

# UPLC 同时测定银黄颗粒中 4 种黄酮类成分含量

乔东鸽<sup>1</sup>, 吉丽娜<sup>2,3</sup>, 何希荣<sup>2</sup>, 冯伟红<sup>2,3\*</sup>, 李东影<sup>3,4</sup>

(1. 河南省中医院, 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; 4. 天津中医药大学, 天津 300193)

**[摘要]** 目的: 建立银黄颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的 UPLC 含量测定方法。方法: 采用 ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪, ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相甲醇-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 274 nm, 柱温 30 ℃。结果: 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的线性范围分别为 1.09~21.8, 0.340~6.80, 0.116~2.32, 0.102~2.04 μg, 加样回收率分别为 100.8% (RSD 0.32%), 97.1% (RSD 0.95%), 101.5% (RSD 1.6%), 98.7% (RSD 0.059%)。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]** 高效液相色谱; 银黄颗粒; 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(2013)15-0102-04

**[doi]** 10.11653/syfq2013150102

## Simultaneous Determination of Four Flavones in Yinhuang Granule by UPLC

QIAO Dong-ge<sup>1</sup>, JI Li-na<sup>2,3</sup>, HE Xi-rong<sup>2</sup>, FENG Wei-hong<sup>2,3\*</sup>, LI Dong-ying<sup>3,4</sup>

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, 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;  
4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an UPLC method for determining the content of four flavones in Yinhuang granule. **Method:** The analysis was performed on an ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) eluted with methanol and water containing 0.2% phosphoric acid as mobile phases in a linear gradient mode. The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was set at, and the detection wavelength was set at 274 nm. **Result:** The linear ranges were 1.09-21.8 μg for baicalin, 0.340-6.80 μg for wogonoside, 0.116-2.32 μg for baicalein, 0.102-2.04 μg for wogonin respectively. The average recoveries of the four flavones were 100.8% (RSD 0.32%), 97.1% (RSD 0.95%), 101.5% (RSD 1.6%), 98.7% (RSD 0.059%) respectively. **Conclusion:** The method appeared to be simple, accurate and reliable, which can be used for quality control of the four flavones in Yinhuang granule.

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

银黄颗粒是由金银花和黄芩 2 味中药提取物组成的复方制剂, 具有清热疏风、利咽解毒的功效, 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, 急慢性扁桃体炎、急慢性咽炎、上

**[收稿日期]** 20130329(110)

**[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]** 乔东鸽, 主管护师, 从事临床护理工作, Tel: 13939015995, E-mail: qdg100@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

呼吸道感染见上述证候者<sup>[1]</sup>。现代研究表明,黄芩中的主要活性成分是黄酮类化合物,其中含量较高并且具有明显药理作用的是黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素4种黄酮类成分<sup>[2-3]</sup>。根据文献报道,银黄制剂多以黄芩苷和绿原酸为检测指标<sup>[4-12]</sup>,分别控制黄芩提取物和金银花提取物的质量,这种单一的质量控制模式存在较大的缺陷,也给不法厂商制造了非法添加的机会。本研究在前期工作基础上,采用UPLC方法研究建立了银黄颗粒中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素4种黄酮类成分同步测定的方法,在3.5 min内实现了对该制剂黄芩提取物中多种黄酮类成分的同步监控,可为银黄颗粒的质量评价提供更全面的依据。

## 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、Empower<sup>3</sup>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** 黄芩苷(批号110715-201016)和黄芩素(批号111595-200905)购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用,含量分别按94%,98.5%计。汉黄芩苷(批号H-019-110325)和汉黄芩素(批号S-036-110407)购自成都瑞芬思生物科技有限公司,HPLC级,经面积归一化法测定,纯度均>98%。

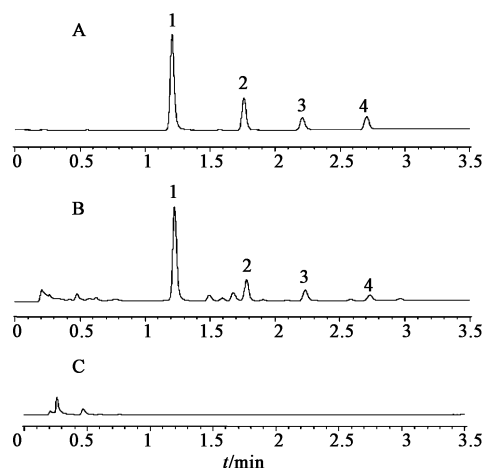
**1.3 样品** 5批银黄颗粒为不同厂家、不同批号的市售商品。分别为①贵州富华药业有限责任公司(20110507);②灵宝市豫西药业有限责任公司(批号0911207);③保和堂(焦作)制药有限公司(批号200902092);④河北国金药业有限责任公司(批号1006131,1009292)。

**1.4 试剂** 甲醇为色谱纯(美国Fisher公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件<sup>[13]</sup>** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相甲醇-0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱(0~0.03 min,40% A;0.03~3.19 min,40%~70% A),流速0.6 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长274 nm,进样量1 μL。对照品、供试品和黄芩阴性供试品溶液的超高效液相色谱图见图1。

**2.2 供试品溶液的制备** 取本品内容物,研细,取约0.1 g,精密称定,置25 mL棕色量瓶中,加50%甲醇20 mL,超声处理30 min,放冷,加50%甲醇稀



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 阴性供试品

1. 黄芩苷;2. 汉黄芩苷;3. 黄芩素;4. 汉黄芩素

图1 银黄颗粒UPLC

释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密称取黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素对照品5.45,1.70,0.58,0.51 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配成混合对照品贮备液。精密吸取该贮备液1 mL置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液(分别含黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素5.45,1.70,0.580,0.510 mg·L<sup>-1</sup>),备用。

**2.4 阴性供试品溶液的制备** 根据银黄颗粒的制备工艺,制备缺黄芩阴性供试品;再按2.2项下方法制备缺黄芩的阴性供试品溶液。

**2.5 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0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,2.0,4.0 μL注入超高效液相色谱仪,测定峰面积。采用最小二乘法,以被测物的进样量(μg)与峰面积的积分值进行线性回归。结果表明,4种黄芩黄酮类成分在如下进样范围内线性关系良好,见表1。

表1 黄芩黄酮的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/μg
黄芩苷	$Y = 5.90 \times 10^6 X - 2396$	0.999 9	0.001 09 ~ 0.021 8
汉黄芩苷	$Y = 7.01 \times 10^6 X - 540$	0.999 9	0.000 34 ~ 0.006 8
黄芩素	$Y = 9.07 \times 10^6 X - 790$	0.999 9	0.000 116 ~ 0.002 32
汉黄芩素	$Y = 1.16 \times 10^7 X - 341$	0.999 9	0.0001 02 ~ 0.002 04

**2.6 精密度试验** 精密吸取同一份银黄颗粒(批号20110507)供试品溶液1 μL,连续进样6次,测定黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积。结果上述4种黄芩黄酮类成分峰面积的RSD分别为0.12%,0.54%,0.70%,0.64%,表明仪器的精密度良好。

**2.7 重复性试验** 取同一批银黄颗粒(20110507)粉末约 0.1 g,平行 6 份,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定黄芩苷、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 4 种黄芩黄酮类成分的含量分别为 30.8, 0.250, 0.955, 0.348 mg · g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 0.7%, 0.3%, 0.4%, 1.2%, 表明该方法的重复性良好。

**2.8 稳定性试验** 取同一份银黄颗粒(20110507)供试品溶液,分别于制备后的第 0,2,4,6,8,24 h 进样,测定黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积并计算 RSD。结果供试品溶液中上述 4 种黄芩黄

酮类成分峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.4%, 0.9%, 1.4%, 表明 24 h 内,供试品溶液的稳定性良好。

**2.9 加样回收率试验** 取已知含量的银黄颗粒(20110507)粉末约 0.05 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)的比例加入一定量的对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定并计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的加样回收率及 RSD。结果上述 4 种黄芩黄酮类成分的加样回收率分别为 100.8%, 97.1%, 101.5%, 98.7%, RSD 分别为 0.32%, 0.95%, 1.6%, 0.059, 表明该方法的准确度良好,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	样品含量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
黄芩苷	0.050 02	1.540 6	1.55	3.106 7	101.04	100.8	0.32
	0.050 00	1.540 0	1.55	3.103 0	100.84		
	0.050 03	1.540 9	1.55	3.099 6	100.56		
	0.050 01	1.540 3	1.55	3.094 5	100.27		
	0.050 07	1.542 2	1.55	3.109 9	101.14		
	0.050 08	1.542 5	1.55	3.104 4	100.77		
汉黄芩苷	0.050 02	0.012 51	0.013 2	0.025 5	98.41	97.1	0.95
	0.050 00	0.012 50	0.013 2	0.025 4	97.73		
	0.050 03	0.012 51	0.013 2	0.025 3	96.89		
	0.050 01	0.012 50	0.013 2	0.025 2	96.21		
	0.050 07	0.012 52	0.013 2	0.025 2	96.06		
	0.050 08	0.012 52	0.013 2	0.025 4	97.58		
黄芩素	0.050 02	0.047 84	0.044 3	0.093 5	103.07	101.5	1.6
	0.050 00	0.047 82	0.044 3	0.093 6	103.34		
	0.050 03	0.047 85	0.044 3	0.092 2	100.11		
	0.050 01	0.047 83	0.044 3	0.092 1	99.93		
	0.050 07	0.047 89	0.044 3	0.092 3	100.25		
	0.050 08	0.047 90	0.044 3	0.093 2	102.26		
汉黄芩素	0.050 02	0.001 741	0.001 68	0.003 4	98.75	98.7	0.059
	0.050 00	0.001 741	0.001 68	0.003 4	98.75		
	0.050 03	0.001 742	0.001 68	0.003 4	98.69		
	0.050 01	0.001 741	0.001 68	0.003 4	98.75		
	0.050 07	0.001 743	0.001 68	0.003 4	98.63		
	0.050 08	0.001 743	0.001 68	0.003 4	98.63		

**2.10 含量测定** 取不同厂家及批号的银黄颗粒约 0.1 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别吸取供试品和对照品溶液 1 μL 进样分析,外标法计算含量,见表 3。

### 3 讨论

实验中采用二极管阵列检测器,在 190 ~ 400 nm 波长处对 4 种待测成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素进行了紫外全波长扫描,根据测定结

表3 不同厂家银黄颗粒中  
4种黄酮类成分的质量分数( $n=2$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	厂家	批号	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
1	1	20110507	30.8	0.250	0.955	0.348
2	2	0911207	5.01	0.100	0.070 2	0.020 0
3	3	200902092	26.2	0.279	1.81	0.548
4	4	1006131	30.6	0.385	0.780	0.221
5	4	1009292	29.5	0.288	0.985	0.243

果,上述4个成分分别在277,273,275,274 nm波长处有最大吸收峰,因此选择274 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。

本实验参考文献报道方法<sup>[2-3]</sup>,先后试用了甲醇-0.2%磷酸水、甲醇-0.4%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水及乙腈-0.4%磷酸水不同的色谱系统和梯度洗脱程序,从色谱峰分离度、出峰时间以及色谱峰纯度等多方面综合考虑,选择甲醇-0.2%磷酸水系统进行梯度洗脱,获得满意分离效果。

本实验采用的超高效液相色谱是基于ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  1.7  $\mu\text{m}$  色谱柱填料的新型色谱分离技术, BEH颗粒具有更宽的pH使用范围(pH 1~12),能够帮助实验人员快速有效地开发方法。由于BEH颗粒也用于XBridge系列的HPLC多种规格色谱柱<sup>[14]</sup>,因此本研究所建立的分离方法能够在HPLC和UPLC技术平台之间实现无缝转换。

本文采用UPLC对3批银黄颗粒中的4种黄酮类成分含量进行了测定,结果显示不同厂家的产品黄芩苷含量在5.01~30.8  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,汉黄芩苷含量在0.1~0.385  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,黄芩素含量在0.007 02~1.81  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,汉黄芩素含量在0.002~0.548  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 波动,含量分别相差6,3.85,14,27.4倍,测定结果进一步说明,为保证临床用药安全性和有效性,对中药及其复方制剂进行多成分同步质量控制势在必行。

## [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] 李欣,魏朔南. 黄芩的生物学研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(6):11.
- [3] 徐丹洋,陈佩东,张丽. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):78.
- [4] 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.
- [5] 李宇清,刘劲松. HPLC测定银黄颗粒剂中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(5):45.
- [6] 王丽聪,曹玉华,徐红兰,等. 银黄口服液的质量控制及其高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 色谱, 2006, 24(4):367.
- [7] 郭温迎,庄建芳. HPLC法测定银黄颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(5):427.
- [8] 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):124.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 白雁,张威,龚海燕,等. NIRS结合TQ软件建立银黄颗粒中绿原酸定量模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):35.
- [12] 郭武艳,孔焕宇,朱嘉,等. 不同制备工艺银黄方中有效成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):8.
- [13] 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.
- [14] ACQUITY UPLC超高效液相色谱柱[C]. 兰州:西北地区第六届色谱学术报告会暨甘肃省第十一届色谱年会, 2010.

[责任编辑 顾雪竹]