

HPLC 同时测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量

黄雄, 黄嫒, 黄佳, 王峻 (嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要:目的 建立同时测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷含量的高效液相色谱方法。方法 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相为 0.1%磷酸(A)-乙腈 (B); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 梯度洗脱; 检测波长为 327 nm。结果 绿原酸在 0.021 ~ 2.1 μg 内线性关系良好($r=0.999\ 8$); 黄芩苷在 0.038 ~ 3.800 μg 内线性关系良好($r=0.999\ 6$)。绿原酸、黄芩苷平均加样回收率为 99.70%, 99.06%, RSD 分别为 0.75%和 1.02%。结论 所建立的方法简便、准确可以同时测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量。

关键词:高效液相色谱法; 银黄颗粒; 绿原酸; 黄芩苷

中图分类号: R917.101

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0417-03

Simultaneously Determination of Chlorogenic Acid and Baicalin in Yinhuang Granules by HPLC

HUANG Xiong, HUANG Xuan, HUANG Jia, WANG Jun (*Medical College of Jiaxing University, Jiaxing 314001, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop an HPLC method for the simultaneously determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang granules. **METHODS** HPLC was carried out, using Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column set at 30 °C, the acetonitrile-0.1% H₃PO₄ as mobile phase(using gradient) with flowing rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 327 nm. **RESULTS** The method had good linear relationship within the range of 0.021~2.1 μg ($r =0.999\ 8$) for chlorogenic acid and 0.038~3.800 μg ($r =0.999\ 6$) for baicalin,respectively. The results of the average recovery were 99.70% (RSD=0.75%) and 99.06% (RSD=1.02%). **CONCLUSION** The method established was simple and accurate and can be used to simultaneously determine chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang granules.

KEY WORDS: HPLC; Yinhuang granules; chlorogenic acid; baicalin

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。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 分别测定银黄颗粒及相关制剂中绿原酸和黄芩苷的含量^[1-5]及利用可变波长法同时测定这二种成分的含量^[6],但对银

黄颗粒中黄芩苷和绿原酸采用同一吸收波长同时进行测定的文献报道相对较少,本实验建立了利用梯度洗脱的方法,在同一波长下同时对绿原酸和黄芩苷的含量进行测定,方法简单易行,可以缩短分析时间。并利用建立的分析方法对不同厂家银黄颗粒中的指标成分的含量进行了比较,有利于更好的控制银黄颗粒制剂的质量。

作者简介: 黄雄, 男, 讲师, 硕士

Tel: (0573)83643865

E-mail: huangxionghx@163.com

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 四元泵 (美国 Agilent 公司); 电子分析天平 (北京赛多利斯公司); 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MILLI-Q 超纯水仪 (MILLIPORE 公司)。

绿原酸 (sigma 公司, 含量大于 95%); 黄芩苷对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号为 110715-200815, 含量大于 98%); 黄芩、金银花提取物 (自制); 银黄颗粒 (分别来自南京易亨、湖南三九南开、广东环球制药公司); 乙腈为色谱纯;

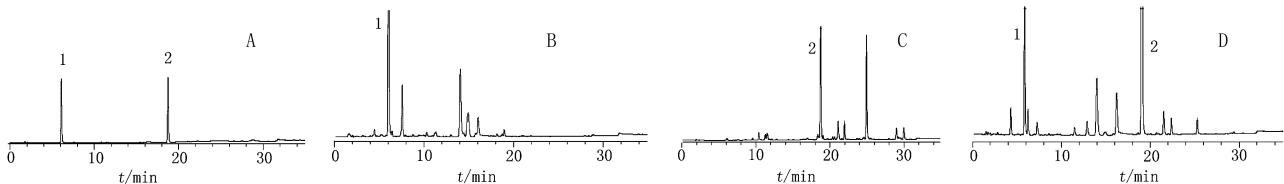


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-阴性对照(缺黄芩提取物); C-阴性对照(缺金银花提取物); D-银黄颗粒; 1-绿原酸; 2-黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference standard; B-negative sample(without *Scutellaria baicalensis* extract); C- negative sample(without *Flos Lonicerae* extract); D- Yinhuang granules; 1-chlorogenic acid; 2-baicalin

2.2 对照品溶液制备

分别精密称取 4.2 mg 绿原酸、7.6 mg 黄芩苷对照品, 各自用甲醇溶解, 最后制成每 1 mL 中分别含 0.21 mg 绿原酸和 0.38 mg 黄芩苷的混合对照品溶液, 即得备用。

2.3 供试品溶液的制备

取银黄颗粒, 研成细粉, 精密称取约 0.2 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL 溶解, 称定重量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称重, 补足损失的溶剂重量。摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性供试液的制备

按银黄颗粒的处方分别制备不含黄芩提取物和不含金银花提取物的阴性样品, 按供试品溶液的制备项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 线性范围

精密称取绿原酸对照品和黄芩苷对照品各适量, 加甲醇使溶解并稀释制成系列浓度的溶液, 分别精密吸取上述溶液各 10 μ L, 按上述色谱条件注入液相色谱仪, 以峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标, 绘制标准曲线得回归方程分别为绿原酸: $Y=3\ 091.1X+6.666\ 7$, $r=0.999\ 8$; 黄芩苷 $Y=1\ 196.8X+18.857$, $r=0.999\ 6$; 结果表明: 绿原酸在 0.021 ~ 2.10 μ g 内, 黄芩苷在 0.038 0 ~ 3.80 μ g 内, 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4. 6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1% 磷酸(A) - 乙腈 (B); 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 梯度洗脱, 0~7 min, 10%B $\rightarrow$ 23%B; 7 ~ 20 min, 23%B $\rightarrow$ 35%B; 20 ~ 35 min, 35%B $\rightarrow$ 70%B, 检测波长为 327 nm。上述色谱条件下, 对照品、阴性制剂及样品的色谱图见图 1。

2.6 重复性试验

精密称取 5 份同一批号银黄颗粒样品约 0.2 g, 按上述方法制备供试品溶液, 精密吸取各溶液 10 μ L 按上述色谱条件注入液相色谱仪, 测定绿原酸和黄芩苷的含量, 计算含量的 RSD 分别为 1.23% 和 0.89%, 说明本方法重复性好。

2.7 仪器精密度试验

精密吸取对照品溶液的混合液 10 μ L 进样, 重复进样 5 次, 记录绿原酸、黄芩苷的峰面积, 其 RSD 分别为 0.65 %, 1.23%, 表明仪器精密度良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批号的样品 (南京 0804212) 适量, 共 5 份, 再分别加入绿原酸对照品和黄芩苷对照品适量, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别进样 10 μ L, 并按外标法以面积计算绿原酸和黄芩苷实际含量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n=5)

Tab 1 Results of recovery tests (n=5)

化合物	样品含量/mg	加入量 / mg	测得总量/ mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
绿原酸	0.326 3	0.420	0.747 3	100.23	99.70	0.75
	0.338 9	0.420	0.758 3	99.85		
	0.283 5	0.420	0.700 3	99.23		
	0.300 7	0.336	0.722 9	100.53		
	0.323 0	0.336	0.737 5	98.68		
黄芩苷	4.251	2.23	6.493	100.56	99.06	1.02
	4.416	2.23	6.599	97.89		
	3.693	2.23	5.902	99.08		
	3.918	2.85	6.724	98.45		
	4.208	2.85	7.309	99.32		

2.9 样品的测定

按供试品溶液制备方法和色谱条件,对3个不同厂家的银黄颗粒样品进行含量分析,结果表明不同厂家生产的银黄颗粒产品的指标性成分含量存在一定的差异性,见表2。

表2 样品中绿原酸和黄芩苷的含量测定(n=3)

Tab 2 Determination of chlorogenic acid and baicalin in samples (n=3)

厂家产地	生产批号	绿原酸/mg·g ⁻¹	黄芩苷/mg·g ⁻¹
湖南长沙	20071201	0.852 7	6.495
	20071210	0.718 2	7.600
江苏南京	0804212	3.323	43.29
	0803181	3.104	41.91
广东中山	20080502	4.670	64.63
	20080416	4.767	68.02

3 讨论

3.1 黄芩苷的最大吸收波长是 278 nm, 而绿原酸的最大吸收波长是 327 nm, 由于黄芩苷含量远高于绿原酸含量, 实验结果表明黄芩苷在 327 nm 和 278 nm 检测结果差别不甚明显。为了能在同一波长下同时检测绿原酸和黄芩苷, 因此本实验选择 327 nm 为检测波长。

3.2 在试验过程中对供试品溶液的处理方法进行了考察, 通过对不同的提取溶剂、提取方法和提取时间进行了比较试验, 最终确定用 50% 甲醇超声处理 30 min 为最佳方法。

3.3 不同厂家银黄颗粒产品中指标成分绿原酸和

黄芩苷含量存在较大的差异, 其原因可能与投入的金银花及黄芩药材的内在质量和投药量有关, 也可能与不同厂家的生产工艺有关, 这给临床应用的给药量和疗效带来很大的影响, 因此有必要对市场上的银黄颗粒产品建立一定的质量控制体系。

REFERENCES

[1] WEI Q,KANG H Y.Determination of chlorogenic acid in Yinhuang particle by HPLC[J].Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2007,18(7):1689-1690.

[2] WANG C F,ZHANG N,HUANG L,et al.Determination of content for baicalin in Yinhuang granules from different pharmaceutical factories by HPLC [J]. J Med Forum (医药论坛杂志), 2006, 27(24):27-28.

[3] WANG Q X,WANG Y,DING G Z,et al.Determination of content the chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang capsules by RP-HPLC [J].Chin Pharm (中国药师), 2007, 10(1): 48-49.

[4] WANG L C,CAO Y H,XU H L,et al.Study on quality control and fingerprint of Chinese traditional medicine Yinhuang oral liquid[J].Chin J Chromatogr(色谱),2007, 24(4): 367-372.

[5] LI Y Q,LIU J S.Determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang granules by HPLC[J].Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践),2004,18(5):45-47.

[6] Yang K D,Wang L J,Long Y F.Determination of content the chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang granules by high-performance liquid chromatography process variable wavelength[J].Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2007, 27(7):992-993.