

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

陈两绵^{1,2}, 王锦玉¹, 全燕^{1*}, 彭新君², 马振山¹, 王琳¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

[摘要] 目的: 建立高效液相法同时测定双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷及连翘苷含量的方法。方法: 采用 Kromasil-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.4% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 235 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果: 在选定的色谱条件下, 测定了双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷及连翘苷三组分的含量。结论: 该法快速、简便易行, 结果可靠, 适合于双黄连即型凝胶的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 双黄连即型凝胶; 绿原酸; 黄芩苷; 连翘苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)12-0018-04

Determination of Chlorogenic Acid, Baicalin and Phillyrin in Shuanghuanglian in-situ Gel by HPLC

CHEN Liang-mian^{1,2}, WANG Jin-yu¹, TONG Yan^{1*}, PENG Xin-jun², MA Zhen-shan¹, WANG Lin¹

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

2. College of pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of chlorogenic acid, baicalin and phillyrin in Shuanghuanglian in-situ gel. **Method:** Samples were analyzed by Kromasil-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (containing 0.4% phosphonic acid) as mobile phases in gradient elution, 235 nm as detected wavelength, 1.0 mL/min as flow-rate, 30 °C as temperature of column, 10 μL as injected volume. **Results:** The contents of three components, chlorogenic acid, baicalin and phillyrin, were determined by the given method. **Conclusion:** The method was rapid, convenient, and accurate, and is suitable for the quality control of Shuanghuanglian in-situ gel.

[Key words] HPLC; Shuanghuanglian in-situ gel; chlorogenic acid; baicalin; phillyrin

双黄连即型凝胶是以高分子辅料泊洛沙姆 407 和 188 为温敏型凝胶材料, 由金银花、黄芩、连翘三味药材提取物制成的直肠用温度敏感型原位凝胶, 具有疏风解表、清热解毒的功效。该制剂具有高度亲水性的三维网络结构及良好的组织相容性, 同时独特的溶液-凝胶转变性质还赋予其制备简单、使

用方便、与黏膜组织黏附性强、滞留时间长等优点。目前, 对于双黄连制剂的质量标准研究, 中国药典(2005 年版)一部中仅双黄连口服液采用 HPLC 法对黄芩苷、绿原酸、连翘苷三个指标性成分进行了含量测定, 且使用了三个不同的色谱条件^[1]。文献查阅发现, 用一个色谱条件测定双黄连制剂中多个指标性成分的论文还较为少见^[2-3]。本文通过系统摸索, 获得了 HPLC 同时测定双黄连即型凝胶中黄芩苷、绿原酸、连翘苷三个指标性成分的色谱条件, 相应的方法学考察结果表明, 该条件适合于双黄连即型凝胶中多组分的含量测定。

[收稿日期] 2008-09-02

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划(2006BAI09B08)

[通讯作者] * 全燕, Tel: (010) 84027721; E-mail: tongyan1012@sohu.com

1 仪器与试剂

Agilent HP1100 高效液相色谱仪(四元泵,自动进样器, DAD 检测器)(美国安捷伦公司); Satorius BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)

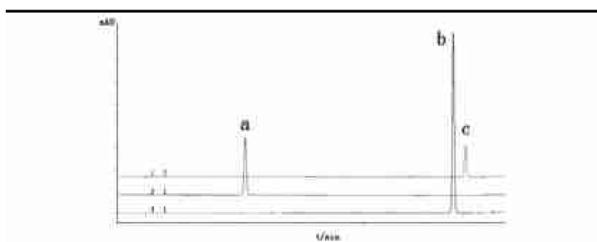
绿原酸(批号 110753-200413), 黄芩苷(批号 110715-200514), 连翘苷对照品(批号 110821-200610)(均购自中国药品生物制品检定所); 乙腈(色谱纯, 美国 fisher 公司); 甲醇(优级纯, 北京化工厂); 磷酸(分析纯, 北京红星化工厂); 重蒸馏水(本所自制); 双黄连即型凝胶样品(中国中医科学院中药所药剂室制备)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱为 Kromasil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4% 磷酸水溶液进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序为:

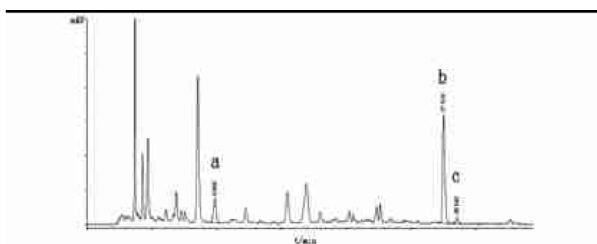
时间/min	0	11	20	35
乙腈/%	12	15	27	30
0.4% 磷酸/%	88	85	73	70

流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 235 nm; 进样量: 10 μL。理论塔板数以绿原酸计不低于 10 000, 黄芩苷与连翘苷的分离度大于 3.0; 在此条件下, 黄芩苷、绿原酸、连翘苷能与其它成分得到较好的分离, 结果见图 1 和图 2。



a. 绿原酸对照品; b. 黄芩苷对照品; c. 连翘苷对照品

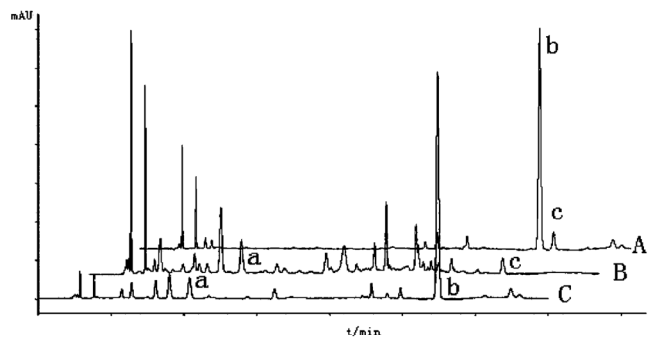
图 1 对照品的 HPLC 图



a. 绿原酸峰; b. 黄芩苷峰; c. 连翘苷峰

图 2 供试品的 HPLC 图

2.2 阴性对照试验 按照双黄连即型凝胶的制备工艺分别制备不含黄芩、金银花、连翘药材的即型凝



A. 缺金银花阴性对照图; B. 缺黄芩阴性对照图;

C. 缺连翘阴性对照图

a. 绿原酸峰; b. 黄芩苷峰; c. 连翘苷峰

图 3 阴性样品的 HPLC 图

胶, 取阴性样品胶液约 0.70 g, 置 50 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 超声 20 min, 放冷, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过。按上述色谱条件测定色谱峰面积, 结果显示, 阴性样品中其他成分对绿原酸峰、黄芩苷峰、连翘苷峰均无干扰, 结果见图 3。

2.3 对照品溶液的制备 取绿原酸、连翘苷对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇分别制成每 ml 含 0.128 mg 绿原酸的对照品溶液和每 ml 含 13.4 μg 连翘苷的对照品溶液; 取黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 ml 含 0.668 mg 黄芩苷的对照品溶液。

2.4 线性及范围 分别取绿原酸、连翘苷对照品溶液各 2.4.8.12.16 和 20 μL 进样, 取黄芩苷对照品溶液各 2.5.8.10.13 和 15 μL 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标(Y), 进样量(X)为横坐标, 得回归直线方程, 结果见表 1。

表 1 各组分的线性及范围

成分	t _R /min	回归方程	相关系数 r	线性范围/μg
绿原酸	10.368	Y = 3.96 × 10 ² X - 3.43	0.9999	0.256~ 2.56
黄芩苷	27.301	Y = 4.14 × 10 ² X + 27.40	0.9999	1.34~ 10.00
连翘苷	28.319	Y = 1.64 × 10 ³ X + 0.74	0.9999	0.0268~ 0.27

2.5 提取条件的选择

2.5.1 提取溶剂的选择 取样品约 0.70 g, 共 9 份(分为 3 组), 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 各组分别加乙醇、甲醇、50% 甲醇适量, 超声 30 min, 放冷, 分别加相应的溶剂至刻度, 摇匀, 滤过, 即得各提取液, 按上述色谱条件, 测定各组分含量。结果表明 50% 的甲醇为最佳提取溶剂, 结果见表 2。

2.5.2 提取方法的选择 取样品约 0.70 g, 共 9 份(分为 3 组), 精密称定, 置 100 ml 锥形瓶中, 加 50%

表 2 不同提取溶剂的测定结果 (n = 3)

提取溶剂	绿原酸含量/%	黄芩苷含量/%	连翘苷含量/%
50% 甲醇	0.665	4.42	0.0896
甲醇	0.522	4.20	0.0900
乙醇	0.347	3.27	0.0859

的甲醇 50 ml, 称定重量, 各组分别按表 3 提取方法处理(前二者需放冷, 分别补重), 摇匀, 滤过, 即得各提取液, 按上述色谱条件, 测定各组含量。结果表明三种提取方法无显著性差异。从试验的简单方便起见, 选择超声提取。结果见表 3。

表 3 不同提取方法的测定结果 (n = 3)

提取方法	绿原酸含量/%	黄芩苷含量/%	连翘苷含量/%
超声	0.686	4.38	0.0886
回流	0.674	4.38	0.0890
静置	0.667	4.37	0.0888

2.5.3 提取时间的选择 取样品约 0.70 g, 共 12 份(分为 4 组), 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 各组分别超声 5、10、20、30 min, 放冷, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 即得各提取液, 按上述色谱条件, 测定各组含量。结果表明 20 min 为最佳超声时间。结果见表 4。

表 4 不同超声时间的测定结果 (n = 3)

提取方法	绿原酸含量/%	黄芩苷含量/%	连翘苷含量/%
5min	0.678	4.38	0.0872
10min	0.687	4.45	0.0901
20min	0.704	4.46	0.0906
30min	0.689	4.46	0.0902

2.6 供试品溶液的制备 取样品约 0.70 g, 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 超声 20 min, 放置至室温, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液即得。

2.7 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 测定绿原酸、黄芩苷和连翘苷的峰面积, 三者的 RSD 分别为 0.89%、0.60% 和 0.99%。说明精密度良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别于 0、4、8、12、24、48 h 测定绿原酸、黄芩苷和连翘苷峰面积, 三者的 RSD 分别为 0.85%、1.1% 和 0.76%。说明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.9 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按 2.5 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 得到样品中绿原酸、黄芩苷、连翘苷的平均含量分别为

0.699%、4.50%、0.0901%, 三者的 RSD 分别为 0.61%、0.66% 和 0.93%。说明重复性良好。

2.10 加样回收率试验 取样品约 0.18 g, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 精密加入一定量绿原酸、黄芩苷、连翘苷对照品, 按 2.5 项下方法制成供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算平均回收率。结果表明三个组分的加样回收率均符合要求, 结果见表 5。

表 5 绿原酸、黄芩苷和连翘苷加样回收率 (n = 6)

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
绿原酸	0.175 5	1.23	1.26	2.51	101.6	101.5	1.3
	0.189 5	1.32	1.26	2.61	102.4		
	0.174 6	1.22	1.26	2.47	99.2		
	0.181 6	1.27	1.26	2.56	102.4		
	0.174 0	1.22	1.26	2.49	100.8		
	0.187 8	1.31	1.26	2.60	102.4		
黄芩苷	0.175 5	7.90	8.12	16.20	102.2	102.6	0.68
	0.189 5	8.53	8.12	16.91	103.2		
	0.174 6	7.86	8.12	16.18	102.5		
	0.181 6	8.17	8.12	16.54	103.1		
	0.174 0	7.83	8.12	16.20	103.1		
	0.187 8	8.45	8.12	16.68	101.4		
连翘苷	0.175 5	0.158	0.167 5	0.322	97.9	99.4	1.3
	0.189 5	0.171	0.167 5	0.338	99.7		
	0.174 6	0.157	0.167 5	0.327	101.5		
	0.181 6	0.164	0.167 5	0.330	99.1		
	0.174 0	0.157	0.167 5	0.324	99.7		
	0.187 8	0.169	0.167 5	0.334	98.5		

2.11 样品测定 取不同批次样品, 按 2.5 项下方法制成供试品溶液, 依法测定绿原酸、黄芩苷、连翘苷的含量, 结果见表 6。

表 6 不同批次样品含量测定结果 (n = 3)

样品批号	绿原酸含量/%	黄芩苷含量/%	连翘苷含量/%
080701	0.665	4.16	0.068 5
080702	0.637	4.17	0.090 1
080703	0.676	4.16	0.105

3 讨论

使用二极管阵列检测器检测, 样品中绿原酸、黄芩苷、连翘苷峰均能通过纯度检查; 黄芩苷在 220~

320 nm 范围内均有较强吸收,最大吸收波长在 280 nm 处,连翘苷的最大吸收波长在 235 nm 和 280 nm 处。样品中黄芩苷的含量是连翘苷含量的 40~ 60 倍,为减少两个峰峰高的差别,选择 235 nm 作为检测波长,此处绿原酸亦有较强吸收,于是提高了三组分同时测定的准确度。

色谱条件摸索过程中对流动相中加入酸的类型进行了摸索,试验发现,加入 1% 醋酸,以 235 nm 作为检测波长时,色谱图的基线严重漂移,达不到分离要求,而加 0.4% 的磷酸可以使其基线平稳,符合分

离条件。

[参考文献]

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 405.
- [2] 王新宏, 安睿, 邹云, 等. 双黄连片的多组分质量分析[J]. 药学学报, 2001, 36(12): 917-920.
- [3] 李湘平, 尹桃, 等. 高效液相色谱法同时测定注射用双黄连 3 组分含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(03): 411-412.