

UPLC 测定银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、 汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 6 种成分

张建伟¹, 赵倩^{2,3}, 何希荣², 冯伟红^{2,3*}

(1. 河南中医学院第二附属医院 河南省中医院肾内科, 郑州 450002;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

3. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立采用 UPLC 同时测定银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 6 种成分含量的方法。方法: 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸水梯度洗脱, 在 326 nm 波长处进行检测。结果: 绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的线性关系良好, 加样回收率分别为 96.34% (RSD 0.90%), 101.4% (RSD 1.53%), 95.64% (RSD 1.34%), 98.01% (RSD 1.72%), 98.61% (RSD 1.96%), 102.7% (RSD 1.42%)。结论: 该方法简便、快速, 分离效果好, 可为全面控制银黄颗粒的质量提供参考。

[关键词] 超高压液相色谱; 银黄颗粒; 绿原酸; 咖啡酸; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0050-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180050

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1445.003.html>

[网络出版时间] 2014-07-22 14:45

Simultaneous Determination of Six Flavones in Yinhuang Granule by UPLC

ZHANG Jian-wei¹, ZHAO Qian^{2,3}, HE Xi-rong², FENG Wei-hong^{2,3*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Department of Nephrology of Henan TCM Hospital, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology
of Chinese Herbal Medicines, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** This study was aimed to develop an UPLC method to determine the contents of chlorogenic acid, caffeic acid, baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin in Yinhuang granule. **Method:** Six active components were separated on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) eluted with acetonitrile and water containing 0.2% phosphoric acid as mobile phases in a linear gradient mode. The detection wavelength was set at 326 nm. **Result:** The linear ranges were 0.000 107-0.107 μg for chlorogenic acid, 0.000 244-0.244 μg for caffeic acid, 0.000 272-0.272 μg for baicalin, 0.000 059 0-0.059 0 μg for wogonoside, 0.000 053 0-0.053 μg for baicalein, 0.000 051 0-0.051 μg for wogonin, respectively. The average recoveries of the six components were 96.34% (RSD 0.90%), 101.4% (RSD 1.53%), 95.64% (RSD 1.34%), 98.01% (RSD 1.72%), 98.61% (RSD 1.96%), 102.7% (RSD 1.42%), respectively.

Conclusion: The method was proven to be simple, accurate, reliable and can be used for quality control of the six

[收稿日期] 20140401(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005, 2009ZX09308-003)

[第一作者] 张建伟, 副主任医师, 从事中西医结合医药防治肾脏疾病的研究, Tel: 13838006352, E-mail: jianwei1026@126.com

[通讯作者] * 冯伟红, 副研究员, 从事中药质量控制研究, Tel: 13671138637, E-mail: weihong_bj@126.com

flavones in Yinhuang granule.

[**Key words**] UPLC; Yinhuang granule; chlorogenic acid; caffeic acid; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin

银黄颗粒为2010年版《中国药典》一部收录品种,为纯中药制剂,抗菌谱广,无耐药性及交叉耐药性,安全可靠,疗效确切。银黄颗粒由金银花和黄芩2味中药提取物组成,方中金银花清热解毒,为君药,辅以泻实火除湿热之黄芩,两药合用,起清热、解毒、消炎之效,共奏抗菌、抗病毒之功。目前临床主要用于治疗外感风热、肺胃热盛所致的咽干、咽痛、喉核肿大、口渴、发热,及慢性扁桃体炎、急慢性咽炎、上呼吸道感染见上述证候者^[1]。

已有研究表明,银黄颗粒的广谱抗菌、抗病毒、抗变态反应及抗炎作用是由金银花中所含的咖啡酸、绿原酸、异绿原酸、木犀草素,以及黄芩中所含的黄酮类化合物黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、汉黄芩苷共同作用的结果。体外试验也表明,银黄颗粒对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、百日咳杆菌、大肠埃希菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌、副伤寒杆菌、绿脓杆菌、脑膜炎双球菌等革兰阴性菌均有杀灭作用,对呼吸道合胞病毒、流行性腮腺炎病毒、单纯性疱疹病毒等都有抑制作用。大量临床应用亦表明,银黄颗粒对急性炎症有明显抑制,同时具有明显促进炎症细胞吞噬功能、抗过敏性介质释放、清热、解毒、消炎作用。因此,银黄颗粒又被公认为“中药抗生素”。

目前对银黄颗粒(或其他剂型)的质量控制多采用HPLC,主要为:①以黄芩苷和绿原酸为检测指标,分别控制黄芩提取物和金银花提取物的质量^[2];②对绿原酸和黄芩苷进行同步检测^[3-7];③对4种黄芩黄酮(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素)类成分进行同步检测^[8]。这几种测定方法所得结果均较为单一,难以全面评价银黄颗粒的药效和质量。故本实验采用UPLC,建立了银黄颗粒中的主要药效成分绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素6种成分同步测定的方法,为银黄颗粒质量控制提供更多的实验依据。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪(美国Waters公司,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower³色谱工作站),XS205型分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 对照品 绿原酸(批号110753-200413)、咖啡

酸(批号110885-200102)、黄芩苷(批号110715-201016)、黄芩素(批号111595-200905)购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用。汉黄芩苷(批号H-019-110325)、汉黄芩素(批号S-036-110407)购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均>98%。

1.3 样品 银黄颗粒为市售商品。分别为①贵州富华药业有限责任公司(批号20110507),②广州嘉禾制药有限公司(批号100712,100806),③江西济民可信药业有限公司(批号110202,110108,110301,110501),④天津太平洋制药有限公司(批号101101),⑤中山市中智制药有限公司(批号20100914),⑥四川锡城药业有限公司(批号10090103),⑦河北国金药业有限责任公司(批号1009292,1006131),⑧保和堂(焦作)制药有限公司(批号20090202),⑨灵宝市豫西药业有限责任公司(批号0911207)。

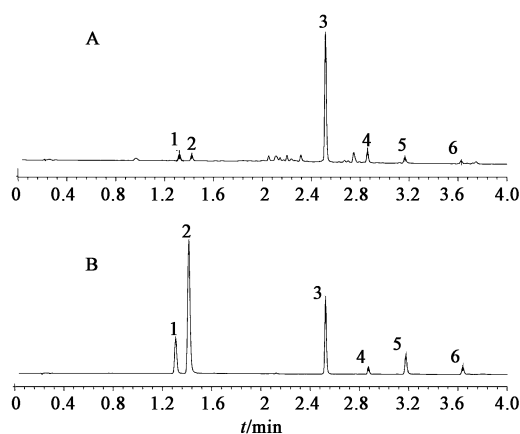
1.4 试剂 乙腈为HPLC级(美国Fisher公司),水为超纯水(Milli-Q Advantage A10型超纯水系统,美国密理博公司),磷酸为AR级(北京化工厂),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.2%磷酸(B)梯度洗脱(0~1.02 min,5%~15% A;1.02~1.36 min,15%~20% A;1.36~1.5 min,20%~25% A;1.5~2.0 min,25%~30% A;2.0~3.74 min,30%~55% A;3.74~5 min,55%~65% A),流速0.613 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长326 nm,进样量2 μL。对照品、供试品色谱见图1。

2.2 供试品溶液的制备 取本品内容物,研为细粉,取约0.2 g,精密称定,加入50%甲醇25 mL,超声处理30 min,放冷,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素对照品适量,加甲醇制成每1 mL中分别含上述对照品10.7,24.4,27.2,5.9,5.3,5.1 μg的溶液,作为混合对照品溶液①,备用。精密吸取混合对照品溶液①1 mL置10 mL量瓶中,加50%甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液②,即得。



A. 供试品; B. 混合对照品;
1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 黄芩苷;
4. 汉黄芩苷; 5. 黄芩素; 6. 汉黄芩素

图1 银黄颗粒 UPLC

2.4 线性关系的考察 分别精密吸取 2.3 项下的混合对照品溶液① 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL 及混合对照品溶液② 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μL , 注入 UPLC, 测定峰面积。采用最小二乘法, 以被测物的进样量与峰面积的积分值进行线性回归。结果表明, 6 种待测成分在如下进样范围内线性关系良好, 见表 1。

表1 6种待测成分的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/ ng
绿原酸	$Y = 4.84 \times 10^6 X + 1.36 \times 10^3$	0.999 4	0.107 ~ 107
咖啡酸	$Y = 9.05 \times 10^6 X + 899.09$	0.999 9	0.244 ~ 244
黄芩苷	$Y = 3.14 \times 10^6 X - 245.05$	1.000 0	0.272 ~ 272
汉黄芩苷	$Y = 1.52 \times 10^6 X - 89.78$	0.999 9	0.059 ~ 59
黄芩素	$Y = 5.50 \times 10^6 X - 836.75$	0.999 9	0.053 ~ 53
汉黄芩素	$Y = 2.26 \times 10^6 X - 229.43$	0.999 8	0.051 ~ 51

2.5 精密度试验 精密吸取同一份银黄颗粒(100712)供试品溶液 2 μL , 连续进样 6 次, 测定绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积, 计算 RSD。结果上述 6 种待测成分峰面积的 RSD 分别为 0.61%, 0.69%, 0.16%, 2.0%, 0.32% 和 1.8%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批银黄颗粒(100712)粉末约 0.2 g, 精密称定, 平行 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积并计算含量及 RSD。结果银黄颗粒中上述 6 种待测成分的质量分数分别为 0.099 0, 0.053 5, 3.09, 0.611, 0.176, 0.135 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.56%, 0.60%, 0.92%, 2.5%,

0.24%, 2.2%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份银黄颗粒(100712)供试品溶液, 分别于制备后的第 0, 2, 4, 6, 9, 24 h 进样, 测定绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积并计算 RSD。结果上述 6 种待测成分峰面积的 RSD 分别为 0.23%, 0.45%, 0.31%, 1.5%, 1.7%, 1.9%, 结果表明 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.8 加样回收试验 取已知含量的银黄颗粒(100712)粉末约 0.1 g, 精密称定, 平行 6 份, 分别按样品含量-对照品加入量大致(1:1)的比例加入对照品溶液, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定并计算绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的加样回收率及 RSD。结果见表 2。

表2 银黄颗粒中黄酮类成分加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
绿原酸	0.101 4	0.010 04	0.010 5	0.020 2	96.34	0.90
咖啡酸	0.101 5	0.005 43	0.005 51	0.011 0	101.4	1.53
黄芩苷	0.101 4	0.313	0.306	0.606	95.64	1.34
汉黄芩苷	0.101 4	0.061 9	0.066 8	0.127	98.01	1.72
黄芩素	0.101 4	0.017 8	0.018 2	0.035 8	98.61	1.96
汉黄芩素	0.101 4	0.013 7	0.015 5	0.029 7	102.7	1.42

2.9 含量测定 分别取 9 个不同厂家 14 个批号的银黄颗粒约 0.2 g, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 2 μL , 测定供试品溶液中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的峰面积, 采用标准曲线法计算含量, 测定结果见表 3。

3 讨论

本实验参考相关文献, 采用乙腈-0.2% 磷酸水的流动相系统, 对不同的梯度洗脱条件下待测成分色谱峰的分离度、对称性、拖尾因子、出峰时间以及色谱峰纯度等多方面进行了综合比较, 最终优选出文中所用的梯度洗脱程序, 在该条件下, 供试品溶液中待测成分的分离获得满意效果, 各项含量测定的方法学考察均符合要求。

实验中采用二极管阵列检测器, 在 190 ~ 400 nm 波长处对 6 种待测成分进行了紫外全波长扫描, 测定结果显示绿原酸在 218, 241, 326 nm 有明显吸收峰; 咖啡酸在 218, 241, 323 nm 有明显吸收峰; 黄芩苷在 215, 277, 316 nm 有明显吸收峰; 汉黄芩苷在 274 nm 有明显吸收峰; 黄芩素在 215, 275, 323 nm

表3 不同生产厂家银黄颗粒中6种成分含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

厂家	批号	绿原酸	咖啡酸	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
1	20110507	1.74	0.343	17.4	0.109	0.534	0.186
2	100712	0.099 0	0.053 5	3.09	0.611	0.176	0.135
2	100806	0.085 2	0.048 4	2.42	0.465	0.231	0.119
3	110202	4.58	0.557	42.3	1.56	1.68	0.238
3	110108	4.44	0.578	42.3	1.45	1.32	0.199
3	110301	4.32	0.344	43.2	1.19	1.27	0.189
3	110501	4.44	0.422	44.0	2.11	1.04	0.203
4	101101	2.18	0.457	19.9	0.118	0.574	0.142
5	20100914	0.879	0.216	15.1	0.041 5	0.392	0.060 6
6	10090103	0.763	0.188	4.41	0.0291	0.098 8	0.024 9
7	1009292	0.692	0.043 6	16.8	0.125	0.512	0.142
7	1006131	0.630	0.068 8	17.2	0.182	0.467	0.142
8	20090202	1.41	0.313	14.7	0.397	1.07	0.290
9	0911207	0.257	0.037 1	2.73	0.050 0	0.046 4	0.015 6

有明显吸收峰;汉黄芩素在 275 nm 有明显吸收峰, 320 nm 附近有肩峰;根据全波长扫描结果及样品分离情况,笔者选择上述 6 个成分均有明显吸收峰或肩峰的 326 nm 作为检测波长,此波长条件下,各待测成分达到基线分离,色谱峰纯度检测合格,符合含量测定要求。

实验中分别比较了不同体积分数的甲醇(40%,50%,60%,75%,100%)、不同的溶媒用量(20,25,30 mL)、不同的提取方法(超声、冷浸和回流)以及不同的提取时间(20,30,40 min)对测定结果的影响。为兼顾水溶性和脂溶性成分的同步检测,经过综合比较,确定以 50% 甲醇 25 mL 为溶媒,超声提取 30 min 的供试品溶液制备方法。

本实验采用 Waters 公司的 ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱系统和 ACQUITY UPLC BEH C₁₈1.7 μm 色谱柱对银黄颗粒供试品溶液进行色谱分离,可在 4 min 内实现对该制剂中金银花和黄芩 2 种提取物中 6 种不同化合物(有机酸和黄酮)的同步检测。实验结果体现了 UPLC 具有的高分离效率,同时所建立的分离方法能够和 HPLC 系统进行无缝转换,有利于方法的实际应用。

本文采用 UPLC 对 14 批不同生产厂家和批号的银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄

芩素和汉黄芩素 6 种成分含量进行了测定,结果显示不同厂家的产品,绿原酸在 0.085 2 ~ 4.58 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,咖啡酸在 0.037 ~ 0.58 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,黄芩苷在 2.42 ~ 44.0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,汉黄芩苷在 0.029 1 ~ 2.11 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,黄芩素在 0.046 4 ~ 1.68 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,汉黄芩素在 0.015 6 ~ 0.29 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间波动,含量分别相差 53.7,15.6,18.2,72.4,36.2,18.6 倍,测定结果进一步说明,对中药制剂采用单一成分或同类成分的质量控制模式会给不法厂商制造非法添加的机会。特别是目前感染性疾病由于滥用抗生素及病原体自身的演变,病原体耐药性增大,使得抗菌素的使用剂量不断增大,严重影响到人们用药的安全性和有效性,中药复方制剂银黄颗粒以其在抗生素及抗病毒方面的良好疗效成为目前临床常用药,因此对银黄颗粒中上述 6 种成分的同步检测有利于防止非法添加的发生,从而更好地保证临床用药安全性和有效性。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:1084.

[2] 王彩芳,张楠,黄龙,等. HPLC 法测定不同厂家银黄颗粒中黄芩苷的含量[J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(24):27.

[3] 李坚,冯焕村,杜璐. HPLC 法测定银黄含片中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(6):683.

[4] 刘永利,李冬梅,冯丽,等. RP-HPLC 同时测定银黄胶囊中绿原酸与黄芩苷含量[J]. 中成药, 2006, 28(8):1142.

[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.

[6] 刘永利,李冬梅,冯丽,等. RP-HPLC 同时测定银黄胶囊中绿原酸与黄芩苷含量[J]. 中成药, 2006, 28(8):1142.

[7] 李新圃,罗金印,郁杰,等. 高效液相色谱在银黄制剂分析研究中的应用[J]. 兰州大学学报:医学版, 2007, 33(1):55.

[8] 杨菲,冯伟红,王智民,等. 一测多评法测定银黄制剂中 4 种黄酮类成分含量[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(12):984.

[责任编辑 顾雪竹]