

RP-HPLC 测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量

王玲玲¹, 王凌², 杨菲^{2,4}, 冯伟红^{2,3*}

(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: 建立用 RP-HPLC 同时测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷含量的方法。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.4% 磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 325 nm。结果: 绿原酸和黄芩苷的线性范围分别为 0.060 0 ~ 1.20 μg 和 0.272 ~ 5.44 μg, 回归方程分别为 $Y = 3.09 \times 10^6 X - 39\ 215$, $r = 0.999\ 9$ 和 $Y = 2.08 \times 10^6 X - 117\ 181$ ($r = 0.999\ 9$) 加样回收率分别为 99.5%, 97.9%; RSD 分别为 0.73%, 1.79%。结论: 本法操作简便, 分离度好, 可用于颗粒的质量控制。

[关键词] 反相高效液相色谱法; 银黄颗粒; 绿原酸; 黄芩苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0124-03

Determination of Content of Chlorogenic Acid and Bacalin in Yinhuang Granules by RP-HPLC

WANG Ling-ling¹, WANG Ling², YANG Fei^{2,3,4}, FENG Wei-hong^{2,3*}

(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 establish an RP-HPLC method for determination of chlorogenic acid and bacalin in Yinhuang granules. **Method:** The analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile and water containing 0.4% phosphoric acid as the mobile phase in gradient elution. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The UV detector wavelength was at 325 nm, and the column temperature was at 30 °C. **Result:** The linear ranges of chlorogenic acid and bacalin were 0.060 0-1.20 μg ($r = 0.999\ 9$) and 0.272-5.44 μg ($r = 0.999\ 9$); the average recoveries of chlorogenic acid and bacalin were 99.5% and 97.9%, and RSD were 0.73% and 1.79% respectively. **Conclusion:** The method was simple, feasible, and it can be used for the quality control of Yinhuang granule.

[Key words] RP-HPLC; Yinhuang granules; chlorogenic acid; bacalin

银黄颗粒由金银花提取物和黄芩提取物组成, 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、急慢性咽喉炎、上呼吸

道感染证见上述证候者^[1]。2010 年版《中国药典》中银黄颗粒的含量测定项下采用 HPLC 法分别测定绿原酸和黄芩苷的含量^[2-4], 我们经过试验建立了绿原酸和黄芩苷同步测定的方法并进行了方法学考察。

1 材料

1.1 仪器 Waters Alliance 高效液相色谱仪, 2695 溶剂管理系统, 2996 二极管阵列检测器, Empower² 色谱工作站。

1.2 试药 绿原酸对照品 (批号 110753-200413),

[收稿日期] 20120227(198)

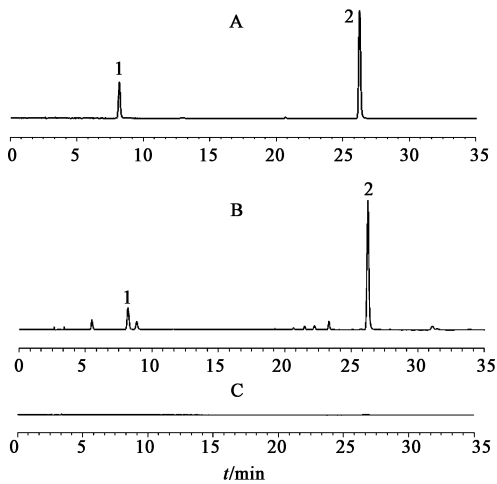
[第一作者] 王玲玲, 副主任医师, Tel: 13027756777, E-mail: chishao2000@sohu.com

[通讯作者] * 冯伟红, 副研究员, 本科, 从事中药质量标准研究, Tel: 010-64014411-2971, E-mail: weihong_bj@126.com

黄芩苷对照品(批号110715-200212),均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用;银黄颗粒为市售品。甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher)、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^[5] Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液进行梯度洗脱(0 min, 12% A, 11 ~ 20 min, 12% ~ 15% A, 15 ~ 20 min, 15% ~ 27% A, 20 ~ 35 min, 27% ~ 30% A),检测波长 325 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。理论板数按黄芩苷色谱峰计算不低于 4 000。在上述色谱条件下绿原酸和黄芩苷与其他成分分离良好,阴性试验无干扰。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性;
1. 绿原酸; 2. 黄芩苷

图 1 银黄颗粒 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸对照品 1.50 mg, 黄芩苷对照品 6.80 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液(绿原酸质量浓度为 0.030 0 g·L⁻¹, 黄芩苷质量浓度为 0.136 g·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备^[1] 取本品约 0.1 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按银黄颗粒处方配比称取缺金银花提取物和黄芩提取物的阴性对照粉末适量, 按 2.3 项下方法制备阴性对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取 2.2 项下对照品混合溶液 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 μL, 在上述色谱条件下进样, 分别测定绿原酸和黄芩苷的峰面积, 以

对照品量为自变量, 峰面积为因变量, 结果绿原酸和黄芩苷分别在 0.060 0 ~ 1.20 μg 和 0.272 ~ 5.44 μg 线性关系良好, 回归方程分别为 $Y = 3.09 \times 10^6 X - 39\ 215$ ($r = 0.999\ 9$) 和 $Y = 2.08 \times 10^6 X - 117\ 182$ ($r = 0.999\ 9$)。

2.5.2 精密度试验 取同一份银黄颗粒供试品溶液, 连续进样 6 次, 结果绿原酸和黄芩苷峰面积积分值的 RSD 分别为 0.33%, 0.16%, 表明仪器的精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于供试品溶液配制后第 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 注入液相色谱仪进行测定, 绿原酸和黄芩苷峰面积积分值的 RSD 分别为 0.69%, 0.69%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批市售银黄颗粒, 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 注入液相色谱仪, 分别测定样品含量, 结果绿原酸和黄芩苷的含量分别为 3.77, 34.3 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.0%, 1.5%, 表明样品制备方法的重复性良好。

2.5.5 回收率试验 取已知含量的本品内容物 0.05 g, 平行 6 份, 精密称定, 每份分别精密加入含绿原酸(0.009 40 g·L⁻¹) 和黄芩苷(0.085 0 g·L⁻¹) 的混合对照品的溶液 20 mL, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算回收率。结果绿原酸和黄芩苷的平均回收率分别为 99.5%, 97.9%, RSD 分别为 0.73%, 1.79%, 表明方法的准确度良好。见表 1 ~ 2。

表 1 绿原酸加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品中 含量 /mg	测得量 /mg	加入量 /mg	检出量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.050 0	0.188 6	0.372 8	0.188	0.184 2	97.98		
2	0.050 2	0.188 6	0.374 3	0.188	0.185 7	98.78		
3	0.050 5	0.188 6	0.375 7	0.188	0.187 1	99.52	99.2	0.73
4	0.050 1	0.188 6	0.376 3	0.188	0.187 7	99.84		
5	0.050 1	0.188 6	0.376 2	0.188	0.187 6	99.89		
6	0.050 8	0.188 6	0.375 7	0.188	0.187 1	99.52		

2.5.6 样品测定 分别精密称取不同市售银黄颗粒内容物各 0.1 g, 平行 2 份, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定峰面积, 并计算含量, 测定结果见表 3。

表 2 黄芩苷加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品中 含量 /mg	测得量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.050 0	1.718	3.379	1.700	97.71		
2	0.050 2	1.718	3.411	1.700	99.59		
3	0.050 5	1.718	3.412	1.700	99.65	97.9	1.79
4	0.050 1	1.718	3.349	1.700	95.94		
5	0.050 1	1.718	3.395	1.700	98.65		
6	0.050 8	1.718	3.344	1.700	95.65		

表 3 市售银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量 (n=2)

No.	批号	厂家	含量/mg · g ⁻¹	
			绿原酸	黄芩苷
1	101101	天津太平洋制药有限公司	3.7	33.7
2	20110507	贵州富华药业有限责任公司	3.1	30.1
3	200902092	保和堂(焦作)制药有限公司	2.6	25.1
4	1009292	河北国金药业有限责任公司	1.3	31.7
5	1006131	河北国金药业有限责任公司	1.1	30.1
6	100808	广州嘉禾药业有限公司	0.15	5.7
7	100712	广州嘉禾药业有限公司	0.21	5.6
8	20100914	中山市中智制药有限公司	1.6	26.2
9	10090103	四川锡城药业有限公司	1.4	7.6
10	0911207	灵宝市豫西药业有限责任公司	0.46	4.4

3 讨论

有文献报道采用可变波长法^[6]同步测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷含量。本研究通过对绿原酸和黄芩苷进行全波长扫描,发现绿原酸和黄芩苷分别在 325,277,316 nm 有吸收峰,综合考虑检测波长选择为 325 nm。该检测波长下供试品溶液分离度良好,方法学考察各项指标均符合 HPLC 分析的要求,具有简单快速的特点,可用于银黄制剂的质量控制。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:1084.
- [2] 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.
- [3] 王彩芳,黄龙,程茵.高效液相色谱法测定不同厂家银黄颗粒中绿原酸的含量[J].时珍国医国药,2007,18(5):1143.
- [4] 郭温迎,庄建芳.HPLC 法测定银黄颗粒中黄芩苷的含量[J].中国中医科技,2010,17(5):427.
- [5] 陈两绵,王锦玉,仝燕,等.HPLC 同时测定双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷及连翘苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):18.
- [6] 杨克迪,王丽君,龙云飞,等.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.

[责任编辑 顾雪竹]