

HPLC法同时测定双黄连颗粒中绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷的含量

宁科贤^{1*},黄燕萍^{2#}(1.广西医科大学第一附属医院药学部,南宁 530021;2.广西北海食品药品检验所,广西北海 536000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)40-3819-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.40.24

摘要 目的:建立同时测定双黄连颗粒中绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.80 ml/min,检测波长为277 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷检测质量浓度分别在3.91~78.3、0.84~16.7、1.83~36.5、41.47~829.4 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 8, 0.999\ 9, 0.999\ 8, 0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.23%;平均加样回收率分别为100.59%、101.04%、100.90%、100.76%,RSD分别为1.50%、2.05%、1.95%、1.46%($n=9$)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于双黄连颗粒的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;双黄连颗粒;绿原酸;木犀草苷;连翘苷;黄芩苷

Content Determination of Chlorogenic Acid, Luteolin, Forsythin and Baicalin in Shuanghuanglian Granules by HPLC

NING Ke-xian¹, HUANG Yan-ping²(1.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2.Guangxi Beihai Institute for Food and Drug Control, Guangxi Beihai 536000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination of chlorogenic acid, luteolin, forsythin and baicalin in Shuanghuanglian granules. METHODS: HPLC method was adopted. Eclipse XDB-C₁₈ column was used with mobile phase consisted of methanol-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.80 ml/min. The detection wavelength was set at 277 nm. The column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range were 3.91-78.3 μg/ml for chlorogenic acid($r=0.999\ 8$), 0.84-16.7 μg/ml for luteolin($r=0.999\ 9$), 1.83-36.5 μg/ml for forsythin($r=0.999\ 8$) and 41.47-829.4 μg/ml for baicalin($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, Stability and reproducibility tests were all lower than 1.23%. The average recoveries were 100.59% (RSD=1.50%, $n=9$), 101.04% (RSD=2.05%, $n=9$), 100.90% (RSD=1.95%, $n=9$) and 100.76% (RSD=1.46%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of the granules.

KEYWORDS HPLC; Shuanghuanglian granules; Chlorogenic acid; Luteolin; Forsythin; Baicalin

双黄连颗粒是由金银花、黄芩、连翘3味中药经适宜加工、提取制成的中成药,收载于《中国药典》2010年版(一部)^[1],具有疏风解表、清热解毒之功效,临床用于治疗外感风热所致的感冒,症见发热、咳嗽、咽痛。原标准仅有黄芩苷和连翘苷的含量测定项。有文献报道单独或同时测定双黄连颗粒中绿原酸、连翘苷、黄芩苷的含量^[2-5],但未见同时测定该制剂中绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷4种成分含量的报道。本试验参考有关文献^[1-12],建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定双黄连颗粒中绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷含量的方法,现报道如下。

1 材料

1200型HPLC仪,包含Agilent 1200 LC色谱工作站、G1322A(DEGASSER)溶剂脱气机、G1311A(Quat Pump)四元泵、G1329A(ALS)自动进样器、G1314B VWD紫外检测器(美国Agilent公司);CP225D型电子天平(德国赛多利斯公司);AW-120型电子天平(西班牙COBOS公司);SB3200S型超声波清洗器[必能信超声(上海)有限公司];HT-203A column HEATER型柱温箱(天津市恒奥科技发展有限公司)。

绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-201314、111720-201106、110821-201112、110715-200815,质量分数:96.6%、99.3%、91.8%、95.2%);双黄连颗粒(哈尔滨儿童制药厂有限公司,批号:

中国现代医学杂志,2007,17(2):256.

*主管药师。研究方向:临床药学。电话:0771-5305902

#通信作者:主任药师。研究方向:食品与药品检验。电话:

0779-6803508。E-mail:huangyanping500@163.com

[7] 李建辉,刘丽仙.静滴胞磷胆碱致过敏性休克及心跳骤停-心室分离抢救成功1例[J].中国社区医师:医学专业,2012,14(28):275.

(收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-08-29)

130332;哈药集团中药二厂,批号:130629、130526);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.4%磷酸溶液(B),采用梯度洗脱(梯度洗脱程序见表1);检测波长:277 nm;流速:0.80 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Mobile phase gradient elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	17	83
15	30	70
40	48	52
48	20	80

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷对照品适量,以甲醇为溶剂,配制成每1 ml含绿原酸0.391 mg、木犀草苷0.084 mg、连翘苷0.183 mg、黄芩苷0.415 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品内容物适量,研细,取约0.2 g,精密称定,精密加入70%甲醇20 ml,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,中速滤纸滤过,滤液再用0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方中药味的比例,分别制备不含黄芩、不含连翘和不含金银花的模拟样品,按其工艺制成阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,注入HPLC仪,进样,记录色谱,详见图1。由图1可见,绿原酸峰、木犀草苷峰、连翘苷峰和黄芩苷峰与相邻组分峰的分离度均大于1.5,理论板数按绿原酸峰计大于9 000;且阴性样品在对照品色谱峰相应的位置上无吸收峰出现,表明处方中的其他成分对测定结果无影响。

表2 回归方程及线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	质量浓度, μg/ml				回归方程	线性范围, μg/ml	r		
绿原酸	3.914 2	7.828 5	19.571 2	39.142 3	58.713 6	78.284 5	$y=24.016x-30.700$	3.91~78.3	0.999 8
木犀草苷	0.836 5	1.673 0	4.182 5	8.365 0	12.547 5	16.730 0	$y=18.812x-3.600$	0.84~16.7	0.999 9
连翘苷	1.826 8	3.653 6	9.134 1	18.268 2	27.402 3	36.536 4	$y=12.125x-28.800$	1.83~36.5	0.999 8
黄芩苷	41.467 6	82.936 2	207.338 0	414.676 0	622.014 0	829.352 0	$y=40.890x+1 645.900$	41.47~829.4	0.999 9

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,测定峰面积。结果,绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷峰面积的RSD分别为0.61%、0.95%、0.73%和0.32%,表明仪器的精度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:130332)适量,分别在放置0、1、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样10 μl,测定峰面积。结果,绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷峰面积的RSD分别为0.91%、1.07%、0.88%和0.91%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:130332)细粉约0.2g,共6份,精密称定,分

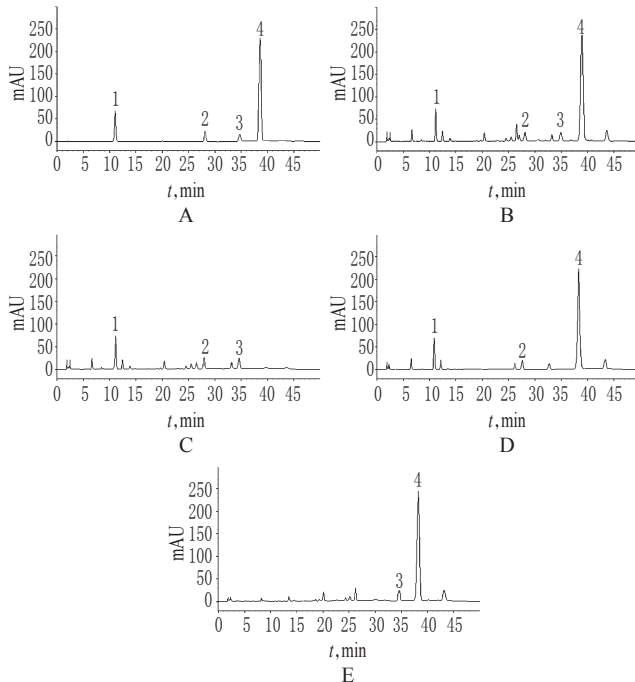


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺黄芩阴性对照; D. 缺连翘阴性对照; E. 缺金银花阴性对照; 1. 绿原酸; 2. 木犀草苷; 3. 连翘苷; 4. 黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control without *Scutellaria baicalensis*; D. negative control without *Forsythia suspensa*; E. negative control without *Lonicera japonica*; 1. chlorogenic acid; 2. luteolin; 3. forsythidin; 4. baicalin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱。以检测质量浓度为横坐标(x, μg/ml),峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程及线性范围详见表2。

别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,各按“2.1”项下色谱条件进样10 μl,测定并计算含量。结果,绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷的平均含量分别为1.476 5、0.235 3、2.413 6、24.384 2 mg/g, RSD分别为1.02%、1.23%、0.87%、0.79%,表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知各成分含量的样品(批号:130332)细粉9份,每份约0.1 g,精密称定,每3份分别精密加入一定量的绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表3。

2.9 样品含量测定

取不同批号的双黄连颗粒,按“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积,以外标一点法计算绿原酸、木犀草苷、连翘苷和黄芩苷的含量,结果见表4。

表3 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 3 Result of recovery tests(n=9)

待测成分	称样量,	所含量,	加入量,	测得量,	加样回收率, 平均加样回收率, RSD,	
	g	mg	mg	mg	%	%
绿原酸	0.101 2	0.149 3	0.078 3	0.226 4	98.49	
	0.103 3	0.152 4	0.078 3	0.232 0	101.70	
	0.102 5	0.151 2	0.078 3	0.231 7	102.76	
	0.100 6	0.148 4	0.156 6	0.305 4	100.25	
	0.101 7	0.150 0	0.156 6	0.309 2	101.69	100.59
	0.101 6	0.149 9	0.156 6	0.307 4	100.63	1.50
	0.103 9	0.153 3	0.234 8	0.383 9	98.21	
	0.100 3	0.148 0	0.234 8	0.386 1	101.38	
	0.106 2	0.156 7	0.234 8	0.391 9	100.18	
	木犀草苷	0.101 2	0.023 9	0.011 7	0.035 4	98.18
0.103 3		0.024 4	0.011 7	0.036 4	103.13	
0.102 5		0.024 2	0.011 7	0.036 1	101.68	
0.100 6		0.023 7	0.023 4	0.047 9	103.26	
0.101 7		0.024 0	0.023 4	0.047 6	100.62	101.04
0.101 6		0.024 0	0.023 4	0.047 3	99.70	2.05
0.103 9		0.024 5	0.035 1	0.059 9	100.63	
0.100 3		0.023 7	0.035 1	0.060 1	103.73	
0.106 2		0.025 1	0.035 1	0.059 6	98.41	
连翘苷		0.101 2	0.244 2	0.116 9	0.363 2	101.78
	0.103 3	0.249 3	0.116 9	0.364 9	98.91	
	0.102 5	0.247 3	0.116 9	0.368 2	103.71	
	0.100 6	0.242 7	0.233 9	0.472 6	98.28	
	0.101 7	0.245 4	0.233 9	0.478 5	99.66	100.90
	0.101 6	0.245 2	0.233 9	0.485 1	102.59	1.95
	0.103 9	0.250 7	0.350 8	0.601 8	100.09	
	0.100 3	0.242 1	0.350 8	0.604 0	103.20	
	0.106 2	0.256 2	0.350 8	0.606 5	99.84	
	黄芩苷	0.101 2	2.467 8	1.199 0	3.678 2	100.95
0.103 3		2.519 0	1.199 0	3.697 1	98.26	
0.102 5		2.499 5	1.199 0	3.731 9	102.78	
0.100 6		2.453 2	2.398 1	4.876 1	101.04	
0.101 7		2.480 0	2.398 1	4.870 8	99.70	100.76
0.101 6		2.477 5	2.398 1	4.902 9	101.14	1.46
0.103 9		2.533 6	3.597 1	6.233 1	102.84	
0.100 3		2.445 8	3.597 1	6.035 1	99.78	
0.106 2		2.589 7	3.597 1	6.198 6	100.33	

表4 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples (mg/g, n=3)

批号	绿原酸	木犀草苷	连翘苷	黄芩苷
130332	1.475 2	0.235 9	2.412 9	24.385 3
130629	0.344 5	0.438 4	0.889 5	24.882 9
130526	0.450 2	0.172 8	1.044 4	40.154 3

3 讨论

3.1 流动相的选择

本试验参照《中国药典》2010年版(一部)比较了甲醇-水-冰醋酸(50:5:1, V/V/V)、乙腈-水(25:75, V/V)、甲醇-水-磷酸(47:53:0.2, V/V/V)、乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87, V/V)、甲醇-0.4%磷酸溶液等不同流动相的出峰情况。结果发现,对双黄连颗粒而言选择甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相进行梯度洗

脱,待测成分分离较好且峰形较佳。

3.2 检测波长的选择

经紫外-可见分光光度法测定,绿原酸在277和324 nm波长处有最大吸收,连翘苷的最大吸收波长为277 nm,黄芩苷在276和315 nm波长处有最大吸收,木犀草苷在255和350 nm波长处有最大吸收。进而比较了混合对照品溶液各成分在255和277 nm波长下的峰面积,发现绿原酸变化不大,木犀草苷在277 nm下的峰面积是255 nm下的61%,而连翘苷在255 nm下的信号很弱,黄芩苷的信号则增强了2.5倍。故最终选用277 nm为本试验的测定波长,以提高各种成分的检测灵敏度。

3.3 提取溶剂及方法的选择

分别用甲醇、70%甲醇和70%乙醇加热回流或超声处理等进行样品提取考察。结果发现,采用70%甲醇超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min提取效果最佳。故本试验最终选用此提取溶剂及方法。

3.4 其他

表4的结果表明,不同生产厂家的绿原酸、连翘苷含量差异较大;而同一厂家不同批号的产品则是木犀草苷和黄芩苷含量差异较大,这可能是由于药材的品质及工艺的差别所造成。但是,各厂家药物的用法与用量却相同,这使得本品在临床应用时,有可能会产生较大的药效偏差,甚至产生副作用。因此,为了保证患者的用药安全,需更好地完善其质量标准以有效反映制剂质量。

综上所述,本方法简便、准确、重复性好,可用于双黄连颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:614、159、205、282.
- [2] 赵霞,杨丽.HPLC法测定双黄连颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(1):59.
- [3] 张洪涛,蔡俊安,郭鑫慧.双黄连颗粒中绿原酸含量的HPLC测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(4):43.
- [4] 杨立志,杨瑞琪,姜雪敏.HPLC法测定双黄连颗粒中连翘苷的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(8):754.
- [5] 韩秋伟.紫外-可见分光光度法测定双黄连颗粒中黄芩苷的含量[J]. 牡丹江医学院学报, 2012, 33(2):21.
- [6] 孟宪亮.HPLC法同时测定双黄连口服液液中绿原酸连翘苷和黄芩苷[J]. 医学信息, 2013, 26(6):157.
- [7] 汤须崇,肖美添,叶静.HPLC法同时测定双黄连制剂中绿原酸、黄芩苷和连翘苷的含量[J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(3):64.
- [8] 乔静,李洪亮.HPLC法同时测定大卫颗粒中绿原酸、连翘苷、黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(7):985.
- [9] 田雁钰. HPLC双波长梯度洗脱法同时测定退热解毒注射液中绿原酸、连翘苷、丹皮酚的含量[J]. 中国药品标准, 2011, 12(2):119.
- [10] 刘刚,谭生建,张华,等.HPLC法同时测定双黄连口服液中绿原酸连翘苷和黄芩苷的含量[J]. 解放军药理学学报, 2009, 25(5):461.
- [11] 宋明侠. HPLC法同时测定复方金银花颗粒中绿原酸、连翘苷和黄芩苷的含量[J]. 按摩与康复医学, 2011(5下):31.
- [12] 安益强,汤道权,印晓星,等.HPLC法同时测定双黄连颗粒中9种成分[J]. 中草药, 2012, 43(1):91.

(收稿日期:2014-03-27 修回日期:2014-07-08)