

RP-HPLC 法测定复方消银颗粒中没食子酸、黄芩苷和黄芩素的含量^{*}梁波¹, 张颖², 张雅婷², 姜雯^{2**}

(1. 哈密地区药品检验所, 哈密 839000; 2. 新疆医科大学第六附属医院, 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法同时测定复方消银颗粒中没食子酸、黄芩苷和黄芩素 3 个化学成分含量。**方法:** 采用 Shim-pack ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A)–0.1 % 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~22 min, 3%A → 10%A; 22~35 min, 10%A → 35%A; 35~50 min, 35%A → 28%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 280 nm, 柱温 35 °C。**结果:** 没食子酸、黄芩苷和黄芩素质量浓度分别在 3.57~49.98 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 5$)、4.032~40.32 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 4$) 和 3.278~16.390 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 3$) 范围内呈良好线性关系, 平均回收率在 98.74%~100.1% 范围内, RSD 在 0.49%~1.5% 范围内; 3 批样品中没食子酸、黄芩苷和黄芩素含量分别为 0.153~0.154、0.256~0.258、0.113~0.114 mg · g⁻¹。**结论:** 本方法可为复方消银颗粒多指标质量评价及控制提供科学依据。

关键词: 中医验方; 复方消银颗粒; 没食子酸; 黄芩苷; 黄芩素; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 12-2191-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.12.11

Simultaneous determination of gallic acid, baicalin and baicalein in compound Xiaoying granules by RP-HPLC^{*}LIANG Bo¹, ZHANG Ying², ZHANG Ya-ting², JIANG Wen^{2**}

(1. Institute of Drug Inspection, Hami Area, Hami 839000, China;

2. The Sixth Clinical Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

Abstract Objective: To establish an RP-HPLC method for simultaneous determination of three components (gallic acid, baicalin and baicalein) in compound Xiaoying granules. **Methods:** The samples were separated on a Shim-pack ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile (A)–0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) (0–22 min, 3%A → 10%A; 22–35 min, 10%A → 35%A; 35–50 min, 35%A → 28%A) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 280 nm. The column temperature was maintained at 35 °C. **Results:** The calibration curves of gallic acid, baicalin and baicalein were in good linearity over the ranges of 3.57–49.98 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 5$), 4.032–40.32 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 4$) and 3.278–16.390 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 3$), respectively; their average recoveries were 98.74%–100.1% with

* 维吾尔药工艺及制剂关键技术研究示范 (项目编号 2011030105-3)

** 通信作者 Tel: 15026018390; E-mail: 523524359@qq.com

第一作者 Tel: 13031223237; E-mail: 1379849535@qq.com

RSD values of 0.49%–1.5%. The contents of the above-mentioned compounds in samples were 0.153–0.154 mg · g⁻¹, 0.256–0.258 mg · g⁻¹ and 0.113–0.114 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method could be used for the comprehensive quality control of compound Xiaoying granules.

Keywords: traditional Chinese medicine experience prescription; compound Xiaoying granules; gallic acid; baicalin; baicalein; HPLC

复方消银颗粒是按照中医理论组方的现代中药复方制剂,处方来源于新疆一老中医多年临床经验方,由黄芩、没食子、司卡摩尼亚脂、苦豆子、阿纳其根 5 味中药经提取、纯化加工制成,具有清除碱性异常粘液质,燥湿,止痒之功效,用于肌肤瘙痒、体癣、牛皮癣等。复方消银颗粒处方中,黄芩具有抗菌、抗病毒、抗癌、保肝、利胆、利尿等广泛的药理作用,黄芩苷和黄芩素是黄芩中主要的化学成分^[1-5]。没食子中含有大量的没食子酸,它能与蛋白质结合,具有抗菌、抗氧化、抗自由基等多种生物学活性^[6-8]。查阅高效液相色谱法测定没食子酸、黄芩苷和黄芩素的有关文献^[9-15],同时测定上述 3 种指标成分的文献报道较少。本文建立反相高效液相色谱法同时测定复方消银颗粒中没食子酸、黄芩苷和黄芩素的含量。经方法学考察,该方法具有简便、准确、重复性好等优点,可用于复方消银颗粒的质量控制。

1 仪器与试剂

岛津公司 LC-20A 型高效液相色谱仪:SPD-20A 紫外检测器、LC-20AB 溶剂输送泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、LC-Solution 数据工作站;Shim-pack ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶;岛津制作所),梅特勒-托利多公司 AB135-S 电子天平;北京赛多利斯天平有限公司 Sartorius BS110S 型电子天平;四川沃特科技有限公司 WP-UP-IV-10 型 Water Purifier 实验室专用超纯水机;昆山市超声仪器有限公司 KQ-100 DE 型数控超声波清洗器。

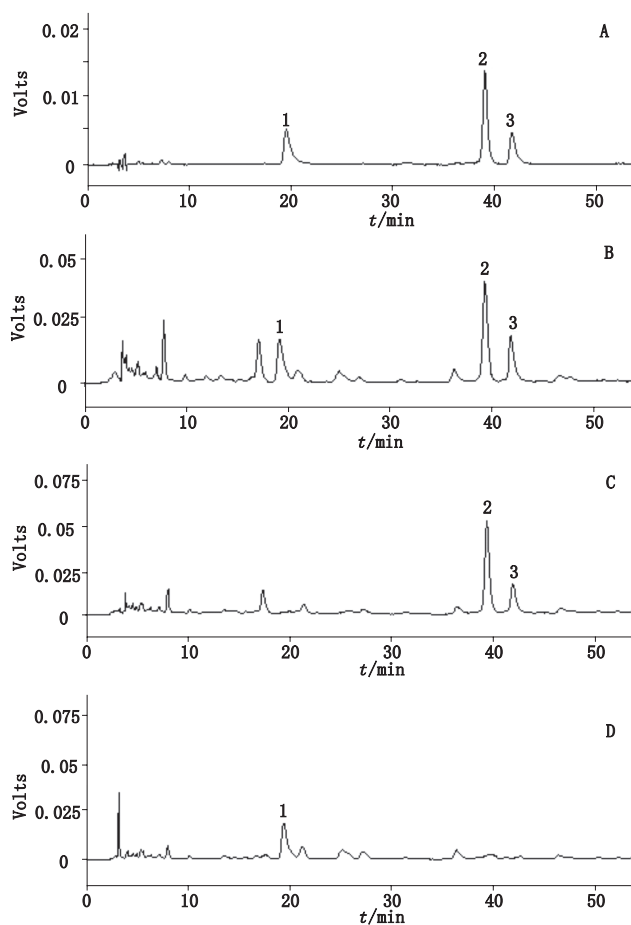
复方消银颗粒(新疆医科大学第六附属医院,批号 140721、140723、140726);对照品没食子酸(批号 111871-201203)、黄芩苷(批号 110715-201318)和黄芩素(批号 111595-201306)购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸为优级纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Shim-pack ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,

5 μm),流动相为乙腈(A)–0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0–22 min, 3%A → 10%A; 22–35 min, 10%A → 35%A; 35–50 min, 35%A → 28%A),流速为 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,取混合对照品及供试品溶液各 10 μL 进样。样品色谱中的 3 个化学成分峰与其相邻峰均能达到很好的分离,且分离度大于 1.5,色谱图见图 1。



1. 没食子酸 (gallic acid) 2. 黄芩苷 (baicalin) 3. 黄芩素 (baicalein)

图 1 混合对照品(A)、样品(B)、缺没食子阴性样品(C)、缺黄芩阴性样品(D)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), negative sample without *Quercus infectoria* (C) and negative sample without *Scutellaria baicalensis* (D)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 精密称取黄芩苷、黄芩素、没食子酸的对照品适量,分别置 25 mL 量瓶中,以甲醇溶解并稀释至刻度,分别制成每 1 mL 含黄芩苷 201.6 μg 、黄芩素 163.9 μg 、没食子酸 178.5 μg 的单一成分溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取复方消银颗粒适量,研细,精密称定 2 g,置于 100 mL 量瓶中,加入 40% 甲醇至刻度,超声处理 30 min (功率 40 W,频率 100 kHz) 使其完全溶解,放冷,加入 40% 甲醇水溶液定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例及生产制备方法,分别制备不含没食子和不含黄芩的阴性样品,按照“2.2.2”项下的制备方法制成阴性样品溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取质量浓度为 201.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.5、5.0 mL,质量浓度为 163.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩素对照品储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,质量浓度为 178.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的没食子酸对照品储备液 0.5、1.0、3.0、5.0、7.0 mL,将它们分别按由低到高的次序依次加入至 5 个 25 mL 量瓶中,再分别加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液各 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件进行分析,以对照品溶液浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得 3 个指标成分的回归方程,结果见表 1。

表 1 3 种指标成分的线性关系

Tab. 1 Linearity of 3 components

成分 (component)	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	回归方程 (regression equation)
没食子酸 (gallic acid)	3.57~49.98	0.999 8	$Y=1.58 \times 10^4 X+6.33 \times 10^4$
黄芩苷 (baicalin)	4.032~40.32	0.999 7	$Y=7.48 \times 10^4 X+8.60 \times 10^4$
黄芩素 (baicalein)	3.278~16.39	0.999 1	$Y=1.72 \times 10^4 X+9.56 \times 10^4$

2.4 精密度试验

取复方消银颗粒(批号 140723),按“2.2.2”项下

方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL ,连续按上述“2.1”项下色谱条件进样 5 次,测定没食子酸、黄芩苷和黄芩素峰面积,其 RSD 分别为 1.2%、0.79%、1.3%。结果表明,仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取复方消银颗粒(批号 140723),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,室温下放置,按“2.1”项下色谱条件,分别于 0、2、4、6、8 和 12 h 进样分析,测定 3 个待测成分的峰面积,分别计算 0~12 h 各成分色谱峰峰面积的 RSD ($n=5$): 没食子酸为 1.2%、黄芩苷为 1.4%、黄芩素为 1.0%,表明供试品溶液中上述 3 个成分于室温放置 12 h 内均稳定。

2.6 重复性试验

取复方消银颗粒(批号 140723),按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,精密吸取 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件,进样测定 3 个指标成分的峰面积,并计算其含量。结果没食子酸、黄芩苷、黄芩素的平均含量分别为 0.154、0.258、0.113 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.8%、1.3%、1.3%,表明重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的复方消银颗粒(批号 140723)约 1.0 g,共 10 份,分别置 100 mL 量瓶中,其中第一份为空白,其余 9 份平均分为 3 组,每组分别精密加入 178.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 没食子酸对照品溶液 0.5、1、1.5 mL,201.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芩苷对照品溶液 0.5、1、2 mL,163.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芩素对照品溶液 0.5、0.8、1.5 mL,再加 40% 甲醇水溶液定容至刻度,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,以外标法计算加样回收率,结果见表 2。

2.8 样品含量的测定

取复方消银颗粒 3 批(批号 140721、140723、140726),分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件进行分析,测定峰面积,按外标法计算各样品中各成分的量,结果见表 3。

3 结果与讨论

3.1 流动相梯度洗脱依据

根据文献报道^[6-11],没食子酸多采用甲醇-0.1% 磷酸水溶液(5:95)为流动相,出峰时间均小于 15 min;但经试验,黄芩苷、黄芩素在此条件下出峰很

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery

成分 (component)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/% (n=3)	RSD/ %
没食子酸 (gallic acid)	0.153 4	0.089 25	0.243 8	101.3	100.1	1.2
	0.153 1	0.089 25	0.241 4	98.94		
	0.153 5	0.089 25	0.242 2	99.38		
	0.153 2	0.178 5	0.332 8	100.6	99.68	0.92
	0.153 8	0.178 5	0.331 7	99.66		
	0.153 9	0.178 5	0.330 2	98.77		
	0.153 2	0.267 75	0.421 2	100.1	99.57	1.4
	0.153 3	0.267 75	0.422 8	100.6		
	0.153 5	0.267 75	0.415 9	98.00		
黄芩苷 (baicalin)	0.257 5	0.100 8	0.358 7	100.4	98.74	1.5
	0.257 5	0.100 8	0.355 9	97.62		
	0.257 5	0.100 8	0.356 5	98.21		
	0.257 5	0.201 6	0.454 3	97.62	99.27	1.5
	0.257 5	0.201 6	0.458 9	99.90		
	0.257 5	0.201 6	0.459 7	100.3		
	0.257 5	0.403 2	0.660 1	99.85	99.57	0.63
	0.257 5	0.403 2	0.656 1	98.86		
	0.257 5	0.403 2	0.660 8	100.0		
黄芩素 (baicalein)	0.112 7	0.081 95	0.194 9	100.3	99.73	0.61
	0.112 3	0.081 95	0.194 1	99.82		
	0.112 3	0.081 95	0.193 5	99.08		
	0.112 8	0.131 12	0.242 1	98.61	99.70	0.98
	0.112 1	0.131 12	0.243 9	100.5		
	0.112 3	0.131 12	0.243 4	99.98		
	0.112 2	0.245 85	0.357 7	99.86	99.83	0.49
	0.112 6	0.245 85	0.356 8	99.33		
	0.112 9	0.245 85	0.359 5	100.3		

表 3 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

Tab. 3 Results of sample determination

批号 (lot No.)	没食子酸 (gallic acid)	黄芩苷 (baicalin)	黄芩素 (baicalein)
140721	0.154	0.258	0.113
140723	0.153	0.256	0.113
140726	0.154	0.257	0.114

晚,在 80 min 时还未出峰;测定黄芩苷、黄芩素,多采用流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-水,梯度洗脱。因此,课题组考察以腈-0.1% 磷酸水溶液和乙腈-水等为流动相的梯度洗脱系统,结果乙腈-0.1% 磷酸水溶液分离效果较好,出峰时间适中。故本文选择流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱。

3.2 供试品溶液制备方法的考察

本试验采用超声法制备供试品溶液,考察了浓度分别为20%、30%、40%、50%、60%甲醇水溶液对3个指标成分提取率的影响,发现40%甲醇水提取效果最好;同时考察了超声时间15、30、40、60 min对3个指标成分提取率的影响,发现超声30 min后含量达到最高,40 min之后,超声时间对各成分提取率影响不大。所以选择超声时间为30 min。

3.3 小结

采用本法对3批复方消银颗粒中没食子酸、黄芩苷、黄芩素进行含量测定,结果3批样品中各成分含量波动不大,表明本方法能够在同一色谱条件下测定复方消银颗粒中多个主要成分的含量,有利于控制产品的质量。

参考文献

- [1] 辛文好,宋俊科,何国荣,等.黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(6):647
XIN WY, SONG JK, HE GR, *et al.* Progress in pharmacological study and the underlying mechanism of baicalin and baicalin[J]. Chin J New Drugs, 2013, 22(6): 647
- [2] 云宝仪,周磊,谢鲲鹏,等.黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究[J].药学学报,2012,47(12):1587
YUN BY, ZHOU L, XIE KP, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of baicalin[J]. Acta Pharm Sin, 2012, 47(12): 1587
- [3] 文敏,李雪,付守廷.黄芩苷药理作用研究新进展[J].沈阳药科大学学报,2008,25(2):158
WEN M, LI X, FU ST. New research progress in pharmacological activities of baicalin[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2008, 25(2): 158
- [4] 施高翔,邵晋,汪天明,等.黄芩及其有效成分抗菌作用新进展[J].中国中药杂志,2014,39(19):3713
SHI GX, SHAO J, WANG TM, *et al.* New advance in studies on antimicrobial activity of *Scutellaria baicalensis* and its effective ingredients[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(19): 3713
- [5] 王雅芳,李婷,唐正海,等.中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J].中华中医药学刊,2015,31(1):206
WANG YF, LI T, TANG ZH, *et al.* Progress in chemical composition and pharmacological activities of *Scutellariae Radix*[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2015, 31(1): 206
- [6] 张雅丽.五倍子没食子酸的制备、抑菌作用及机理研究[D].西安:陕西师范大学,2013
ZHANG YL. The Extraction Preparation of Gallic acid from *Galla Chinensis* Tannin and Its Antimicrobial Activities and Related Mechanisms[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2013
- [7] 汪长中,程惠娟,官妍,等.没食子酸抑制白念珠菌生物膜作用的研究[J].中国中药杂志,2009,34(9):1137
WANG CZ, CHENG HJ, GUAN Y, *et al.* *In vitro* activity of gallic acid against *Candida albicans* biofilms[J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(9): 1137
- [8] 高雅,李骅,王四旺,等.没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展[J].西北药学杂志,2014,29(4):435
GAO Y, LI H, WANG SW, *et al.* Research progress of pharmacological action pharmacokinetics of gallic acid[J]. Northwest Pharm J, 2014, 29(4): 435
- [9] 潘细贵,阮晓琪,汪洋,等.高效毛细管电泳法同时测定消炎抗菌片中黄芩苷和没食子酸的含量[J].中国药师,2007,10(11):1069
PAN XG, RUAN XQ, WANG Y, *et al.* Simultaneous determination of the contents of baicalin and gallic acid in Xiaoyankangjun tablets by HPCE[J]. China Pharm, 2007, 10(11): 1069
- [10] 龙海燕,彭飞城,姚蓉.高效液相色谱法测定复方青果颗粒中没食子酸含量[J].中南药学,2010,8(6):416
LONG HY, PENG FC, YAO R. Determination of gallic acid in Fufang Qingguo Keli by HPLC[J]. Cent South Pharm, 2010, 8(6): 416
- [11] 陈晓静,何杰,杨建云,等.RP-HPLC法同时测定葡萄籽提取物中没食子酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J].药物分析杂志,2015,35(4):723
CHEN XJ, HE J, YANG JY, *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of gallic acid, catechin and epicatechin in extracts of grape seeds[J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(4): 723
- [12] 田园,王海亮,解笑瑜,等.HPLC法测定和血明目片中黄芩苷的含量[J].西北药学杂志,2014,29(4):361
TIAN Y, WANG HL, XIE XY, *et al.* Determination of baicalin in Hexuemingmu tablets by HPLC[J]. Northwest Pharm J, 2014, 29(4): 361
- [13] 李玲玲,赵兰芬.清开灵不同制剂中黄芩苷的含量测定[J].药物分析杂志,2011,31(5):950
LI LL, ZHAO LF. Determination of baicalin for different preparations of Qingkailing[J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(5): 950
- [14] 陈晶,王京辉,傅欣彤.高效液相色谱法测定银杏叶提取物中4个酚酸类化合物的含量[J].药物分析杂志,2013,33(5):818
CHEN J, WANG JH, FU XT, *et al.* HPLC determination of 4 hydroxybenzoic acids in extracts of *Ginkgo biloba* leaves[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(5): 818
- [15] 朱晶晶,王智民,张启伟,等.一测多评法同时测定黄芩药材中4种黄酮类成分的含量[J].中国中药杂志,2009,34(24):3230
ZHU JJ, WANG ZM, ZHANG QW, *et al.* A quantitative method for simultaneous assay of four flavones with one marker in *Radix Scutellariae*[J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(24): 3230

(本文于2016年12月12日收到)