

HPLC法测定痔特佳片中染料木素、染料木苷和黄芩苷的含量^{*}

索志荣¹, 秦海燕², 杜利成¹

(1. 西南科技大学分析测试中心, 绵阳 621010 2 西南科技大学生命科学与工程学院, 绵阳 621010)

摘要 目的: 建立测定痔特佳片中染料木素、染料木苷和黄芩苷的高效液相色谱分析方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈柱 (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为甲醇-2%乙酸 (43:57), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 270 nm。结果: 染料木素、染料木苷和黄芩苷浓度分别在 6.25~100.00 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$), 6.13~67.43 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$), 2.19~35.04 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$) 范围内线性关系良好, 平均回收率 ($n=6$) 分别为 98.7% (RSD=2.1%), 99.1% (RSD=2.1%), 98.3% (RSD=2.4%)。结论: 该法是一种快速、灵敏、准确的分析方法, 可以为痔特佳片的质量控制提供科学依据。

关键词: 高效液相色谱法; 痔特佳片; 染料木素; 染料木苷; 黄芩苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1662-03

HPLC determination of genistein, genistin and baicalin in Zhitejia tablets^{*}

SUO Zhi-rong¹, QIN Hai-yan², DU Li-cheng¹

(1. Analytical and Testing Center Southwest University of Science and Technology Mianyang 621010 China

2 College of Life Science and Engineering Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for determining of genistein, genistin and baicalin in Zhitejia tablets **Method** RP-HPLC was adopted The separation was performed on Zorbax SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) column with the mobile phase of methanol-2% aqueous acetic acid (43:57), at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 270 nm. **Results** The linear ranges were 6.25-100.00 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$) for genistein, 6.13-67.43 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$) for genistin and 2.19-35.04 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$) for baicalin, respectively The average recoveries ($n=6$) were 98.7% (RSD=2.1%) for genistein, 99.1% (RSD=2.1%) for genistin and 98.3% (RSD=2.4%) for baicalin, respectively. **Conclusion** A rapid sensitive and accurate method can provide a scientific basis for the quality control of Zhitejia tablets

Key words HPLC; Zhitejia tablets; genistein; genistin; baicalin

痔特佳片是由槐角、黄芩、地榆炭等组成的常用中成药, 具有止血消肿、抗菌消炎、收敛等作用, 用于一、二期内痔, 血栓性内痔, 肛窦炎, 直肠炎等的治疗。槐角在处方中是君药, 其有效成分染料木素和染料木苷具有抗癌、抗繁殖、抗氧化、抗菌和消炎等作用^[1~4]。黄芩在处方中为佐药, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效, 其有效成分黄芩苷具有抗菌消炎、解热镇痛、降压利尿、降脂胆、抗氧化等作用^[5]。对于痔特佳片的质量控制有采用薄层色谱法对该制剂中的槐角、枳壳和当归进行鉴别以及用高效液相色谱法测定其中的芦丁、柚皮苷和黄芩苷

含量^[6~8], 而对于痔特佳片处方中主要药材即君药和佐药所含的主要有效成分染料木素、染料木苷和黄芩苷的同时测定未见文献报道。本文采用反相高效液相色谱法, 对痔特佳片中染料木素、染料木苷和黄芩苷同时进行测定, 为评价和控制痔特佳片的质量提供了科学依据。

1 仪器与试剂

对照品染料木素、染料木苷和黄芩苷由中国药品生物制品检定所提供, 纯度均大于 99.5%; 3个不同厂家的痔特佳片购自医药超市, 规格为 0.4 g·片⁻¹, 批号分别为 2007051Q 114 521; 甲醇为色谱

* 西南科技大学博士研究基金项目 (08ZX7110)和西南科技大学青年基金项目 (09X3129)

第一作者 Tel: (0816)2419263 E-mail: suozhirong@163.com

纯, 水为超纯水, 乙酸为分析纯。

Varian 1200 LC/MS液相色谱-质谱联用仪(带紫外检测器); 优普超纯水制造系统(上海优普实业有限公司); KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 溶液制备

2.1 供试品溶液 取痔特佳糖衣片 5~6片, 剥去糖衣层, 精密称定, 研细, 过 3号筛后, 取本品粉末约 1 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 80% 甲醇 10.0 mL 超声(功率 300 W, 频率 25 kHz)提取 3次, 每次 20 min, 过滤提取液于 50 mL 量瓶中, 再用 80% 甲醇定容至刻度, 摇匀。取适量用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 对照品溶液 准确称取对照品染料木素 6.25 mg, 染料木苷 6.13 mg, 黄芩苷 4.38 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶解并定容, 摇匀, 得染料木素、染料木苷和黄芩苷的单一成分对照品溶液, 作为储备液, 其他不同浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

3 色谱条件

Zorbax SB-C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱; 流动相: 甲醇-2% 乙酸 (43:57); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 270 nm。对照品和样品的色谱图见图 1。

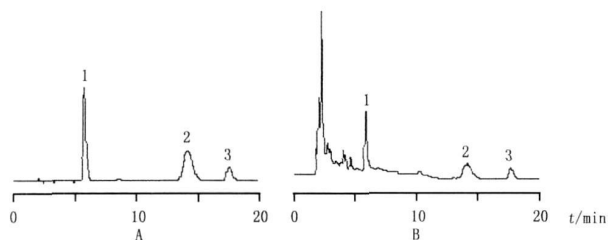


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and samples (B)

1 染料木苷 (genistin) 2 黄芩苷 (baicalin) 3 染料木素 (genistein)

4 方法学考察和样品测定

4.1 线性关系考察 精密移取“2.2”项所配的染料木素、染料木苷和黄芩苷储备液一定量于 5 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释, 配成染料木素浓度分别为 6.25, 25.00, 43.75, 62.50, 81.25, 100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 染料木苷浓度分别为 6.13, 18.39, 30.65, 42.91, 55.17, 67.43 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及黄芩苷浓度分别为 2.19, 8.76, 15.33, 21.90, 28.47, 35.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 将上述混合对照品溶液分别平行

测定 3 次 (均进样 10.0 μL), 以峰面积 Y 对浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归, 染料木素、染料木苷和黄芩苷回归方程和相关系数分别为:

$$Y = 39.25C - 3.28 \quad r = 0.9994$$

$$Y = 25.12C - 2.01 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 21.78C + 25.91 \quad r = 0.9993$$

4.2 精密度考察 取供试品溶液 (批号: 521), 连续进样 6 次, 进行测定, 染料木素、染料木苷和黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.6%, 1.8%。

4.3 重复性试验 对 6 份同一批号的样品 (批号: 521), 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 进行测定, 染料木素、染料木苷和黄芩苷含量的 RSD 分别为 1.9%, 1.9%, 2.1%。

4.4 稳定性试验 对供试品溶液 (批号: 521) 在 8 h 之内每隔 1 h 进行考察, 结果染料木素、染料木苷和黄芩苷峰面积的 RSD ($n = 9$) 分别为 0.8%, 1.0%, 0.8%。

4.5 加样回收率试验 精确称取已测得含量的痔特佳片样品 (批号: 521) 粉末约 0.5 g 共 6 份, 每份分别准确加入染料木素对照品储备液 2 mL, 染料木苷对照品储备液 1 mL 和黄芩苷对照品储备液 0.5 mL, 按“2.1”项下方法制备供试溶液后, 进行测定。染料木素、染料木苷和黄芩苷的平均加样回收率 ($n = 6$) 分别为 98.7%, 99.1%, 98.3%; RSD 分别为 2.1%, 2.1%, 2.4%。

4.6 样品测定 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样 10.0 μL 进行测定, 用回归方程计算。结果见表 1。

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

Tab 1 The determination results of samples (mg per tablet , $n = 3$)

批号 (Lot No.)	染料木素 (genistin)	染料木苷 (genistin)	黄芩苷 (baicalin)
20070510	0.50	0.65	0.39
114	1.43	0.45	0.12
521	0.82	0.60	0.14

5 讨论

5.1 提取条件的选择 考察了水、40% 甲醇、60% 甲醇、80% 甲醇、50% 乙醇、75% 乙醇、无水乙醇等 7 种提取溶剂和超声振荡时间对提取率的影响。试验发现: 采用 80% 甲醇、超声提取 3 次, 每次 20 min, 样品中染料木素、染料木苷和黄芩苷的提取率最高。

5.2 色谱条件的优化 用甲醇-水作流动相, 3 种

化合物的色谱峰有拖尾现象, 不能获得很好的分离, 这是可能由于酚羟基的解离, 使其在固定相表面有双重保留机制。在流动相中加入酸性抑制剂(如: 甲酸、乙酸)可使酚羟基的解离被抑制, 在反相色谱条件下, 成为中性疏水缔合物, 使分离效果和峰形得到改善。通过改变甲醇-水-乙酸的比例, 对色谱条件进行优化, 文中的色谱条件分离效果最好。

参考文献

- 1 Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Great Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典). Second Part(下册). Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 1999. 2435
- 2 Banerjee S, Li YW, WANG ZW, *et al* Multi-targeted therapy of cancer by genistein *Cancer Lett* 2008, 269(2): 226
- 3 Wei H, Bowen R, Cai Z, *et al* Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995, 208(1): 124
- 4 Central Station of Chinese Medicinal Materials Information State Drug Administration(国家医药管理局中草药情报中心站). Handbook of Active Components in Traditional Chinese Herb Medicine (植物药有效成分手册). Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 1986. 786
- 5 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Great Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典). Second Part (下册). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 1999. 2017
- 6 WANG Jian-ming (王建明), JIANG Zhe (姜哲), ZHANG Xiao-yan (张晓燕). Study on identification and content determination of Zhietjia tablets (痔特佳片鉴别与含量测定的研究). *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2008, 14(9): 15
- 7 LIU Lian-ying (刘莲英), GUO Yao-wu (郭耀武), ZHU Zi-li (朱自力). Determination of naringin in Zhietjia tablets by HPLC (HPLC法测定痔特佳片中柚皮苷的含量). *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医学院学报), 2002, 25(5): 45
- 8 LIN Xiao-yi (林小毅). Determination of naringin and baicalin in Zhietjia tablets by HPLC(高效液相色谱法同时测定痔特佳片中柚皮苷和黄芩苷的含量). *Strait Pharm J* (海峡药学), 2008, 20(6): 59

(本文于 2008 年 11 月 10 日收到)

2009 全国临床药物安全性专题学术研讨会通知

为更好的贯彻基本药物制度, 落实新医改方案, 中国药学会药物流行病学专业委员会和《中国药师》杂志共同举办的 2009 全国临床药物安全性专题学术研讨会定于 2009 年 11 月 6 日 ~ 8 日在武汉香格里拉大酒店举行。本年度的专题是: 非甾体抗炎药物 (NSAIDs) 及改善病程药物 (DMARDs) 临床合理应用。参会者可获国家级继续教育学分, 参会论文经审可在《中国药师》专刊或正刊登载, 遴选出的优秀论文将获得优秀论文证书。

详见在线注册网址 [www. tgzgs. org](http://www.tgzgys.org), 会务组联系电话: 027- 82778580 82835077, 欢迎垂询。