

# 双波长 RP-HPLC 法同时测定牛黄上清片中栀子苷和黄芩苷的含量

师永清<sup>1</sup>, 师永花<sup>2</sup>

(1. 西北民族大学化工学院, 兰州 730030; 2. 定西市人民医院, 定西 743000)

**摘要** 目的: 建立双波长 RP-HPLC 法同时测定牛黄上清片中黄芩苷和栀子苷含量的方法。方法: 色谱柱: Hibor C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 采用梯度洗脱, 检测波长: 240 nm(栀子苷), 278 nm(黄芩苷), 柱温: 30 °C。结果: 栀子苷和黄芩苷进样量分别在 0.16~0.96 μg( $r=0.9999$ ), 0.18~1.08 μg( $r=0.9999$ ) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 95.6%, 96.0%, RSD 分别为 2.7%, 2.5%。结论: 该法简便、快速、灵敏, 可用于牛黄上清片中栀子苷和黄芩苷的含量测定。

**关键词:** 反相高效液相色谱; 中成药; 牛黄上清片; 栀子苷; 黄芩苷

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)08-1586-03

## Double wavelength RP-HPLC simultaneous determination of geniposide and baicalin content in Niu Huang Shangqing tablets

SHI Yong-qing<sup>1</sup>, SHI Yong-hua<sup>2</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 2. Dingxi People's Hospital, Dingxi 743000, China)

**Abstract Objective:** To develop a double wavelength RP-HPLC method for simultaneous determination of baicalin and geniposide in Niu Huang Shangqing tablets. **Method:** The analysis was performed on a Hibor C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution. Geniposide and baicalin were detected at 240 nm and 278 nm respectively. The column temperature was 30 °C. **Results:** The linear range was 0.16-0.96 μg ( $r=0.9999$ ) for geniposide and 0.18-1.08 μg ( $r=0.9999$ ) for baicalin. The average recoveries of geniposide and baicalin were 95.6% and 96.0% respectively, RSD were 2.7% and 2.5%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and sensitive and can be used for simultaneously determining the contents of geniposide and baicalin in Niu Huang Shangqing tablets.

**Key words:** RP-HPLC; Chinese patent drug; Niu Huang Shangqing tablets; geniposide; baicalin

牛黄上清片由牛黄、薄荷、菊花、荆芥穗、白芷、川芎、栀子、黄连、黄柏、黄芩、大黄、连翘、赤芍等十九味药材组成, 具有清热泻火、散风止痛功能。临床常用于头痛眩晕、目赤耳鸣、咽喉肿痛、口舌生疮、牙龈肿痛、大便燥结<sup>[1]</sup>。原标准中无含量测定项, 制剂质量难以控制, 有报道采用 HPLC 法测定牛黄上清片中大黄素和大黄酚的含量, 控制其质量<sup>[2]</sup>。黄芩苷和栀子苷为处方中主要有效成分, 同时测定牛黄上清片中栀子苷和黄芩苷含量的方法未见文献报道<sup>[3-5]</sup>, 本文采用双波长 RP-HPLC 法同时测定黄芩苷及栀子苷的含量, 方法简便、快速、准确, 可用于该制剂的质量控制。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(配置真空脱气机、四元泵、自动进样器、真空二极管阵列检测器), Hibor C<sub>18</sub> 键合硅胶柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), AS3120 型超声波清洗器; AB204-S 电子分析天平。

黄芩苷对照品(批号: 715-8501, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所); 栀子苷对照品(批号: 0749-9404, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所); 乙腈(色谱纯, 天津市光复精细化工研究所); 甲醇(分析纯, 天津市光复科技发展有限公司); 磷酸(分析纯, 天津市百世化工有限公司); 水为重蒸水; 牛黄上清片(上海海虹实业巢湖中辰药业有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Hibor C<sub>18</sub> 键合硅胶柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相: A 相为 0.2% 磷酸水溶液, B 相为乙腈; 梯度洗脱程序如下: B: 12%/(0 ~ 9 min), 12% → 25%/(9 ~ 10 min), 25%/(10 ~ 18 min), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 240 nm( 栀子苷) 278 nm( 黄芩苷); 柱温: 30 ℃。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取减压干燥至恒重的栀子苷对照品 1.6 mg, 黄芩苷对照品 1.8 mg, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇 8 mL 超声溶解( 功率 240 W, 频率 45 kHz), 放冷至室温, 加甲醇定容; 分别精确量取上述对照品溶液按体积 1:1 混合即得含栀子苷 0.08 mg · mL<sup>-1</sup>, 黄芩苷 0.09 mg · mL<sup>-1</sup> 对照品混合溶液。

**2.2.2 样品溶液** 取样品 20 片, 除去糖衣, 置研钵中研细, 取约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇水溶液 40 mL, 超声提取 30 min, 放冷至室温, 加 70% 甲醇水溶液至刻度, 摇匀, 静置, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

**2.2.3 阴性样品溶液** 栀子苷、黄芩苷分别来源于药材栀子、黄芩, 按牛黄上清片的处方比例和生产工艺分别制备缺栀子和黄芩的阴性制剂, 按“2.2.2”项下方法分别制备缺栀子、缺黄芩的阴性样品溶液。

**2.3 专属性试验** 分别取栀子苷对照品溶液、黄芩苷对照品溶液、样品溶液、缺栀子阴性样品溶液、缺黄芩阴性样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果在样品溶液色谱图中, 分别有与对照品栀子苷和黄芩苷保留时间一致的特征峰, 保留时间分别为 7.5 min( 栀子苷), 16.0 min( 黄芩苷), 阴性样品无此特征峰, 如图 1 ~ 2。表明阴性样品对所测组分无干扰。

**2.4 标准曲线与线性范围考察** 取对照品混合溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL, 按“2.1”项下色谱条件, 自动进样分析, 分别以峰面积  $Y$  为纵坐标, 栀子苷和黄芩苷进样质量  $X$  为横坐标进行线性回归, 得栀子苷、黄芩苷回归方程分别为:

$$Y = 1.650 \times 10^3 X + 6.333 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.642 \times 10^3 X + 4.267 \quad r = 0.9999$$

结果栀子苷、黄芩苷进样质量分别在 0.16 ~ 0.96 μg, 0.18 ~ 1.08 μg 范围内线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 取对照品混合溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 自动连续进样 5 次, 进样量 6 μL, 记录色谱图, 结果栀子苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.3%, 1.2%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一批号样品溶液( 批号:

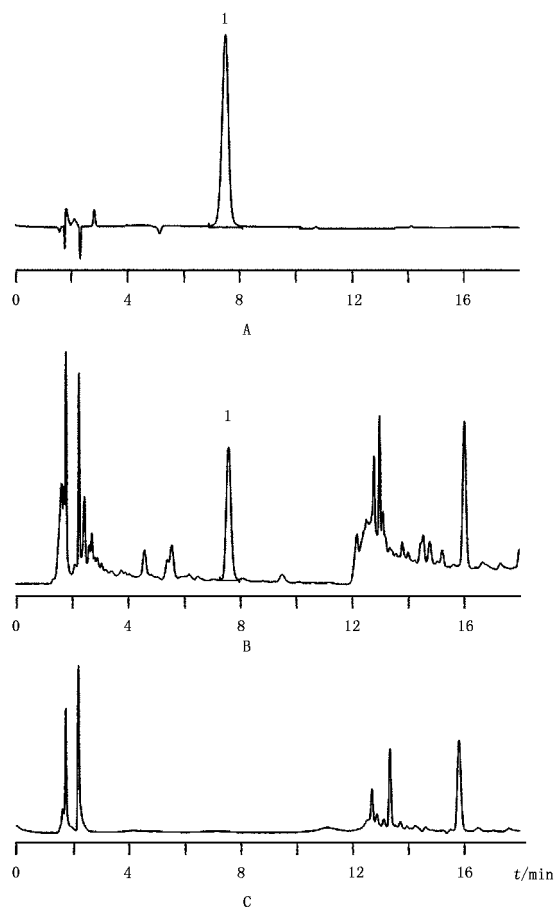


图 1 对照品(A)、样品(B)和缺栀子阴性样品(C)在 240 nm 处色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance(A), sample(B), negative sample without *Gardenia jasminoides* Ellis(C)

1. 栀子苷( geniposide)

080927) 室温下放置, 按“2.1”项下色谱条件, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样分析, 进样量 5 μL, 结果栀子苷和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.24%, 2.12%, 表明样品溶液在 12 h 内基本稳定性。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批号牛黄上清片样品 5 份, 每份约 1.0 g, 按“2.2.2”项下方法制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 进样分析, 进样量为 5 μL, 结果样品中栀子苷、黄芩苷含量分别为 4.532 mg · g<sup>-1</sup>, 7.783 mg · g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.97%, 2.13%, 表明重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的同一批号牛黄上清片样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置研钵中, 分别精密加入栀子苷对照品溶液( 浓度为 0.2215 mg · mL<sup>-1</sup>)、黄芩苷对照品溶液( 浓度为 0.3741 mg · mL<sup>-1</sup>) 10.0 mL, 按“2.2.2”项下方法制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果如表 1, 栀子苷、黄芩苷平均回收率分别为 95.6%,

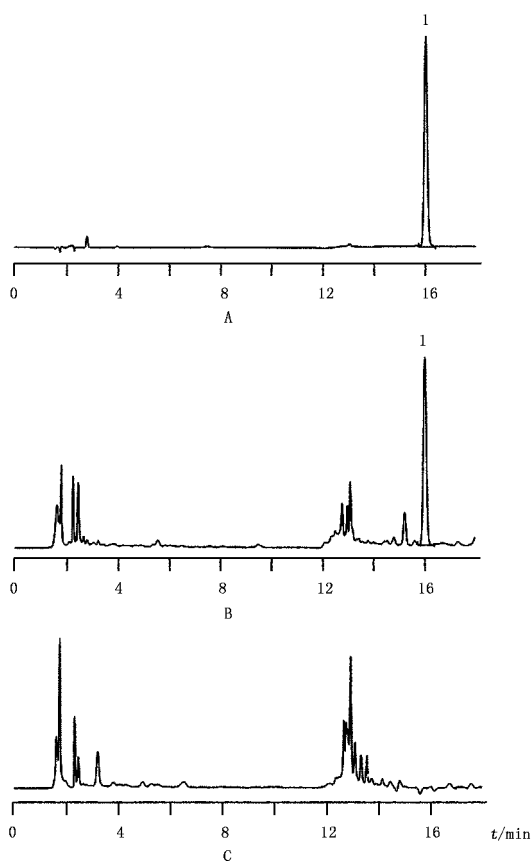


图2 对照品(A)、样品(B)和缺黄芩阴性样品(C)在278 nm处色谱图

Fig 2 Chromatograms of reference substance(A), sample(B), negative sample without *Scutellaria baicalensis*(C)

#### 1. 黄芩苷

96.0%, RSD 分别为 2.7% 2.5%。

表1 加样加回收试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Result of recovery test

| 成分<br>(component)   | 样品含量<br>(content of sample)<br>/mg | 加入量<br>(amount added)<br>/mg | 实测量<br>(amount found)<br>/mg | 回收率<br>(recovery)<br>/% | 平均回收率<br>(average recovery)<br>/% | RSD<br>/% |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------|
| 栀子苷<br>(geniposide) | 2.22                               | 2.215                        | 4.302                        | 94.0                    | 95.6                              | 2.7       |
|                     | 2.173                              | 2.215                        | 4.198                        | 91.4                    |                                   |           |
|                     | 2.222                              | 2.215                        | 4.401                        | 98.4                    |                                   |           |
|                     | 2.219                              | 2.215                        | 4.399                        | 98.4                    |                                   |           |
|                     | 2.176                              | 2.215                        | 4.299                        | 95.8                    |                                   |           |
|                     | 2.18                               | 2.215                        | 4.298                        | 95.7                    |                                   |           |
| 黄芩苷<br>(baicalin)   | 3.472                              | 3.741                        | 7.205                        | 92.6                    | 96.0                              | 2.5       |
|                     | 3.662                              | 3.741                        | 7.212                        | 94.9                    |                                   |           |
|                     | 3.746                              | 3.741                        | 7.436                        | 98.6                    |                                   |           |
|                     | 3.741                              | 3.741                        | 7.450                        | 99.2                    |                                   |           |
|                     | 3.668                              | 3.741                        | 7.231                        | 95.2                    |                                   |           |
|                     | 3.674                              | 3.741                        | 7.249                        | 95.6                    |                                   |           |

2.9 样品含量测定 分别取3个不同批号的牛黄上清片约1.0 g 每批样品各3份 按“2.2.2”项下方法制备样品溶液 按“2.1”项下色谱条件进样分析 计算牛黄上清片中栀子苷和黄芩苷的含量 结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 2 Determination result of sample

| 样品序号<br>(No.) | 栀子苷(geniposide)                     |           | 黄芩苷(baicalin)                       |           |
|---------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
|               | 含量(content)<br>mg · g <sup>-1</sup> | RSD<br>/% | 含量(content)<br>mg · g <sup>-1</sup> | RSD<br>/% |
| 1             | 4.531                               | 1.80      | 7.780                               | 1.9       |
| 2             | 4.520                               | 1.63      | 7.571                               | 1.2       |
| 3             | 4.502                               | 1.88      | 7.502                               | 1.8       |

### 3 讨论与小结

3.1 流动相的选择 选择流动相时,分别比较了甲醇-水、乙腈-水等不同的流动相系统,并加入磷酸为改性剂。结果以乙腈-水为流动相,以0.2%磷酸为改性剂,各成分峰形较好,分离度高。

3.2 检测波长的选择 试验中根据二极管阵列检测器(PAD)上得到的紫外吸收光谱图,选择各被测成分的最大吸收波长,并同时辅助进行成分定性。栀子苷、黄芩苷分别在240 nm 278 nm处有最大吸收,二者难以在同一波长处测定,本试验采用双波长法,分别选择2种成分各自最大吸收波长作为检测波长。

3.3 提取方法的选择 试验中比较了50% 60% , 70% ,100%的甲醇溶液作为溶剂进行超声提取,发现用70%的甲醇水溶液为溶剂,提取效果好;以70%甲醇为提取溶剂,比较了回流法和超声提取法,二者提取效率大致相同,而回流法的提取时间较长,超声提取法一般在30 min就可以完成,本试验选择以70%甲醇为溶剂,超声提取30 min。

3.4 小结 采用双波长RP-HPLC法同时测定牛黄上清片中栀子苷和黄芩苷含量,方法简便,结果准确,重复性好,为更好地控制其内在质量提供了科学依据。

### 参考文献

- Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China (卫生部药品标准). Prescription of Chinese Patent Medicines, Vol 8 (中药成方制剂第八册). 1993: 39
- LIU Yong-lu(刘永路), RONG Shu-ying(容淑盈). HPLC determination of baicalin content in Niu Huang Shangqing Tablets(高效液相色谱法测定黄连上清片中黄芩苷含量). *China Pharm*(中国药业) 2007, 16(12): 43
- FAN Quan-min(范全民), SUN Dong-yun(孙冬云), ZHOU Hui-juan(周慧娟). HPLC determination of baicalin content in Niu Huang Shangqing Tablets( HPLC 测定黄连上清片中黄芩苷含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2006 28(10): 1545
- WANG Xiao-long(王小龙), YE Hong(叶红). HPLC determination of geniposide content in Niu Huang Shangqing Tablets(高效液相色谱法测定黄连上清片中栀子苷含量). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2004 15(1): 7
- DENG Yuan-xiong(邓远雄), LIU Li(刘李), YU Sen(俞森), *et al.* Simultaneous determination of geniposide and 4 flavonoids in the traditional Chinese medicinal preparation Huanglian Jiedu decoction by HPLC with programmed wavelength UV detection( HPLC 程序波长法同时测定黄连解毒汤中栀子苷和4种黄酮类成分的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008 28(2): 182

(本文于2010年10月23日收到)