

高效液相色谱法同时测定银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含量

谭生建,刘刚,张捷,刘昌叶,潘敏翔,常华(中国人民解放军第306医院药学部,北京100101)

摘要 目的:建立 HPLC 同时测定银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含量的方法。方法:色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为固定相(Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4.6 ×150 mm, 5 μm)。流动相:A为甲醇-水-磷酸(50:950:5),B为甲醇;梯度洗脱程序:0~30,A:95%~35%,B:5%~65%;流速:1 mL/min,检测波长 327 nm。结果:绿原酸和黄芩苷的保留时间分别约为 10.5 min 和 23.8 min,与各自相邻峰的分离度均大于 1.5。以峰面积(X)对进样浓度(Y, μg/mL)线性回归,绿原酸回归方程:Y=0.032 00X-0.021 60, r=0.999 9, 线性范围 5.040~45.36 μg/mL,黄芩苷回归方程:Y=0.049 70X-0.488 0, r=0.999 9, 线性范围:44.88~403.9 μg/mL。绿原酸、黄芩苷回收率分别为 95.7%和 99.0%,RSD 分别为 0.43%,0.33%。结论:本方法回收率测定以及与药典法含量测定结果比较,显示本法测定结果准确,且操作简便,精密度好。

关键词 高效液相色谱法;银黄口服液;绿原酸;黄芩苷

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2008)02-0138-03

Simultaneous determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang oral liquid by HPLC

TAN Sheng-jian, LU Gang, ZHANG Jie, LU Chang-ye, PAN Min-xiang, CHANG Hua (Department of Pharmacy, No. 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China)

ABSTRACT Objective: To develop a HPLC quantitative method for the determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang Oral liquid. **Methods:** An Agilent C₁₈ column (ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4.6 ×150 mm, 5 μm) was used and a mixture of methanol-water-phosphoric acid (50:950:5) was used as mobile phase A, methanol as mobile phase B, gradient elution: 0~30, A: 95%~35%, B: 5%~65%. The flow rate was 1.0 mL/min and monitored at 327 nm. **Results:** The retention time of chlorogenic acid and baicalin were 10.5 min and 23.8 min, respectively. The regress equation for chlorogenic acid was Y=0.032 00X-0.021 60, r=0.999 9, and the linear range was 5.040~45.36 μg/mL. Baicalin was Y=0.049 70X-0.488 0, r=0.999 9 and the linear range was 44.88~403.9 μg/mL. The average recovery of chlorogenic acid and baicalin were (n=6) 95.7% and 99.0%; RSD 0.43% and 0.33% respectively. **Conclusion:** Between the determination of this method in CP 2005, this method was sensitive, time-saving and accurate.

KEY WORDS HPLC; Yinhuang oral liquid; chlorogenic acid; baicalin

银黄口服液由金银花提取物和黄芩提取物加工制成,收载于中国药典(2005年版一部),含量测定是采用高效液相色谱法分别测定绿原酸和黄芩苷含量。其中,绿原酸测定采用乙腈-磷酸-水为流动相,黄芩苷测定采用甲醇-磷酸-水为流动相。金银花和黄芩组方的制剂中的绿原酸和黄芩苷含量测定报道有高效液相色谱法^[1~4]等。本研究建立了线性梯度洗脱高效液相色谱法同时测定银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含量的方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1200系列),含 G1311 A 四元色谱泵、G1329 A 自动进样器、G1315 B 二极管阵列检测器、G2170 BA 色谱工作站、G1316 A 柱温箱和 G1379 B 在线脱气机。绿原酸对照品(批号:110753-200413)和黄芩苷对照品(批号:110715-200514)购自中国药品生物制品检定所。银黄口服液(20061211、20061212、20061213)由本院制剂室制备。甲醇(DMA TECHNOLOGY NC, LOT: 61120)色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试验用溶液制备 精密称取绿原酸对照品 12.60 mg,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为绿原酸对照品储备溶液;精密称取黄芩苷对照品 22.44 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为黄芩苷对照品储备溶液;分别精密量取绿原酸对照品储备溶液 10 mL 和黄芩苷对照品储备溶液 25 mL,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为绿原酸对照品和黄芩苷对照品混合溶液(每 1 mL 含绿原酸 25.20 μ g,含黄芩苷 224.4 μ g)。

按照中国药典银黄口服液项下的处方和制法,分别制备不含金银花提取物和不含黄芩提取物的制剂,分别作为银黄口服液的绿原酸阴性样品和黄芩苷阴性样品。精密量取绿原酸阴性样品和黄芩苷阴性样品溶液各 1 mL,分别置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,分别作为各自的阴性供试品

溶液。精密量取银黄口服液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为银黄口服液的供试品溶液。

2.2 系统适用性试验

2.2.1 理论板数和分离度 分析色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为固定相(Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4.6 \times 150 mm, 5 μ m);流动相 A 为甲醇-水 磷酸(50:950:5),流动相 B 为甲醇,梯度洗脱程序:0~30, A:95%~35%, B:5%~65%;检测波长:327 nm。流速:1 mL/min。在此色谱条件下,分别取对照品混合溶液、黄芩苷阴性供试品溶液、绿原酸阴性供试品溶液和银黄口服液供试品溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见图 1。图 1 显示,银黄口服液中的其他成分对绿原酸和黄芩苷的测定没有干扰。在图 1 中,绿原酸和黄芩苷的保留时间分别约为 10.5 min 和 23.8 min,理论板数分别约为 2800 和 3000,绿原酸和黄芩苷与相邻峰的分离度均大于 1.5。

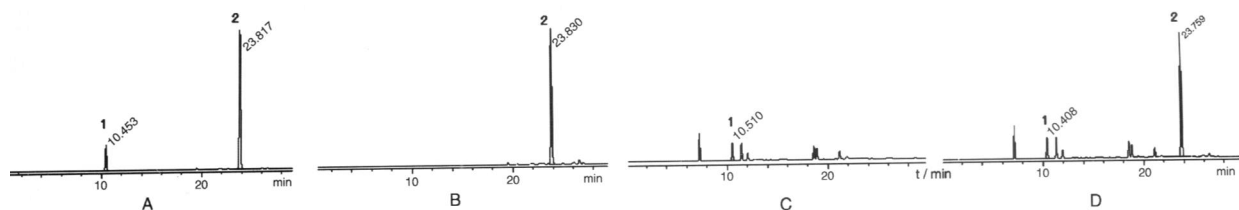


图 1 对照品和样品色谱图

A 绿原酸和黄芩苷混合溶液; B 黄芩苷阴性溶液; C 绿原酸阴性溶液; D 银黄口服液; 1 绿原酸; 2 黄芩苷

2.2.2 对照品溶液进样重复性 取绿原酸对照品和黄芩苷对照品混合溶液重复进样 5 次,记录色谱峰面积,其 RSD 分别为 0.14% 和 0.20%。

2.3 样品测定重复性 按样品测定方法,制备 6 个同一浓度的供试品溶液,分别测定含量,绿原酸含量的 RSD ($n=6$) 为 0.43%,黄芩苷含量的 RSD ($n=6$) 为 0.33%。

2.4 线性关系 分别精密量取绿原酸对照品储备液(每 1 mL 含绿原酸 126.0 μ g)适量,用 50% 甲醇稀释成每 1 mL 含 5.04、15.12、25.20、35.28 和 45.36 μ g 的浓度,置自动进样器中,各进样 10 μ L,记录色谱峰面积分别为 158.2、473.1、791.1、1104.7 和 1419.8,以进样浓度对峰面积线性回归,得回归方程: $Y=0.03200x-0.02160$, $r=0.9999$ 线性范围: 5.040~45.36 μ g/mL。

分别精密量取黄芩苷对照品储备液(每 1 mL 含绿原酸 448.8.0 μ g)适量,用 50% 甲醇稀释成每 1 mL 含 44.88、134.6、224.4、314.2 和 403.9 μ g 的

浓度,置自动进样器中,各进样 10 μ L,记录色谱峰面积分别为 905.8、2720.8、4526.8、6324.3 和 8125.8,以进样浓度对峰面积线性回归,得回归方程: $Y=0.04970X-0.4880$, $r=0.9999$ 线性范围: 44.88~403.9 μ g/mL。

2.5 定量限 取绿原酸对照品溶液稀释至峰高约为基线噪音的 10 倍,测得绿原酸和黄芩苷的定量限均约为 0.5 μ g/mL。

2.6 加样回收率 精密量取绿原酸对照品和黄芩苷对照品混合溶液(每 1 mL 含绿原酸 25.20 μ g,含黄芩苷 224.4 μ g) 10 mL,置 25 mL 量瓶中,加入银黄口服液的供试品溶液(批号 20061211)稀释至刻度(即:加入 15 mL 银黄口服液的供试品溶液),作为加样回收样品。同法制备 6 个同一浓度的加样回收样品,测定 6 次,另精密量取 50% 甲醇 10 mL,置 25 mL 量瓶中,加同一批号的银黄口服液的供试品溶液(15 mL)稀释至刻度,作为空白样品。将各样品溶液置自动进样器中,分别取 10 μ L 进样测定,计

算回收率。绿原酸和黄芩苷加样回收率测定结果见表 1 和表 2。

表 1 绿原酸加样回收率测定结果 ($n=6$)

编号	空白量 (μg)	加入量 (μg)	测得总量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	298.5	252.0	541.5	96.4		
2	298.5	252.0	539.5	95.7		
3	298.5	252.0	538.9	95.4	95.7	0.43
4	298.5	252.0	539.4	95.6		
5	298.5	252.0	538.7	95.3		
6	298.5	252.0	540.3	96.0		

表 2 黄芩苷加样回收率测定结果 ($n=6$)

编号	空白量 (μg)	加入量 (μg)	测得总量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	3743.9	2244.0	5978.4	99.6		
2	3743.9	2244.0	5969.5	99.2		
3	3743.9	2244.0	5961.6	98.8	99.0	0.33
4	3743.9	2244.0	5961.2	98.8		
5	3743.9	2244.0	5960.7	98.8		
6	3743.9	2244.0	5960.0	98.8		

2.7 与药典含量测定方法比较 分别按照药典含量测定和本文含量测定项下的方法测定了 3 批银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含量,结果见表 3。

表 3 结果显示,药典法和本法含量测定结果基本一致,两种含量测定方法间的测定误差不大于 1.5%。

2.8 耐用性

2.8.1 供试品溶液稳定性 配制供试品溶液,8 h 内重复进样测定 8 次,绿原酸和黄芩苷含量的 RSD 均不大于 0.45%,显示供试品溶液至少在 8 h 内稳定。

2.8.2 流动相的组成比例和 pH 在研究分析方法的过程中可以看出,梯度洗脱时,有机相和水相的比例有小的变动,但对测定结果没有明显影响;磷酸加入量(即 pH)有小的变动,对测定结果也没有明显影响。

2.9 样品测定

2.9.1 对照品溶液制备 取绿原酸对照品约 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为绿原酸对照品储备溶液;取黄芩苷对照品约 18 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为黄芩苷对照品储备溶液;分别精密量取绿原酸对照品储备溶液 10 mL 和黄芩苷对照品储备溶液 25 mL,置 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 含绿原酸约 20 μg ,含黄芩苷 180 μg)。

2.9.2 供试品溶液的制备 精密量取银黄口服液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.9.3 测定法 取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,分别注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,按外标法以峰面积计算绿原酸和黄芩苷含量,即得。

测定了 3 批样品,结果见表 3。

表 3 药典法和本法测定绿原酸和黄芩苷含量的比较

样品批号	药典法 (mg/mL)		本法 (mg/mL)	
	绿原酸含量	黄芩苷含量	绿原酸含量	黄芩苷含量
20061211	1.975	24.73	1.990(100.8%)	24.96(100.9%)
20061212	1.804	18.60	1.777(98.5%)	18.65(100.3%)
20061213	1.895	33.2	1.906(100.6%)	33.3(100.3%)

注:括号内的数据表示为相当药典法测定结果的百分率

3 讨论

3.1 绿原酸在 327 nm 波长处有最大吸收 黄芩苷在此波长处为峰吸收值的变化比较平缓的肩部,由于在银黄口服液中绿原酸的含量及其吸收值相对较低(绿原酸含量下限是每 1 mL 不得少于 1.7 mg,而黄芩苷含量下限是每 1 mL 不得少于 18.0 mg),测定中为了尽量提高绿原酸的吸收面积,故选定 327 nm 作为检测波长,此波长下,黄芩苷灵敏度也可以满足准确测定的要求。

3.2 加样回收率 测定以及药典法与本法含量测

定结果比较,显示本法测定结果准确,且操作简便。

参考文献:

- [1] 刘冰,王蓉华,徐永波. HPLC 法同时测定银黄胶囊中绿原酸、黄芩苷含量[J]. 中国药事, 2006, 20(5): 303.
- [2] 王守箐,王宏,李冠忠. HPLC-二级管阵列检测器测定银黄胶囊中绿原酸、黄芩苷含量[J]. 山东医药工业, 2003, 22(2): 14.
- [3] 钱江. HPLC 法测定银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含量[J]. 中成药, 2003, 25(2): 53.
- [4] 曲秀梅,金国成. 高效液相色谱法测定银黄口服液中绿原酸和黄芩苷含量[J]. 黑龙江医药科学, 2004, 27(4): 57.

收稿日期: 2007-03-19