1) 系统^[2,4]。在我们实验中发现流动相采用甲醇-水(用 10 %磷酸调节 pH 至 2.7)系统,绿原酸和黄芩苷峰均与其它组分离良好,并且能减少磷酸盐对泵的侵蚀等,延长泵的使用寿命。

参考文献

- 1 栾士香.系数倍率法测定双黄连注射液中黄芩苷、绿原酸、连翘甙的含量.中国中药杂志,1991,16(10): 602.
- 2 华菊根,胡立君,李国忱.注射用双黄连质量标准的研究.中成药,1996,18(11): 13.
- 3 何心,冯毅,石耀辉.高效液相色谱法测定双黄连粉针中黄芩甙和绿原酸的含量.中国药房,1997,8(5): 229.
- 4 张丹,李章万,姜焱.HPLC 测定金银花、茵陈及其 10 种中成药中绿原酸的含量.药物分析杂志,1996,16(2): 83.

收稿日期:1998 - 10 - 19