

## HPLC 法测定银黄片中黄芩苷和绿原酸的溶出度

王敏 贺蕊 龚慕辛 关怀 于萍 贾富霞

(首都医科大学中医药学院,北京,100069)

**摘要** 目的:建立中药银黄片体外溶出度测定的实验方法,为质量控制提供重要指标和参数。方法:参考《中华人民共和国药典》2015 版收录的溶出度测定方法第二法-浆法,采用 HPLC 法,用 DAD 检测器,Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相:A-0.1% 磷酸水,B-0.1% 磷酸乙腈,梯度洗脱;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;检测波长为绿原酸 327 nm,黄芩苷 276 nm,测定自制银黄片中黄芩苷和绿原酸的溶出度。结果:黄芩苷和绿原酸分别在 0.1~20 μM 和 0.5~30 μM 范围内线性关系良好( $R^2 = 0.9996$ )。HPLC 法可同时测定中药银黄片中黄芩苷、绿原酸的溶出度。结论:本方法快速、灵敏、准确,重现性好,可用于银黄片中绿原酸和黄芩苷的溶出度测定,为其质量控制提供重要依据。

**关键词** 银黄片;黄芩苷;绿原酸;溶出度

## Determination of Baicalin and Chlorogenic Acid Dissolution in Yinhuang Tablets by HPLC Method

Wang Min, He Rui, Gong Muxin, Guan Huai, Yu Ping, Jia Fuxia

(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract Objective:** To establish the determination method of baicalin and chlorogenic acid dissolution in Yinhuang tablets so as to provide criteria and parameters for the quality control of Yinhuang tablets. **Methods:** The dissolution of chlorogenic acid and baicalin from Yinhuang tablets was determined by HPLC method with DAD detector and Agilent TC-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by using mixture of acetonitrile and purified water both containing 0.05% TFA as mobile phase with gradient elution in the current speed of 1.0 mL/min, and the detection wavelength of baicalin and chlorogenic acid were 276 nm and 327 nm, respectively. The dissolution test was operated according to the second dissolution method-or method recorded on the Chinese medicine pharmacopoeia 2015 edition. **Results:** It was demonstrated that there was a good linear relationship in the range of 0.1-20 μM in baicalin and 0.5-30 μM in chlorogenic acid ( $R^2 = 0.9996$ ), respectively. The dissolution of chlorogenic acid and baicalin from Yinhuang tablets could be determined at the same time by the same HPLC method. **Conclusion:** The HPLC method was rapid, sensitive, accurate, and reproducible. It could be used to determine the baicalin and chlorogenic acid dissolution in Yinhuang tablets and provide important references for the quality control of Yinhuang tablets.

**Key Words** Yinhuang tablets; Baicalin; Chlorogenic acid; Dissolution

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.02.043

银黄片(自制)是由金银花提取物和黄芩苷制备而成,具有清热解毒、抗菌消炎作用,常用于治疗急性慢性扁桃体炎、急性慢性咽喉炎和上呼吸道感染<sup>[1]</sup>。绿原酸是金银花中主要的抗菌有效成分,常用作金银花质量控制的指标。黄芩苷含量是黄芩药材的质量评价指标,具有多种药理作用。银黄片(自制)的主要有效成分是绿原酸和难溶于水的黄芩苷,其溶出释放性能对所其在体内的吸收有较大的影响,是银黄片能否起效的决定性因素。主成分或适宜物质组的溶出度检测,受到专家的重视,甚至有些专家建

议将其作为中成药质量控制的项目<sup>[2-3]</sup>。为更好的控制药品的质量,避免紫外分光光度法中黄芩苷和绿原酸两成分存在的相互干扰,本研究参考《中华人民共和国药典》2015 版一部 0931 溶出度测定方法第二法-浆法,采用高效液相色谱(HPLC)法,建立银黄片(自制)中黄芩苷与绿原酸的溶出度测定方法,为其质量控制提供依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,四元

基金项目:首都医科大学科研基金(技术类)项目(编号:2015JS09)

作者简介:王敏(1961.11—),女,本科,副主任技师,首都医科大学中医药学院实验教学中心党支部书记,中药药剂学,E-mail:tmshiyang@ccmu.edu.cn

通信作者:贺蕊(1983.05—),女,博士,讲师,首都医科大学中医药学院中药药剂学系学科秘书,中药药剂学,E-mail:herui\_666@163.com

泵,自动进样器,DAD 检测器,数据处理软件;ZRS-8LD 型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)。

1.1.2 试药 黄芩苷对照品(批号:110715-201318)和绿原酸对照品(批号:110753-201314),购自中国食品药品检定研究院;银黄片(自制时间:20150609,规格:0.4047 g/片);甲醇、乙腈均为色谱纯,娃哈哈纯净水,磷酸(分析纯),盐酸(分析纯)购于北京现代东方精细化学品有限公司,无水乙醇(分析纯)购于现代东方(北京)科技发展有限公司。其余试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

1.2.1 HPLC 检测条件 色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A-0.1% 磷酸水,B-0.1% 磷酸乙腈,按照表 1 的梯度进行洗脱;检测波长:276 nm(黄芩苷),327 nm(绿原酸);流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。

表 1 流动相梯度

时间(时间单位)	B(%)
0	10
15	70
20	100
26	100
26.01	10
35	10

1.2.2 黄芩苷、绿原酸混合对照品溶液的配制 精密称取 3.5 mg 绿原酸,以 50% 甲醇溶解定容至 10 mL,成浓度为 1 mM 的绿原酸母液。精密称取 4.4 mg 黄芩苷,以 70% 甲醇溶解定容至 10 mL,成浓度为 1 mM 的黄芩苷母液。上述样品用铝箔纸包好,置于 4 ℃ 冰箱中待用。各取 2 种母液适量用 50% 的甲醇稀释,制成含绿原酸、黄芩苷的系列混合对照品溶液,浓度见表 2。

表 2 黄芩苷、绿原酸混合标准品溶液的浓度

混合对照品	绿原酸(μM)	黄芩苷(μM)
1	0.5	0.1
2	1	0.5
3	2	1
4	5	3
5	10	5
6	20	10
7	30	20

1.2.3 溶出度试验与样品溶液制备 按《中华人民共和国药典》2015 版一部 0931 溶出度测定方法第二法-浆法,以 900 mL 人工胃液作为溶出递质,进行

溶出试验。将 900 mL 已恒定至(37.0 ± 0.5)℃ 的脱气人工胃液置于溶出杯中,将精密称重的 6 片样品分别置于溶出杯中,调节转速为 100 r/min,在 5、10、25、40、60、90、120 和 180 min 定点取样 2.0 mL(随即补充同温度的递质 2.0 mL),用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,滤液作为供试样品溶液。同时取样品 10 片,精密测定,求其平均片重,研细,精密称取适量(相当于平均片重),置装有 900 mL 人工胃液的 1000 mL 量瓶中,超声 30 min 充分溶解,吸取 2.0 mL,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,滤液作为最大溶出度液。取各供试样品溶液 10 μL,按照“1.2.1”项下的色谱条件,测定黄芩苷、绿原酸的含量,计算每片的溶出度,求出平均溶出度。

$$\text{溶出度} = (C/C_0) \times (m_{\text{平均}}/m)$$

其中,C-取样样品浓度;C<sub>0</sub>-平均片重的样品浓度;m<sub>平均</sub>-平均片重;m-每片的片重。

## 1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 专属性试验 对照品和样品的 HPLC 图谱如图 1 所示,绿原酸和黄芩苷的分离度良好。

1.2.4.2 线性关系考察 将“1.2.2”项下的各浓度标准品溶液,按照“1.2.1”项下的色谱条件进行检测,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得到绿原酸(327 nm)的回归方程  $Y = 10.504x + 1.8935$  ( $R^2 = 0.9996$ );黄芩苷(276 nm)的回归方程  $Y = 14.623x + 12.618$  ( $R^2 = 0.9996$ )。结果表明,绿原酸、黄芩苷分别在浓度 0.5 ~ 30 μM,0.1 μM ~ 20 μM 线性良好。

1.2.4.3 精密度试验 取“1.2.2”项下已配置好的对照品溶液 3,按“1.2.1”项下各指标成分色谱条件,重复进样 5 次,计算黄芩苷、绿原酸 5 次进样峰面积的 RSD 值。绿原酸、黄芩苷的 RSD 分别为 0.6%,1.2%,提示仪器精密度良好。

1.2.4.4 稳定性试验 取“1.2.3”项下的供试品溶液室温下密封保存,于 0、2、4、8、16 h 取样,按“1.2.1”项下各指标成分色谱条件进样测定,计算各指标成分在各时间点峰面积 RSD 值,绿原酸、黄芩苷分别 0.9%,1.5%,均低于 3.0%,提示样品溶液 16 h 内稳定性良好。

1.2.4.5 重复性试验 按“1.2.3”项下溶出度供试品溶液(90 min)制备方法及样品处理方法,重复制备 5 份样品,按“1.2.1”项下各指标成分色谱条件进样测定,计算黄芩苷、绿原酸在各时间点峰面积 RSD 值,绿原酸、黄芩苷分别为 0.1%、0.6%,均低于 2.0%,提示该方法的重复性良好。

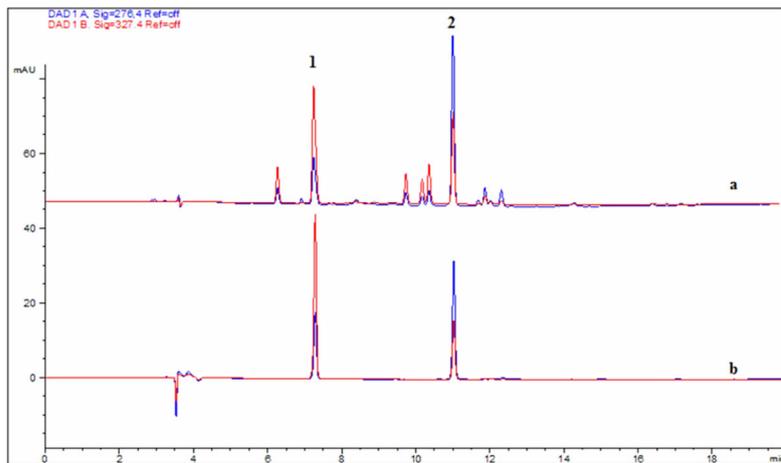


图1 样品的 HPLC 图谱

注:a 样品的 HPLC 图谱,b 对照品的 HPLC 图谱,1 绿原酸,2 黄芩苷。

### 2 结果

以“1.2.3”项下最大溶出度溶液中绿原酸和黄芩苷的含量测定结果为 100% 溶出,计算绿原酸和黄芩苷在各时间点的累积溶出率,并以溶出率为纵坐标,时间为横坐标,绘制溶出曲线。绿原酸的溶出度曲线如图 2 所示,在 180 min 基本都达到 100% 溶出。黄芩苷的溶出速率慢于绿原酸,在 180 min 时,仅达到 65% (图 3)。

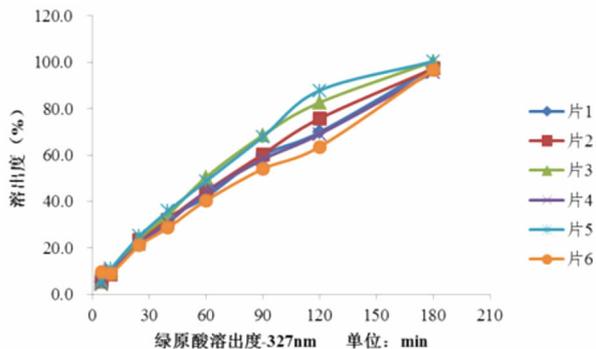


图2 自制银黄片中绿原酸的溶出度曲线

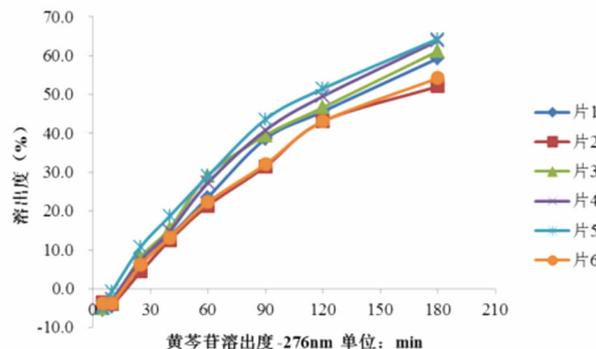


图3 银黄片(自制)中黄芩苷的溶出曲线

### 3 讨论

用分光光度计对配制的绿原酸、黄芩苷对照品母液在 200 ~ 400 nm 波长扫描,结果显示,绿原酸在

327 nm 波长处有最大吸收,黄芩苷在 276 nm 波长处有最大吸收,因此选择 327 nm 为绿原酸的检测波长,选择 276 nm 为黄芩苷的检测波长,与文献报道一致<sup>[4-5]</sup>。

本研究采用 HPLC 法同时测定了绿原酸和黄芩苷的含量,不仅方法简便、可靠、灵敏度高、重现性好,而且避免了此前采用紫外分光光度法测定 2 种成分时相互间的干扰,使结果更精确、可靠。本研究发现银黄片中黄芩苷溶出慢,在 3 h 尚未溶出完全,极有可能影响银黄片药效的发挥。因此,在自制银黄片的处方设计时,应充分考虑辅料和工艺的选择,以使其黄芩苷的溶出度符合要求,从而充分发挥银黄片的药效。

药品溶出度试验作为一种模拟固体口服制剂在胃肠道中崩解和溶出的体外试验方法,通常被作为一种体外替代方法为体内生物等效性研究和体内外相关性研究提供信息和指导<sup>[6]</sup>。因此,溶出度试验在药物固体口服制剂的研发过程中具有重要的作用。随着中药现代化,中药制剂质量控制的理念和方法得到提升和发展。“固体制剂跟着溶出度走”,中药固体制剂溶出度试验已成为制药工业必设的一个质量控制项目,是评价制剂处方、生产工艺、制剂生物利用度的重要指标<sup>[7-10]</sup>。在中药固体制剂生产中,为达到稳定、安全、有效、可控,需要颠覆以往“重提取、重纯化、重分离、轻成型”的思想,应以溶出度作为衡量手段,真正创造出质量可靠、疗效显著的药品。

#### 参考文献

[1]袁浩,刘永利,李冬梅. HPLC 法测定银黄片中绿原酸与黄芩苷含量[J]. 中国民族民间医药,2011,20(1):61-62.

业大生产。

### 3 讨论

为了最大限度地将有效成分提取出来,保留处方中各药物的有效成分,发挥各有效成分的综合治疗作用,确保临床疗效,我们采取水提取加乙醇提取的提取方式,前期研究结果表明,水提取加乙醇提取,指标性成分的提取率达到最高,但同时处方的出膏率也会提高,为确保各成分的疗效,将本处方制成颗粒剂。预实验时,选用低体积分数的乙醇和淀粉浆作为润湿剂和黏合剂,结果发现制成的软材黏度太大,过筛困难,故选择70%、80%、90%的乙醇作为考察因素。中药浸膏通常黏度较大,易吸潮,不易直接制粒,需加入一定量的辅料,文献报道,颗粒剂常用辅料有可溶性淀粉、糊精、HPMC、CMC-Na等<sup>[12-13]</sup>,本研究通过单因素试验对以上几种辅料进行了考察,综合颗粒外观及制粒难易程度,最终选择糊精作为本方辅料。为扩大本处方的适用人群,因此将本方制成无糖颗粒剂,生产过程中没有添加糖和其他矫味剂,处方口感较好。本研究从颗粒成型率、休止角和吸湿率3个方面综合评价颗粒成型工艺<sup>[14-15]</sup>,采用加权法考察各因素对成型率的影响,考察指标较全面,优化后的工艺简便、易行,可用于该颗粒剂工业上批量生产。

### 参考文献

[1]任荣,金津,王彦,等. 正交试验优选复方红藤颗粒的制备工艺及质量标准研究[J]. 中国药房,2014,25(47):4444-4447.

- [2]谭莹,邱丽颖,茅海亚,等.“益元抑瘤汤”颗粒剂的成型工艺研究[J]. 中成药,2013,35(9):2050-2053.
- [3]张健伟,刘力,徐德生. 复方鹿角颗粒的成型工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):15-17.
- [4]王洪军,肖晏婴,黄德红,等. 益气固肺颗粒成型工艺优选[J]. 湖北中医杂志,2015,37(8):59-60.
- [5]谢岱,易艳东,马威. 归芪补肾颗粒成型工艺及其质量控制[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(21):1928-1934.
- [6]郭志辉,杨明,韩丽,等. 乌芍止痒颗粒成型工艺[J]. 中成药,2015,37(9):1942-1946.
- [7]王勇. 祛白颗粒成型工艺优选[J]. 湖北中医杂志,2015,37(7):69-70.
- [8]王丽,高家荣,韩燕全,等. 养肝益水颗粒成型工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):32-35.
- [9]王勇. 祛白颗粒成型工艺优选[J]. 湖北中医杂志,2015,37(7):69.
- [10]陈梓贤,李建利,罗悦,等. 痛风颗粒剂的成型工艺优选[J]. 中药与临床,2014,5(6):24-26.
- [11]尚雅文,龚慕辛,翟永松,等. 星点设计一效应面法优选糖肾宁颗粒的成型工艺[J]. 2015,21(16):14-18.
- [12]袁天荣,赵雪梅,董琼,等. 芪丹颗粒成型工艺的研究[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(1):50.
- [13]夏崇才,周芙琼,顾宁,等. 冠心V号颗粒制备工艺优选[J]. 安徽医药,2015,19(6):1051-1054.
- [14]侯世祥. 现代中药制剂设计理论与实践[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:461-462.
- [15]汪海斌,吴电彩,马玲,等. 正交试验研究枇杷清肺颗粒的醇提工艺[J]. 2015,19(2):222-224.

(2015-12-10 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第410页)

- [2]严婷,黄方威,王金钱,等. 不同厂家复方丹参片物质组溶出度研究[J]. 药物评价研究,2013,36(6):442-447.
- [3]魏农农,王霞,苏敏. 药物溶出度试验方法研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(10):1119-1124.
- [4]陈述,席桂同. 高效液相色谱法测定银花感冒冲剂中绿原酸含量[J]. 世界中医药,2015,10(1):97-99,103.
- [5]郭琪,闫艳,王海波,等. HPLC 波长切换法同时测定清热解毒颗粒中8个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(9):1601-1605.
- [6]胡昌勤,潘瑞雪. 溶出度试验评价/预测固体口服制剂生物等效

性的研究进展[J]. 中国新药杂志,2014,23(1):44-51.

- [7]黄晓燕,丁野,郑金凤,等. 灯盏花素滴丸的溶出度研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):82-84.
- [8]孟戎茜,郝芳芳,董婧婧,等. 穿心莲内酯滴丸溶出度测定方法的研究[J]. 安徽医药,2013,17(5):756-758.
- [9]郑琴,周欢,钱佳,等. 大川芎脉冲片的制备工艺及体外释药特性研究[J]. 江西中医学院学报,2013,25(2):48-52.
- [10]翟允耀,操锋,平其能,等. 心脑欣滴丸中山柰酚的体外溶出度测定[J]. 药学进展,2013,37(2):73-77.

(2016-06-16 收稿 责任编辑:洪志强)