

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01191

高效液相色谱法测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的含量

费扬,赵亮,张海,金柔男,吕磊,张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科,上海 200438

[摘要] **目的:**采用高效液相色谱法测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的含量。**方法:**抗菌消炎片去包衣粉末用50%甲醇超声提取30 min;色谱柱为Agilen Eclipse Plus-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A相为0.1%磷酸水溶液,B相为甲醇,C相为乙腈,梯度洗脱;流速:0.8 ml/min;温度:30℃;进样量:10 μl;检测波长:254 nm。**结果:**绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚4种成分在45 min内基线分离。峰面积(Y)对浓度(X)的标准曲线分别为:绿原酸 $Y=12.89X-12.66$, $r=0.9999$;黄芩苷 $Y=13.96X-1.013$, $r=1.0$;黄芩素 $Y=35.82X-4.923$, $r=0.9999$;大黄酚 $Y=44.16X-3.280$, $r=0.9999$ 。方法学考察表明,日内及日间精密度、最低检测限均符合相关标准,加样回收率分别为($n=3$):绿原酸101.5%(RSD=1.6%);黄芩苷103.4%(RSD=1.4%);黄芩素99.3%(RSD=2.0%);大黄酚98.1%(RSD=1.7%)。**结论:**采用高效液相色谱法同时测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的含量,样品处理简便,测定结果准确,可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法;抗菌消炎片;绿原酸;黄芩苷;黄芩素;大黄酚

[中图分类号] R 286.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)10-1191-04

High performance liquid chromatography in determination of chlorogenic acid, baicalin, emodin and chrysophanol contents in *Kangjunxiaoyan* tablet

FEI Yang, ZHAO Liang, ZHANG Hai, JIN Rou-nan, LÜ Lei, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of chlorogenic acid, baicalin, emodin and chrysophanol contents in *Kangjunxiaoyan* tablet. **Methods:** After removing the coating, the powder of *Kangjunxiaoyan* tablet was extracted by 50% methanol for 30 min using the following condition: analytical column, Agilent Eclipse Plus-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm); mobile phase: A, 0.1% (v/v) phosphoric acid-water, B, methanol, C, acetonitrile with gradient elution. The flow rate was 0.8 ml/min; the detection wavelength was set at 254 nm; the temperature of column was 30℃; and the injection volume was 10 μl. **Results:** The title compounds were separated at baseline within 45 min with good linear, with the regression being $Y=12.89X-12.66$, $r=0.9999$ for chlorogenic acid, $Y=13.96X-1.013$, $r=1.0000$ for baicalin, $Y=35.82X-4.923$, $r=0.9999$ for emodin, and $Y=44.16X-3.280$, $r=0.9999$ for chrysophanol. The intra-day and inter-day precisions and the limits of detection were all within the normal range. The recovery rates ($n=3$) were: chlorogenic acid 101.5% (RSD=1.6%), baicalin 103.4% (RSD=1.4%), emodin 99.3% (RSD=2.0%), and chrysophanol 98.1% (RSD=1.7%). **Conclusion:** HPLC is a simple, accurate, stable, and reliable method in determining the contents of chlorogenic acid, baicalin, emodin, and chrysophanol in *Kangjunxiaoyan* tablet, and it can be used for quality control of this preparation.

[KEY WORDS] high performance liquid chromatography; *Kangjun Xiaoyan* table; chlorogenic acid; baicalin; emodin; chrysophanol
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1191-1194]

抗菌消炎片为卫生部药品标准^[1]收载品种,由金银花、百部、黄芩、大黄、大青叶、知母、金钱草等7味中药组成,具有清热、泻火、解毒的功效,用于风热感冒、咽喉肿痛、实火牙痛^[2]。方中金银花清热解毒,凉散风热,其有效成分为绿原酸^[2];黄芩清热燥

湿、泻火解毒、止血,其有效成分为黄芩苷、黄芩素^[3];大黄泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、活血祛瘀,其有效成分为大黄酚、大黄素、大黄酸等。在《中国药典》(2005年版)^[4]中并未收入有关抗菌消炎片含量测定的方法和标准。金银花作为抗菌消炎片组

[收稿日期] 2009-05-09 **[接受日期]** 2009-06-25

[作者简介] 费扬,药师. E-mail: feiyangqy@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com

方的君药,对其有效成分绿原酸的含量进行控制具有重要意义。本实验从中药方剂组方原则出发,改进文献^[5-6]方法,采用高效液相色谱(HPLC)法测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的含量,不仅同时对抗菌消炎片中的主要药效成分、相关药效成分进行了含量测定,而且还对辅助药效成分也进行了测定,可以较全面地对抗菌消炎片的质量进行控制。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 高效液相色谱仪;在线脱气机,四元泵,自动进样器,二极管阵列检测器,ChemStation 色谱工作站,色谱柱为 Agilen Eclipse Plus-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),METTLER AE240 电子天平;KUDOS-SK2200H 型超声仪。

1.2 试剂 对照品绿原酸(110753-200413)、黄芩苷(0715-9909)、黄芩素(0756-9908)和大黄酚(110796-200513)购自中国药品生物制品检定所。抗菌消炎片购自上海雷允上药店(济南宏济堂制药有限责任公司,规格:12片×2板×2袋/盒,批号:0704001)。甲醇(Fisher公司)、乙腈(Fisher公司)、磷酸(上海试剂四厂昆山分厂)为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚适量,分别置于2个10 ml 的量瓶中,绿原酸用50%甲醇溶解并稀释至刻度,黄芩苷、黄芩素和大黄酚用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述对照品溶液,稀释成浓度分别为416、208.2、104.1、41.64、20.82、10.41 μg/ml 的绿原酸对照品溶液,浓度为867.2、346.88、173.44、86.72、34.69、17.34 μg/ml 的黄芩苷对照品溶液,浓度为51.19、20.48、10.24、5.12、2.05、1.02 μg/ml 的黄芩素对照品溶液,浓度为16、8、4、1.6、0.8、0.4 μg/ml 的大黄酚对照品液,置于4℃冰箱保存备用。

2.2 供试品溶液的制备 取抗菌消炎片5片,去除包衣用研钵碾成细粉,精密称取上述粉末0.25 g,置50 ml 具塞锥形瓶中,加20 ml 50%甲醇超声处理(90 W,59 kHz)30 min。溶液过0.22 μm 滤膜,取续滤液,即得供试品溶液,置于4℃冰箱保存备用。

2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A相为0.1%磷酸水溶液,B相为甲醇,C相为乙腈,梯度洗脱(0~10 min:80%→75%A,15%→20%B,5%C;

10~15 min:75%→50%A,20%→50%B,5%→0%C;15~20 min:50%A,50%B;20~25 min:50%A,50%→30%B,0%→20%C;25~30 min:50%→45%A,30%→20%B,20%→35%C;30~40 min:45%→5%A,20%→5%B,35%→90%C);流速:0.8 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μl。

2.4 系统适应性 绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚在45 min 内基线分离且空白无干扰。空白、对照品以及样品的色谱图见图1。

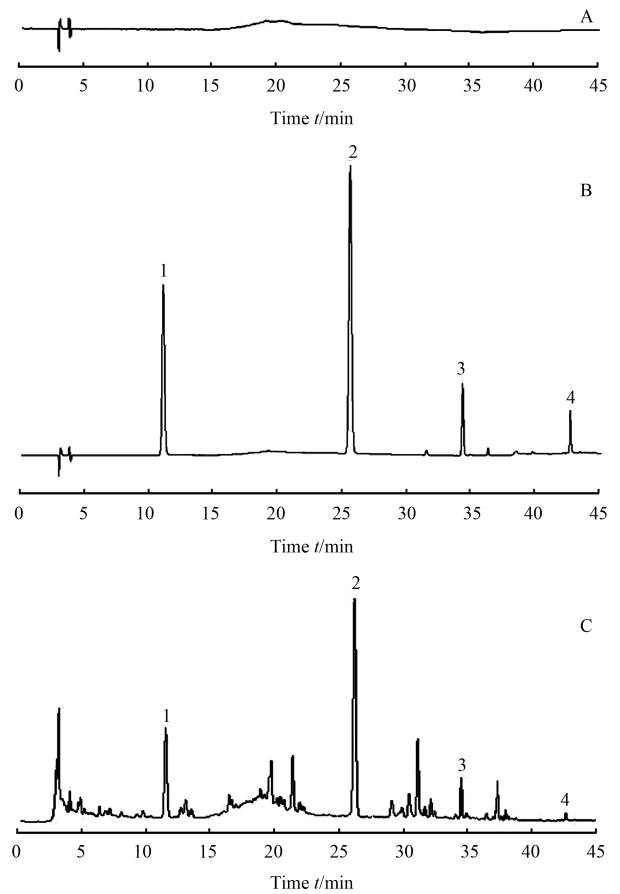


图1 抗菌消炎片空白对照(A)、对照品(B)及样品(C)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank control (A), reference(B) and Kangjunxiaoyan tablet(C)

1:Chlorogenic acid;2:Baicalin;3:Emodin;4:Chrysophanol

2.5 线性关系考察 分别将“2.1”项下逐级稀释的系列对照品溶液依次进样,以对照品溶液的浓度(X, μg/ml)对峰面积(Y)进行线性回归。绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的回归方程分别为: $Y=12.89X-12.66, r=0.9999$; $Y=13.96X-1.013, r=1.000$; $Y=35.82X-4.923, r=0.9999$; $Y=44.16X-3.280, r=0.9999$ 。线性范围:绿原酸10.41~416 μg/ml,黄芩

苷 17.34~867.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 黄芩素 1.024~51.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 大黄酚 0.4~16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.6 精密度试验 以 416、104.1、10.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的绿原酸对照品溶液; 867.2、173.44、17.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的黄芩苷对照品溶液; 51.19、10.24、1.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的黄芩素对照品溶液; 16、4、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的大黄酚对照品溶液, 在 1 d 内连续进样 5 次, 以及连续 5 d 每天分别进样 1 次, 根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。绿原酸、黄芩苷、黄芩素和大黄酚的对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内精密度分别为: 绿原酸 0.14%、0.11%、0.08%, 黄芩苷 0.30%、0.16%、0.13%, 黄芩素 0.71%、0.13%、0.16%, 大黄酚 1.01%、0.24%、0.29%; 日间精密度的 RSD ($n=5$) 分别为: 绿原酸 0.54%、0.26%、0.19%, 黄芩苷 0.49%、0.29%、0.23%, 黄芩素 0.77%、0.63%、0.54%, 大黄酚 1.6%、0.81%、0.43%, 结果表明方法的精密度良好。

2.7 检测限 将绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚对照品溶液分别进行稀释, 以信噪比为 3:1 时, 确定其最低检测限分别为 0.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.433 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.8 稳定性试验 取制备的供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、8、16、24 h 测定绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚的峰面积, 计算峰面积的 RSD 分别为 2.6%、1.7%、4.1%、2.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内放置稳定。

2.9 重复性试验 精密称取抗菌消炎片粉末 0.25 g, 共 6 份, 按“2.2”项下方法制备溶液后, 在“2.3”项下色谱条件下进行分析。测得绿原酸的平均含量 ($n=6$) 为 6.906 mg/g, RSD 为 0.37%; 黄芩苷的平均含量 ($n=6$) 为 17.081 mg/g, RSD 为 0.38%, 黄芩素的平均含量 ($n=6$) 为 0.944 3 mg/g, RSD 为 0.72%; 大黄酚的平均含量 ($n=6$) 为 0.100 1 mg/g, RSD 为 1.8%; 结果表明方法的重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的抗菌消炎片粉末 0.125 g 共 9 份, 按低、中、高浓度分别精密加入绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚对照品溶液一定的量(样品含量的 80%、100%、120%), 每一浓度平行制备 3 份, 按“2.3”项色谱条件进行分析, 结果绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚的回收率分别为: 101.5% (RSD=1.6%, $n=3$); 103.4% (RSD=1.4%, $n=3$); 99.3% (RSD=2.0%, $n=3$); 98.1% (RSD=1.7%, $n=3$)。结果表明, 采用本方法测定抗菌消炎片中绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚的含量, 回收率良好。

2.11 样品测定 同一批号抗菌消炎片按“2.2”项下制备供试品溶液 3 份, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 将所得的峰面积代入标准曲线, 计算绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚的平均含量, 分别为 6.91 mg/g (RSD=0.37%)、17.08 mg/g (RSD=0.83%)、0.90 mg/g (RSD=0.72%) 和 0.10 mg/g (RSD=1.8%)。

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择 对提取方法的选择, 考察了回流法和超声法, 由于回流法过程烦琐, 易造成损失而且绿原酸受热不稳定不宜热提^[7], 于是选用操作简便的超声法。对于超声提取, 本实验采用了正交实验, 溶剂种类考察了甲醇、50%甲醇、水; 溶剂体积考察了 15、20、30 ml; 超声时间考察了 15、30、45 min。结果以 20 ml、50%甲醇提取 30 min 效果较好。所以样品采用 20 ml、50%甲醇超声提取 30 min 作为前处理条件。

3.2 液相条件的选择

3.2.1 色谱柱的选择 考察了 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Eclipse Plus-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 两种柱子, 不论是分离效果还是分离时间都是后者优于前者, 所以选择了后者。

3.2.2 流动相的选择^[3,6,8] 本实验尝试了甲酸水溶液-甲醇、甲酸水溶液-乙腈、磷酸水溶液-甲醇、磷酸水溶液-乙腈等多种流动相系统, 绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚不是峰型不理想就是分离度达不到要求。经过试验, 发现以甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相体系, 不仅 4 种成分的峰型良好且与杂质峰的分离度均能达到要求, 故最终选用甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。

3.2.3 梯度的摸索 选择合适的梯度对样品进行有效分离起着关键的作用。本制剂为中成药, 成分较复杂, 且 4 种成分极性差异大, 采用等度洗脱难以达到分离效果。采用梯度洗脱的方法, 在前 15 min 保持乙腈 5% 的比例, 甲醇从 15%→20%, 可以使绿原酸保持良好的峰型且无杂质干扰; 在 25~35 min 将水相保持 45% 不变的情况下增加甲醇的比例而减少乙腈的比例, 而总体的有机相与水相的比例保持不变, 由于甲醇的洗脱能力比乙腈弱, 这样适当延长洗脱时间从而使得黄芩素能和干扰杂质进行有效分离。在 35 min 以后调成大比例的乙腈, 缩短大黄酚的洗脱时间。

3.2.4 温度和流速的选择 温度和流速对分离效果的影响较大, 本实验考察了 25℃、30℃、35℃ 3 个温度; 及 0.8、1.0、1.2 ml/min 3 个流速, 结果表明,

选择 0.8 ml/min 的流速在 30℃ 得到的分离效果最佳。

3.3 对照品溶液的配制 在对照品溶液的配制时考虑到绿原酸、黄芩苷、黄芩素、大黄酚之间的极性差异,所以前者用 50% 的甲醇溶解而后三者用纯甲醇溶解^[3,7,9]。大黄酚在抗菌消炎片中的含量较低,其在甲醇和 50% 的甲醇中有差异,但在此浓度时差异不大;通过对提取溶剂的考察结果发现在此制剂中黄芩苷和黄芩素的浓度在甲醇和 50% 的甲醇溶液中差异不大;但绿原酸由于极性大故在纯甲醇中溶解度减低,且峰型差、易拖尾或前延。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中成方制剂(第七册)[S]. 北京:人民卫生出版社,1993:75.

[2] 管玉云,方庆,程正. 抗菌消炎片中绿原酸的含量测定[J]. 安徽医药,2008,12:797-798.

[3] 车庆明,薛彬彬,陈颖. 高效液相色谱法测定双黄连制剂中黄芩苷和黄芩素的含量[J]. 中国医院药学杂志,2007,27:211-213.

[4] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:152-153.

[5] 申涛,徐海燕,姜煜,栾爽,赵怀清. RP-HPLC 法同时测定畅鼻通颗粒中 3 种组分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25:642-645.

[6] 潘馨. 高效液相色谱法测定银黄胶囊中绿原酸及黄芩苷的含量[J]. 中国现代应用药学,2003,20:493-495.

[7] 史克莉,许蜡英. 不同提取方法对金银花中绿原酸含量测定的影响[J]. 中医学刊,2007,25:820-821.

[8] 柳仁民,丁瑞芳. 高效液相色谱法测定三黄片中蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国现代应用药学,2005,22:411-413.

[9] 冯有龙,余伯阳,董小平. 高效液相色谱法同时测定三黄片中的蒽醌类、黄酮类及生物碱类化合物[J]. 药学报,2006,41:275-280.

[本文编辑] 尹茶

第二军医大学历年获国家级科技成果奖励项目一览(Ⅶ)

1998 年 5 项

国家发明奖四等奖 1 项

臂丛神经损伤诊断与治疗的新方法 (张少成 纪荣明 禹宝庆)

国家科技进步奖二等奖 1 项

肾移植的基础与临床研究 (闵志廉 朱有华 齐隽 王亚伟 王立明 郑军华 徐丹枫 任吉忠 余加仁)

国家科技进步奖三等奖 3 项

延迟复苏引起烧伤休克期重要脏器损伤的细胞分子生物学机理研究 (夏照帆 路卫 陈玉林 方之扬 葛绳德)

心肌保护的研究 (朱家麟 陈龙 武士英 梅举 张宝仁)

平战时胃肠内营养剂氮源及其应用研究 (赵法仪 郭俊生 陈洪章 杨孝达 罗勇庆)

1999 年 5 项

国家科技进步奖三等奖 4 项

冠状动脉的形态学和生物力学特性研究 (姜宗来 何光笪 凌凤东 胡海涛 王公瑞)

肿瘤的细胞因子免疫治疗与基因治疗新途径及其相关机理的实验研究 (曹雪涛 章卫平 于益芝 陶群 鞠佃文)

化学战剂在“登陆作战和岛屿防御”中的杀伤特点和医学防护

(朱明学 陈兆礼 赵杰 陈尧忠 袁浩)

脊髓继发性损伤神经生化机制的研究 (李明 肖建如 叶晓健 侯铁胜 赵立)

国家发明奖四等奖 1 项

特殊手外伤重建修复的新方法 (张少成 党瑞山 禹宝庆)