

HPLC 同时测定复方金银花颗粒中绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素的含量

唐励静¹, 文翔昊², 李冲², 李云贵¹, 孙林军¹, 郭玉^{1*}

(1. 南华大学 药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学 附属南华医院, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的:建立同时测定复方金银花颗粒中 5 种化学成分(绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素)的高效液相色谱法。方法:采用 Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。以甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 25%~53% A; 10~16 min, 53%~78% A), 检测波长 278 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL, 柱温 25 ℃。结果:绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素 5 种成分在 25 min 内基本分离。峰面积(Y)对进样量(X)的标准曲线分别为绿原酸 $Y = 2\,350.4X - 137.27, r = 0.999\,6$; 连翘苷 $Y = 1\,161.7X + 18.474, r = 0.999\,6$; 黄芩苷 $Y = 3\,204.2X - 423.45, r = 0.998\,8$; 汉黄芩苷 $Y = 4\,792.7X - 93.15, r = 0.998\,5$; 芹菜素 $Y = 1\,434.1X - 8.4132, r = 0.999\,3$; 加样回收率分别为:绿原酸 99.47% (RSD 0.8%); 连翘苷 98.26% (RSD 0.9%); 黄芩苷 100.4% (RSD 1.9%); 汉黄芩素 99.29% (RSD 1.1%); 芹菜素 98.79% (RSD 1.1%)。结论:该方法操作简便,重复性好,分离效果好,可以作为复方金银花颗粒的质量控制。

[关键词] 复方金银花颗粒; 绿原酸; 连翘苷; 黄芩苷; 汉黄芩素; 芹菜素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0071-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210071

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1109.005.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:09

[收稿日期] 20140507(021)

[基金项目] 湖南省“十二五”重点学科建设项目(2011176); 湖南省中医药局重点课题项目(201211); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2013525)

[第一作者] 唐励静, 在读硕士, 从事药物分析研究, Tel:15200521979, E-mail:15200521979@139.com

[通讯作者] * 郭玉, 硕士, 教授, 从事药物分析与心血管药理学, Tel:0734-8281239, E-mail:guoyuhy@126.com

用本方法对艾叶样品进行分析, 得 84 个色谱峰, 准确鉴定 66 个, 主要成分为 1, 8-桉叶油素 41.43%, 还有石竹烯, 樟脑, 氧化石竹烯, α-石竹烯, 蒿酮, 蒿醇, 龙脑, α-蒎烯等。

[参考文献]

- [1] 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究. 北方篇. 第 1 册[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 1995: 874.
- [2] 刘茂生, 李啸红, 兰美兵, 等. 艾叶油对小鼠的遗传毒理学研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 85.
- [3] 张来宾, 阎玺庆, 段金庵, 等. 艾叶不同提取物对小鼠原发性痛经的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 205.
- [4] 赵志鸿, 黄勇勇, 张小俊, 等. 河南驻马店产艾叶挥发油的 GC-MS 分析[J]. 郑州大学学报: 理学版,

2013, 45(2): 80.

- [5] 何正有, 张艳红, 魏冬, 等. 湖北产鲜艾叶与陈艾挥发油的化学成分[J]. 中成药, 2009, 31(7): 1079.
- [6] 王永林, 刘拉平. 艾叶挥发性成分固相微萃取 GC-MS 分析[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(5): 354.
- [7] 王丽, 赵先恩, 王晓, 等. 鲜艾叶与干艾叶挥发性成分的 HS-SPME-GC-MS 分析[J]. 山东科学, 2012, 25(4): 27.
- [8] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 56.
- [9] Zheng X H, Deng C H, Song G X, et al. Comparison of essential oil composition of *Artemisia argi* leaves at different collection times by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chromatographia, 2004, 59(6): 729.

[责任编辑 顾雪竹]

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Forsythin, Baicalin, Wogonin and Apigenin in Compound Jinyinhua Granules by HPLC

TANG Li-jing¹, WEN Xiang-hao², LI Chong², LI Yun-gui¹, SUN Lin-jun¹, GUO Yu^{1*}

(1. Learning Key Laboratory for Pharmacoproteomics of Hunan Province, Institutes of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China;
2. Affiliated Nanhua Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

[Abstract] **Objective:** A rapid and sensitive method for HPLC was established to simultaneously determine chlorogenic acid, forsythin, baicalin, wogonin and apigenin. **Method:** Chromatographic separation was carried out on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) under gradient elution (0-0.01 min, A phase is 25%; 0.01-10 min, A phase is 25%-53%; 10-16 min, A phase is 53%-78%) with methanol (A phase) -water/0.2% phosphate (B phase) as mobile phase at a flow rate of 1.00 mL · min⁻¹ to elute at 25 °C. The injection volume was 20 μL and the detection was adopted UV detector at 278 nm. **Result:** These five components were separated basically within 25 minutes with good linearity. The regression equations were $Y = 2\ 350.4X - 137.27$, $r = 0.999\ 6$ (for chlorogenic acid), $Y = 1\ 161.7X + 18.474$, $r = 0.999\ 6$ (for forsythin), $Y = 3\ 204.2X - 423.45$, $r = 0.998\ 8$ (for baicalin), $Y = 4\ 792.7X - 93.15$, $r = 0.998\ 5$ (for wogonin), $Y = 1\ 434.1X - 8.413\ 2$, $r = 0.999\ 3$ (for apigenin). The average recoveries were: chlorogenic acid 99.47% (RSD 0.8%), forsythin 98.26% (RSD 0.9%), baicalin 100.4% (RSD 1.9%), wogonin 99.29% (RSD 1.1%), apigenin 98.79% (RSD 1.1%). **Conclusion:** The HPLC method has good accuracy, reliability, and repeatability. It is suitable for compound Honeysuckle granules and traditional Chinese medicines containing the same ingredients to improve their quality control.

[Key words] honeysuckle granules; chlorogenic acid; forsythin; baicalin; wogonin apigenin

复方金银花颗粒由金银花、连翘、黄芩 3 味药组成,具清热解毒、凉血消肿功效,用于风热感冒、咽炎、扁桃体炎、目痛、牙痛及痈肿疮疖等。本方收载于卫生部药品标准《中药成方制剂》第十册^[1]。文献报道该复方制剂中的单组分的含量测定较多,对多组分含量测定较少^[2-4],复方制剂中药效的发挥通常是通过多组分共同作用的结果。为了更好的控制该制剂中的金银花、连翘、黄芩的含量,以梯度洗脱同时测定复方金银花颗粒中绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素 5 个成分的含量,丰富并完善了复方金银花颗粒的质量控制,并为合理指导临床用药提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,包括 1200 系列四元泵、DAD1260 型检测器),UV-2540 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),AE200 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司),SB-5200DTDN 型超声波清洗仪(灵波生物科技

有限责任公司)。

1.2 试剂 对照品:绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素(中国食品药品检定研究院,批号 110753-200413,110820-201004,110715-201117,111514-200403)、芹菜素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-10031801);复方金银花颗粒(哈药集团世一堂制药厂,10 g × 10 袋/盒);甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇(A)-0.2%的磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 25% ~ 53% A;10 ~ 16 min, 53% ~ 78% A),检测波长 278 nm,流速 1 mL · min⁻¹,进样量 20 μL,柱温 25 °C。

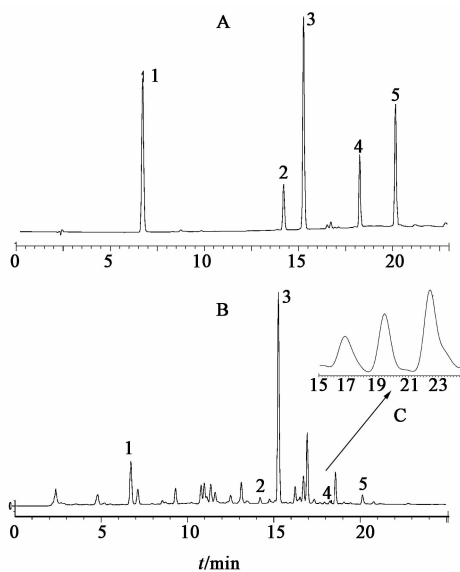
2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 取绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素对照品适量,精密称定,置

25 mL 棕色瓶中,加 50% 甲醇配制成每 1 mL 含绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素 0.252 0, 0.128 0, 0.266 0, 0.118 0, 0.165 0 mg 的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的配制 取样品内容物适量,研细,精密称定粉末 2.0 g,置具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 50 mL 溶解,称定质量,超声处理 30 min,取出,放冷后再称定其质量,用 50% 的甲醇补足其减失的质量,摇匀,0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液得到供试品溶液。

2.3 系统适用性试验 分别精密吸取对照品、供试品溶液各 20 μL ,注入高效液相色谱仪中,记录色谱图,结果见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; C. 样品中芹菜素的放大图谱;

1. 绿原酸; 2. 连翘苷; 3. 黄芩苷; 4. 芹菜素; 5. 汉黄芩素

图 1 复方金银花颗粒 HPLC

2.4 线性关系的考察 精密吸取混合对照品储备液 1, 2, 4, 6, 8 mL 分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得到系列混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品溶液 20 μL 进样测定。以对照品的峰面积 Y 为纵坐标,进样量 X 为横坐标绘制标准曲线并进行回归计算,得回归方程和线性关系,见表 1。

表 1 复方金银花颗粒中 5 种成分的线性关系

成分	线性范围/ μg	回归方程	r
绿原酸	0.504 ~ 4.032	$Y = 2\,350.4X - 137.27$	0.999 6
连翘苷	0.256 ~ 2.048	$Y = 1\,161.7X + 18.47$	0.999 6
黄芩苷	0.532 ~ 4.256	$Y = 3\,204.2X - 423.45$	0.998 8
汉黄芩素	0.236 ~ 1.888	$Y = 4\,792.7X - 93.15$	0.998 5
芹菜素	0.330 ~ 2.640	$Y = 1\,434.1X - 8.413$	0.999 3

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL ,连续进样 6 次,测定,绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.44%, 0.11%, 0.15%, 0.99%, 0.54%。

2.6 重复性试验 取同一批号 (1305568247) 样品,按照 2.2.2 项下的方法平行制备供试品溶液 6 份,以上述的色谱条件测定。样品中绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素含量的 RSD 分别为 0.58%, 0.93%, 2.10%, 1.80%, 1.32%。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液,按照上述色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定,绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.67%, 0.84%, 0.60%, 1.81%, 1.90%。

2.8 加样回收率试验 取同一批号 (1305568247) 已知含量的样品粉末 1.0 g 共 6 份,置锥形瓶中,精密加入一定量绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素对照品,按照样品测定的方法进行测定。计算回收率,各成分加样回收率各指标平均值见表 2。

表 2 复方金银花颗粒中 5 种成分的加样回收试验 ($n = 6$)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
绿原酸	1.454 0	1.364 0	2.811 0	99.47	0.8
连翘苷	0.259 9	0.144 0	0.401 4	98.26	0.9
黄芩苷	4.109 0	3.308 0	7.429 0	100.4 0	1.9
汉黄芩素	0.166 2	0.125 0	0.290 3	99.29	1.1
芹菜素	0.125 4	0.301 0	0.422 8	98.79	1.1

注:称样量均为 1.007 5。

2.9 样品测定 取 3 批样品,每批样品按照 2.2.2 项下方法分别制备,按照上述色谱条件,注入液相色谱仪,记录峰面积,用外标法计算样品中各组分的含量,见表 3。

表 3 不同批号复方金银花颗粒中

5 种成分的含量测定 ($n = 3$)

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	绿原酸	连翘苷	黄芩苷	汉黄芩苷	芹菜素
1305523062	1.452	0.263	4.167	0.174	0.151
1305537020	1.454	0.265	4.151	0.177	0.129
1305568247	1.439	0.259	4.110	0.166	0.126

3 讨论

3.1 对照品的选择 试验中绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素对照品是以金银花、连翘、黄芩这三味君药有效成分为基础,按照样品中各成分相对含量的大小进行制备。

3.2 提取条件的选择 本试验对提取溶剂、提取方式、提取时间和溶剂用量进行考察。比较了25%甲醇,50%甲醇,70%甲醇,70%乙醇及水等不同溶剂的提取效果^[5],结果表明50%的甲醇提取效果最佳;比较冷浸法、超声提取法、回流提取法,冷浸法提取有效成分较少,而回流提取法所含的杂质较多且操作较繁琐,故采用简便、快捷、高效率的超声提取法;比较不同的提取时间,30,40,50 min,结果表明30 min的提取效果较好;比较样品与提取溶剂的比例分别为1:15,1:25,1:35,结果表明1:25的比例进行超声提取效果最佳。

3.3 波长的选择 根据文献报道绿原酸在323 nm有较大吸收^[6],218 nm次吸收;连翘苷在230 nm处有最大吸收^[7],278 nm有次吸收;黄芩苷在278 nm有强吸收^[8];汉黄芩素在278 nm有强吸收^[9];芹菜素在360 nm处有强吸收^[10]。故在上述波长下对样品进行了检测,360 nm波长下的图谱较为稳定,但未能检测出连翘苷的含量。综合考虑检测的灵敏度以及峰高之间的差别,选择278 nm作为检测波长。

3.4 流动相的选择 由于这5个有效成分的极性相差比较大,因此要采用梯度洗脱进行测定,可以使色谱峰得到很好的分离,缩短了分析的时间。曾经使用过甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水(0.2%,0.1%)、乙腈-磷酸水(0.2%,0.1%)等流动相系统,采用甲醇-磷酸(0.2%)系统时可以使连翘苷和黄芩苷峰易分离且峰形比较好。

本文采用高效液相色谱法对绿原酸、连翘苷、黄芩苷、汉黄芩素、芹菜素5中成分同时测定,该方法操作简便,重复性好,分离效果好,可以作为复方金

银花颗粒的质量控制的依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 第十册[S]. 1995:115.
- [2] 汪洪武,刘艳清. HPLC测定复方金银花颗粒中绿原酸与黄芩苷含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9):706.
- [3] 贺国彬,李津明,赵金凤,等. HPLC同时测定双黄连口服液中的质控成分[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1):3.
- [4] 徐玫,袁琦,赵辉,等. HPLC等度洗脱法同时测定银黄薄膜衣片中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5):691.
- [5] 徐玫,袁琦,赵辉,等. 快速测定银黄胶囊中的绿原酸和黄芩苷 HPLC法同时测定银黄. [J]. 河南大学学报, 2013, 32(4):250.
- [6] 朱德杰. HPLC法测定黄菊消银丸中绿原酸的含量[J]. 中国中医药现代远程, 2013, 11(11):151.
- [7] 宴利芝,王英峰,刘锁兰,等. HPLC法测定金莲口服液中连翘苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5):793.
- [8] 马志英,师永清,罗兴平. RP-HPLC双波长测定清热解毒软胶囊中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(8):748.
- [9] 冯伟红,李曼玲,赵宇新,等. HPLC法测定不同产地黄芩中黄芩素、汉黄芩素的含量[C]. 中国中药标准研究学术研讨会议文集, 2005.
- [10] 苏春英,苏本华,孙静. HPLC法测定浮萍中芹菜素的含量[J]. 中医药信息, 2013, 30(3):32.

[责任编辑 顾雪竹]