

高效液相梯度洗脱法测定银黄含片中 黄芩苷、绿原酸和芦丁

孙晓东^① 王文辉 杨俊 朱艳琴 王齐
(昆明理工大学分析测试研究中心 昆明市学府路 253 号 650093)
(云南省分析测试中心 昆明市学府路 253 号 650093)

摘 要 建立了反相高效液相色谱法同时测定银黄含片中的黄芩苷、绿原酸和芦丁。采用 Hypersil ODS C18 柱(200mm×4.6mm, 粒径 5μm), 流动相 A: 甲醇-水-乙酸(10:88:2) 和流动相 B: 甲醇-水-乙酸(88:10:2), 梯度洗脱程序 0min(A:B/97:3)–10min(A:B/73:27)–25min(A:B/20:80)–36min(A:B/20:80); 流速 1.0mL/min; 检测波长为 327nm 和 280nm; 柱温 25℃。黄芩苷线性范围为 0.051–0.512μg/mL, $r=0.9990$, 样品的平均加标回收率为 98.23%, (RSD 为 2.13%); 绿原酸线性范围为 0.059–0.592μg/mL, $r=0.9996$, 样品的平均加标回收率为 97.61%, (RSD 为 2.13%); 芦丁线性范围为 0.087–0.868μg/mL, $r=0.999$, 样品的平均加标回收率为 98.56%, (RSD 为 1.13%), 该方法专属性强, 结果稳定, 重现性好, 能有效地控制药品的主成分含量, 具有较强的实用价值。

关键词 高效液相色谱; 梯度洗脱; 黄芩苷; 绿原酸; 芦丁

中图分类号: O657.7+2 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2010)04-1282-04

1 引言

银黄含片由金银花和黄芩提取物制备而成, 具有清热、解毒、消炎的作用, 被广泛用于治疗上呼吸道感染、急性慢性扁桃体炎、急性慢性咽喉炎^[1]。其药剂组方中的黄芩苷、绿原酸和芦丁含量测定报道有高效液相色谱法^[2–6], 但同时测定这 3 种成分含量的方法目前未见报道, 本文建立了线性梯度洗脱高效液相色谱法同时测定银黄含片中黄芩苷、绿原酸和芦丁含量的方法。该方法分离效果好、灵敏、准确, 可达到较好的控制产品质量的目的。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 600 型高效液相色谱仪, Waters 2487 型紫外检测器, Waters 717 型自动进样器(美国 Waters 公司); SB3200 型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司); AE240S 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

甲醇(色谱纯); 乙酸(分析纯); 黄芩苷、绿原酸和芦丁对照品(中国药品生物制品检定所)。实验用水为双重蒸馏水。

^① 联系人, 手机: (0) 13708724635; E-mail: tonny7828@163.com

作者简介: 孙晓东(1978—), 男, 四川省平昌县人, 助理工程师, 主要从事食品和天然药物的分析。

收稿日期: 2009-12-30; 接受日期: 2010-02-01

2.2 试验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS C18 柱 (200mm × 4.6mm, 粒径 5μm), 流动相 A: 水-甲醇-乙酸 (88:10:2), 流动相 B: 水-甲醇-乙酸 (10:88:2), 流速: 1.0mL · min⁻¹, 检测波长为 327nm 和 280nm, 柱温 25℃, 紫外检测器, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	流量 (mL/min)
0	97	3	1.0
10	73	27	1.0
25	20	80	1.0
36	20	80	1.0

2.2.2 对照品溶液的制备

准确称取减压干燥至恒重的黄芩苷对照品 1.28mg、绿原酸对照品 1.48mg 和芦丁对照品 2.17mg, 用甲醇溶解后定容于 50mL 容量瓶中, 配制成含黄芩苷 25.6mg/L、绿原酸 29.6mg/L 和芦丁 43.4mg/L 的对照品混合溶液, 用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2.3 样品溶液的制备

将银黄含片粉碎, 称取约 2g, 置于具塞三角烧瓶中, 加入乙醇 40mL, 超声提取 60min, 过滤, 滤渣用乙醇洗涤 2 次, 合并滤液, 转移至 50mL 量瓶中, 用乙醇稀释至刻度, 用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 即得。

3 结果与讨论

3.1 测定波长的选择

本文选择 327nm 和 280nm 为检测波长, 由于在 327nm 时基线对黄芩苷的测定影响较大, 而在 280nm 以下时对其影响较小, 因此黄芩苷的测定选择 280nm, 绿原酸和芦丁的测定选择 327nm。

3.2 线性关系

分别准确吸取对照品混合溶液 2.0、5.0、10.0、20.0μL 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品的浓度 (μg/mL) 为横坐标, 以峰面积 (μV · s) 为纵坐标, 进行线性拟合, 黄芩苷的回归方程为: $y = 5.09 \times 10^4 x + 2.41 \times 10^2$ ($r = 0.999$), 绿原酸的回归方程为: $y = 3.54 \times 10^4 x + 3.24 \times 10^2$ ($r = 0.9996$), 芦丁的回归方程为: $y = 1.18 \times 10^4 x + 1.57 \times 10^2$ ($r = 0.9992$)。表明当黄芩苷进样量在 0.051—0.512μg/mL, 绿原酸进样量在 0.059—0.592μg/mL, 芦丁进样量在 0.087—0.868μg/mL 范围内线性关系良好。

3.3 精密度

取对照品混合溶液重复进样 5 次, 进样量 10μL, 以峰面积积分值计算, 黄芩苷峰面积 RSD 为 0.21%, 绿原酸峰面积 RSD 为 0.34%, 芦丁峰面积 RSD 为 0.19%。表明仪器精密度良好。

3.4 重复性实验

准确称取样品 6 份, 制备成样品溶液, 进样 10μL, 按外标法计算。黄芩苷峰面积 RSD 为 1.35%, 绿原酸峰面积 RSD 为 2.57%, 芦丁峰面积 RSD 为 2.08%。

3.5 回收率测定

准确称取样品 6 份, 每份约 0.5g, 按高、中、低 3 种浓度称入适量对照品, 制备样品溶液, 测定

加标样品中 3 组分的量分别见表 2、表 3、表 4。

表 2 黄芩苷的加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.5124	9.2012	5.3200	14.1567	97.49	98.23	2.13
0.5247	9.3860	10.2300	19.3551	98.67		
0.5110	9.1860	16.5700	25.5124	98.53		

表 3 绿原酸的加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.5024	2.3350	1.3700	3.5986	97.13	97.61	2.13
0.5251	2.4160	2.1400	4.5314	99.46		
0.5307	2.5436	4.2300	6.5189	96.24		

表 4 芦丁的加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.5347	1.7025	1.1400	2.7399	96.39	98.56	1.13
0.5161	1.5674	1.6500	3.2628	101.41		
0.5244	1.6258	2.8700	4.4005	97.88		

黄芩苷、绿原酸和芦丁的平均加标回收率分别为 98.23%(RSD 为 2.13%)、97.61%(RSD 为 2.13%)和 98.56%(RSD 为 1.13%)。

3.6 样品含量测定

按 2.2.3”所述方法制备样品溶液,将标准溶液与样品溶液注入高效液相色谱仪,样品平行 3 次,标准溶液中黄芩苷、绿原酸和芦丁的峰面积见图 1,样品溶液中黄芩苷、绿原酸和芦丁的峰面积见图 2 按外标法计算,测定结果见表 5。

表 5 样品中黄芩苷、绿原酸和芦丁的含量测定结果 (n= 3)

样品名称	黄芩苷含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	绿原酸($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	芦丁($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	36.85	9.34	6.53
2	37.52	9.31	6.43
3	34.89	9.26	6.27

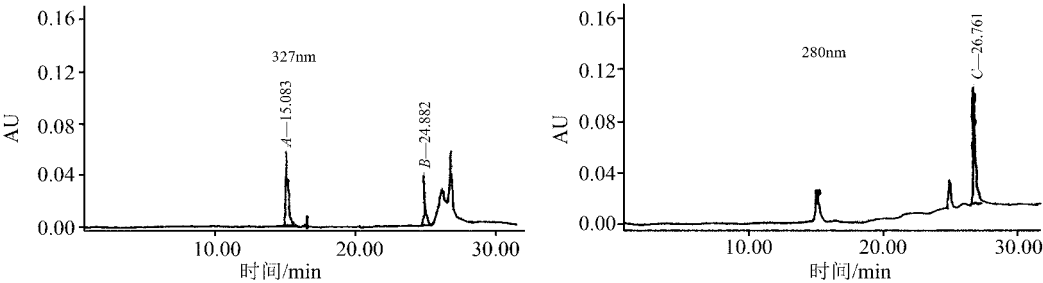


图 1 对照品 HPLC 色谱图
A——绿原酸;B——芦丁;C——黄芩苷。

4 结论

(1) 图 1 是对照品在波长 327nm 和 280nm 测定的色谱图,比较二者,在 327nm 测定条件下,由于试剂空白的影响黄芩苷无法与试剂空白产生的峰完全分离,因此无法对黄芩苷进行定量测定,但

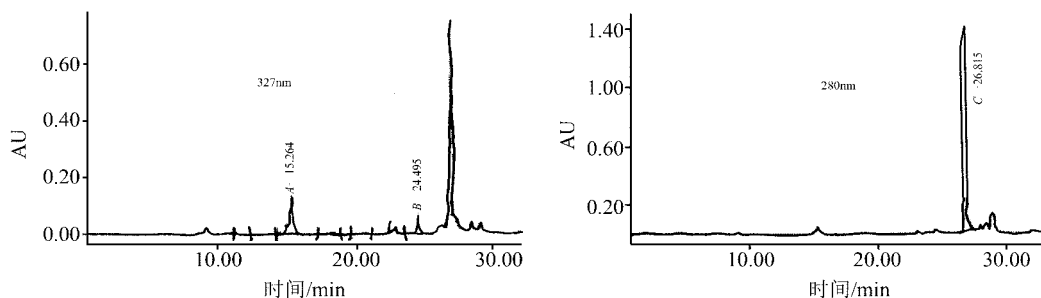


图 2 样品 HPLC 色谱图

A——绿原酸; B——芦丁; C——黄芩苷。

在 280nm 时试剂空白对黄芩苷的测定无影响, 在测定黄芩苷时选用 280nm, 测定绿原酸和芦丁时选用 327nm。

(2) 采用 RP-HPLC 同时测定银黄含片中的黄芩苷、绿原酸、芦丁的含量取得了较好的效果, 可为全面控制金银花的质量提供一定的参考。

参考文献

- [1] 张喜平, 田华, 程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状[J]. 中国药理学通报, 2003, **19**(11): 1212.
- [2] 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.
- [3] 王守箐, 王宏, 李冠忠. HPLC-二极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.
- [4] 钱江. HPLC 法测定银黄口服液中的绿原酸和黄芩苷含量[J]. 中成药, 2003, **25**(2): 53.
- [5] 曲秀梅, 金国成. 高效液相色谱法测定银黄口服液中的绿原酸和黄芩苷含量[J]. 黑龙江医药科学, 2004, **27**(4): 57.
- [6] 郝凤霞, 郝洪涛, 杨敏丽. RP-HPLC 法同时测定金银花中绿原酸·芦丁·木犀草素的含量[J]. 安徽农业科学, 2009, **37**(24): 11545—11546.

Determination of Baicalin, Chlorogenic Acid and Rutin in the Yin Huang Buccal Tablets by HPLC with Gradient Elution

SUN Xiao-Dong WANG Wen-Hui YANG Jun ZHU Yan-Qin WANG Qi

(Research Center for Analysis and Measurement, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, P. R. China)

(Analytic and Testing Research Center of Yunnan, Kunming 650093, P. R. China)

Abstract A method for simultaneous determination of baicalin, chlorogenic acid and rutin in the yin huang buccal tablets was developed. A hypersil ODS C18(4.6mm×200mm, 5μm) column was used. A mixture of methanol-water-acetic acid(10:88:2) was used as mobile phase A and the mixture of methanol-water-acetic acid(88:10:2) as mobile phase B. Phase A→phase B in gradient elution: 0 min (97:3)→10min (73:27)→25min (20:80)→36min (20:80) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 327 nm and 280 nm and the column temperature was 25℃. The calibration curve was linear in the range of 0.051—0.512μg/mL for baicalin($r=0.9990$), average recovery was 98.23% and RSD was 2.13% ($n=6$). The calibration curve was linear in a range of 0.059—0.592μg/mL for chlorogenic acid($r=0.9996$), average recovery was 97.61% and RSD was 2.13% ($n=6$). The calibration curve was linear in a range of 0.087—0.868μg/mL for rutin ($r=0.9992$), average recovery was 98.56% and RSD was 1.13% ($n=6$). The method is sensitive, reproducible, and suitable for the quality control of the yin huang buccal tablets.

Key words HPLC; Gradient Elution; Baicalin; Chlorogenic Acid; Rutin