

高效液相色谱法同时测定牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量

纪松岗¹, 费扬², 赵亮², 吕磊², 柴逸峰³, 张国庆^{2*}

(1 中国人民解放军海军 401 医院药剂科, 青岛 266071;

2 第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438; 3 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 采用高效液相色谱法同时测定牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量。方法: 牛黄降压丸用 50% 乙醇超声提取 3 次, 每次 15 min, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.1% 甲酸-甲醇, B 相为 0.1% 甲酸-水, 梯度洗脱 (0~8 min 30% A; 8~10 min 30% → 39% A; 10~30 min 39% A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。结果: 芍药苷和黄芩苷的回归方程分别为 $Y = 6.724X + 7.063$ ($r = 0.9993$) 和 $Y = 6.744X - 102.5$ ($r = 0.9990$), 线性范围分别为 6.85~53.5 μg·mL⁻¹ 和 106.2~1080 μg·mL⁻¹。方法学考察结果表明, 芍药苷低、中、高 3 个浓度点的日内、日间精密度的 RSD 分别为 1.6%, 1.2%, 1.0% 和 1.8%, 1.8%, 1.2%; 黄芩苷低、中、高 3 个浓度点的日内、日间精密度的 RSD 分别为 1.2%, 0.43%, 0.18% 和 1.9%, 1.1%, 0.54%。芍药苷和黄芩苷最低检测限 ($SN = 3$) 分别为 2.7 μg·mL⁻¹ 和 5.4 μg·mL⁻¹, 加样回收率 ($n = 6$) 分别为 99.57% (RSD = 1.3%) 和 99.76% (RSD = 1.3%)。结论: 采用高效液相色谱法同时测定牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量, 样品处理方法简便, 测定结果准确, 方法专属性强, 精密度高, 重复性好。

关键词: 高效液相色谱法; 牛黄降压丸; 芍药苷; 黄芩苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0602-04

Simultaneous HPLC determination of paeoniflorin and baicalin in Niu Huang Jiangya pills

Ji Song-gang¹, Fei Yang², Zhao Liang², Lü Lei², Chai Yi-feng³, Zhang Guo-qing^{2*}

(1. Department of Pharmacy No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China

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

3. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for determination of paeoniflorin and baicalin in Niu Huang Jiangya pills. **Method** Niu Huang Jiangya pills was extracted with 50% ethanol for 15 min and three times. Analytical column Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); mobile phase A was 0.1% (v/v) formic acid-methanol, B was 0.1% (v/v) formic acid-water, with gradient elution (0-8 min 30% A; 8-10 min 30% → 39% A; 10-30 min 39% A) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; The diode array detection was set at 230 nm; column temperature was 30 °C; injection volume was 5 μL. **Results** The calibration curves were linear within the ranges of 6.85-53.5 μg·mL⁻¹ for paeoniflorin and 106.2-1080 μg·mL⁻¹ for baicalin, their regression were $Y = 6.724X + 7.063$ ($r = 0.9993$) and $Y = 6.744X - 102.5$ ($r = 0.9990$), respectively. The paeoniflorin RSDs of intra-day and inter-day precision (low, middle and high) were 1.6%, 1.2%, 1.0%, and 1.8%, 1.8%, 1.2%; The baicalin RSDs of intra-day and inter-day precision (low, middle and high) were 1.2%, 0.43%, 0.18%, and 1.9%, 1.1%, 0.54%. The limits of detection ($SN = 3$) were 2.7 μg·mL⁻¹ for paeoniflorin and 5.4 μg·mL⁻¹ for baicalin. The recoveries ($n = 6$) were 99.57% (RSD = 1.3%) for paeoniflorin and 99.76% (RSD = 1.3%) for baicalin. **Conclusion** The method is a simple, accurate, stable and reliable in simultaneous determining the contents of paeoniflorin and baicalin in Niu Huang Jiangya pills.

Key words HPLC; Niu Huang Jiangya pills; paeoniflorin; baicalin

* 通讯作者 Tel: (021) 25070852 E-mail: guoqing_zhang91@126.com

牛黄降压丸由人工牛黄、羚羊角、珍珠、水牛角浓缩粉、白芍、决明子、川芎、黄芩提取物、郁金、冰片、甘松、薄荷、党参、黄芪这 14 味中药组成。主要用于治疗心肝火旺、痰热壅盛所致的头晕目眩、头痛失眠、烦躁不安；高血压症^[1]。方中白芍和黄芩提取物的主要活性成分为芍药苷和黄芩苷，具有明显的降血糖^[2]、降压作用^[3,4]。中国药典 2005 年版一部牛黄降压丸的含量测定方法为采用 2 种 HPLC 法分别测定其中芍药苷和黄芩苷的含量，操作烦琐费时，给实际生产过程中的质量控制带来极大不便。因此，建立一种能够同时测定芍药苷和黄芩苷、快速简便且有效的含量测定方法对于制剂的质量控制具有重要意义。目前，有文献 [5] 只对牛黄降压丸中的芍药苷进行含量测定，对于芍药苷和黄芩苷同时测定的方法还未见报道。本实验采用梯度洗脱的方法同时对牛黄降压丸中的芍药苷和黄芩苷进行含量测定，能有效分离待测组分与杂质，方法简便、快速、准确。

1 仪器和试剂

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，METTLER AE240 电子天平；KUDOS-SK2200H 型超声仪；Anke TDL80-2B 型离心机。对照品芍药苷 (0736-9508) 和黄芩苷 (715-200010) 购自中国药品生物制品检定所。牛黄降压丸购自上海雷允上药店 (北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂，规格：大蜜丸 1.6 g × 10 丸/盒，批号：0710895)。甲醇 (Fisher 公司)、甲酸 (上海国药集团) 为色谱纯，水为娃哈哈纯净水。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品芍药苷 10.70 mg 和黄芩苷 10.80 mg 分别置于 2 个 10 mL 的量瓶中，芍药苷用 50% 乙醇溶解并稀释至刻度，黄芩苷用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀。精密吸取上述对照品溶液，按逐级稀释法配制成浓度分别为 53.5, 42.8, 34.24, 17.12, 6.85 μg · mL⁻¹ 的芍药苷对照品溶液和浓度为 1080, 864, 552.96, 353.89, 106.17 μg · mL⁻¹ 的黄芩苷对照品溶液，置于冰箱 4 °C 保存备用。

2.2 供试品溶液的制备 取本品大蜜丸 1 丸称重 1.57 g 切碎取 0.25 g 精密称定。置具塞离心管中，加 50% 乙醇 30 °C 超声 (90 W, 59 kHz) 处理 3 次 (50% 乙醇用量分别为 10, 10, 5 mL)，每次 15 min，3600 r · min⁻¹ 离心 10 min 取上清液，转移至 25 mL

量瓶中，合并滤液，加 50% 乙醇定容至刻度，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，即得供试品溶液，置于冰箱 4 °C 保存备用。

2.3 色谱条件^[6,7] 色谱柱：Agilent SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)；流动相：A 相为 0.1% 甲酸-甲醇，B 相为 0.1% 甲酸-水，梯度洗脱 (0~8 min, 30% A; 8~10 min, 30% → 39% A; 10~30 min, 39% A)；流速：1.0 mL · min⁻¹；检测波长：230 nm；柱温：30 °C；进样量：5 μL。以混合对照品溶液 (芍药苷 17.12 μg · mL⁻¹，黄芩苷 353.89 μg · mL⁻¹) 进样，以芍药苷和黄芩苷的色谱参数计算系统适应性，其理论塔板数分别为 6340 和 17363，分离度为 33.28，拖尾因子分别为 0.984 和 0.997。空白、对照品、样品的色谱图见图 1-A、B、C，在图 1-B 中芍药苷和黄芩苷的出峰时间分别为 6.418 min 和 23.312 min，在图 1-C 中芍药苷和黄芩苷的出峰时间分别为 6.469 min 和 23.381 min。

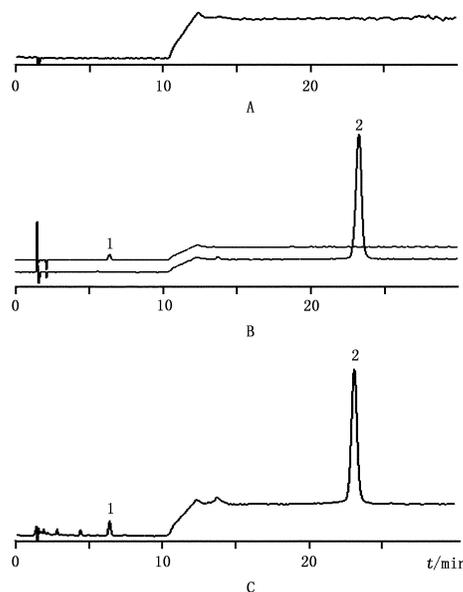


图 1 牛黄降压丸空白对照 (A)、对照品 (B) 及样品 (C) 色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of blank (A), reference substances (B) and Niu Huang Jiangya pills (C)

1. 芍药苷 (paeoniflorin) 2 黄芩苷 (baicalin)

2.4 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⁻¹) 对峰面积 (Y) 进行线性回归。芍药苷及黄芩苷的回归方程分别为：

$$Y = 6.724X + 7.063 \quad r = 0.9993$$

$$Y = 6.744X - 102.5 \quad r = 0.9990$$

线性范围分别为 6.85~53.5 μg · mL⁻¹ 和 106.2~1080 μg · mL⁻¹。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 以 $6.85, 17.12, 53.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液和 $106.17, 552.96, 1080 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷对照品溶液, 在 1 d 之内连续进样 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。芍药苷对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内精密度和日间精密度的 RSD ($n = 5$) 分别为 1.6%, 1.2%, 1.0% 和 1.8%, 1.8%, 1.2%; 黄芩苷对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内精密度和日间精密度 RSD ($n = 5$) 分别为 1.2%, 0.43%, 0.18% 和 1.9%, 1.1%, 0.54%, 表明方法的精密度良好。

2.5.2 检测限考察 将芍药苷对照品溶液和黄芩苷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。芍药苷和黄芩苷的最低检测限分别为 $2.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5.3 稳定性试验 取供试品溶液, 分别在 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h 测定芍药苷和黄芩苷的峰面积, 考察稳定性。芍药苷和黄芩苷峰面积的 RSD ($n = 8$) 分别为 3.3% 和 2.1%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 精密称取牛黄降压丸样品 0.25 g 共 6 份, 按“2.2”项方法制备溶液后, 在“2.3”项色谱条件下测定峰面积, 计算含量。结果芍药苷的平均含量 ($n = 6$) 为 $2.7 \text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$, RSD 为 1.3%; 黄芩苷的平均含量 ($n = 6$) 为 $109 \text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$, RSD 为 1.8%。表明方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取含芍药苷和黄芩苷分别为 $2.7 \text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$ 和 $109 \text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$ 的牛黄降压丸 6 份, 各 0.125 g 分别精密加入浓度为 $0.107 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芍药苷对照品溶液 2 mL 和黄芩苷对照品 8.5mg 按“2.2”项下方法制备成所需溶液, 计算加样回收率。牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的加样回收率结果 ($n = 6$) 分别为 99.57% (RSD = 1.5%) 和 99.76% (RSD = 1.3%)。

2.6 样品测定 取牛黄降压丸供试品溶液 3 份按“2.3”项色谱条件进样分析, 以外标法计算样品含量。结果芍药苷和黄芩苷的平均含量分别为 $2.7 \text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$ (RSD = 0.54%), $109 \text{mg} \cdot \text{丸}^{-1}$ (RSD = 1.3%)。

3 讨论

3.1 提取条件的考察^[8] 采用正交实验设计, 分别对提取溶剂甲醇、50% 乙醇、水, 超声时间 15, 30, 45 min, 超声次数 1, 2, 3 次进行考察。结果以 50%

乙醇为提取溶剂, 超声 15 min, 超声 3 次所得芍药苷和黄芩苷总含量最高, 因此本实验选择提取溶剂为 50% 乙醇, 超声时间为 15 min, 超声次数为 3 次。由于在提取过程中溶剂有损失, 所以在转移至 25 mL 量瓶后需要再用 50% 的乙醇补足定容。

3.2 流动相的考察 结合中国药典 2005 年版一部中的方法并对多种流动相的不同比例进行了筛选, 在用甲醇-水分离过程中黄芩苷的峰形不好, 在流动相中加入一定比例的酸后结果明显有所改善, 经过对酸的种类、浓度及流动相洗脱梯度的考察, 得出最佳流动相组成: A 相为 0.1% 甲酸-甲醇, B 相为 0.1% 甲酸-水; 洗脱梯度: 30% A (0~8 min), 30% → 39% A (8~10 min), 39% A (10~30 min)。

3.3 检测波长的选择 采用 DAD 全光谱扫描, 芍药苷和黄芩苷的最佳吸收波长分别为 230 nm 和 280 nm, 而在 230 nm 处芍药苷和黄芩苷都有吸收且共同吸收最大, 同时还可以排除杂质对黄芩苷峰的干扰, 故选择 230 nm 为检测波长。

3.4 提取方法的选择 本实验采用 HPLC 法同时测定牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量, 既比分开测定缩短了分析时间提高工作效率, 还节约流动相减少污染。由于芍药苷受热不稳定故采用控温超声提取避免了加热回流提取和煎煮提取由于过高的温度对样品中芍药苷的破坏, 而且该方法操作简单。所得结果的精密度高, 重现性好, 且无空白干扰。

3.5 标准曲线范围的选择 因为在牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量差异较大, 且两者的极性和吸收波长也有较大的差异。故在中国药典 2005 年版一部中分别采用 2 种不同的方法对牛黄降压丸中的芍药苷和黄芩苷的含量进行测定。本方法通过紫外全光谱扫描测得在芍药苷的最大吸收波长 230 nm 处黄芩苷也有较大的吸收, 而且在此波长处采用梯度洗脱不仅可以排除杂质的干扰还可以缩短分析时间提高效率。由于含量差异较大, 因此建立 2 条线性范围差异较大的不同标准曲线 (线性范围: 芍药苷 $6.85 \sim 53.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和黄芩苷 $106.17 \sim 1080 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 使样品测得结果更加准确。

参考文献

- 1 WU Xue-xiu (吴学秀), HAN Yu-quan (韩玉全). Clinical application of Niu Huang Jangya pill for hypertension treatment (牛黄降压丸治疗高血压的临床应用). *Qingdao Med J* (青岛医药卫生), 2005, 37(4): 275
- 2 Hsu FL, Lai CHW, Cheng JF. Antihyperglycemic effects of Paeoniaiflorin and 8-debenzoylpaeoniflorin glucoside from the root of paeonia

- lactiflora *Plant Med*, 1997, 63(4): 323
- 3 JI Xiang-fu (纪相福), SHI Dao-hua (史道华). Advances in studies of baicalin on cardiovascular and cerebrovascular pharmacology (黄芩苷的心脑血管作用研究进展). *Stu Pharm J* (海峡药学), 2006, 18(5): 10
 - 4 ZHANG Chun-jian (张春建), ZHANG Hua (张华), SHI Ying (施瑛), et al. Recent developments in studies of baicalin (黄芩苷的研究近况). *Lishichen Mat Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16(8): 247
 - 5 YANG Shu-liang (杨书良). Determination of paeoniflavin in Nihuang Jiaogya pill by HPLC (HPLC法测定牛黄降丸中芍药苷的含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(11): 1006
 - 6 WANG Dong (王栋), MA Shi-xe (麻世泽), SU Li-hua (隋丽华), et al. Determination of paeoniflavin and baicalin in Yangzhen granule by RP-HPLC (RP-HPLC法测定痒疹颗粒中芍药苷和黄芩苷). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(11): 1659
 - 7 LIU Ying-ying (刘英英), NI Jian (倪健), BAI Sha (白莎), et al. Determination of paeoniflavin and baicalin in Chenhuang granule (陈黄颗粒中黄芩苷和芍药苷两种指标成分的含量测定). *Lishichen Mat Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16(8): 743
 - 8 ChP (中国药典). 2005 Vol II (一部): 382
- (本文于 2008 年 8 月 11 日修改回)

2009年中检所国家药品抽验工作会议

为贯彻执行国家食品药品监督管理局《关于印发 2009 年全国药品抽验工作计划的通知》(国食药监稽[2009]45号)的要求,全面落实推进国家药品抽验工作,2009年4月3日,我所召开了“2009年中检所国家药品抽验工作会议”,中检所党委书记、所长李云龙、常务副所长金少鸿和副所长王军志出席。

中检所所长办公室主任杨昭鹏主持会议。中检所药品检验处处长马双成传达了国家局于 2009 年 3 月 11 日召开的全国药品抽验工作会议精神;中检所药品市场监督办公室抽验管理处处长姜勋财布置了 2009 年中检所抽验工作任务及要求;中检所生物制品检验处处长李凤祥和抗生素室主任胡昌勤分别就如何做好国家药品抽验的管理和检验工作做了经验介绍。

金少鸿常务副所长和王军志副所长分别就提高对国家药品抽验工作重要性的认识、按照国家局的有关指示精神,科学的、高水平的完成 2009 年国家药品、生物制品抽验工作等提出了具体要求。

李云龙所长指出,2009 年国家药品抽验任务是中检所的重要任务之一,希望通过这项工作,使中检所 2009 年业务建设和业务管理工作再上新台阶,并对抽验工作提了三点要求:

一、加强 2009 年中检所国家药品抽验工作的组织领导。要求各级领导不仅要懂业务、做业务,更要抓业务;实行业务管理责任制,加强业务管理处的业务管理工作;要求所内上下协调一致,出现问题要及时协调,及时解决,保障 2009 年中检所国家药品抽验工作的顺利进行。

二、药品市场监督办公室是全国也是中检所监督检验的职能部门,是中检所监督检验的牵头和协调部门,要充分发挥综合、组织、协调和管理的作用。

三、业务科室是完成监督抽验工作检验任务的主体,负责人要充分重视,统筹安排,责任到人。要将抽验工作与人才培养、科研工作、标准研究和奖金分配相结合,充分调动和发挥技术人员的积极性,高质量、高水平的完成任务。

中检所药品市场监督办公室、所长办公室、党委办公室、药品检验处、生物制品检验处、医疗器械检验处、信息处、标准物质管理处的负责人,以及承担 2009 年中检所国家药品抽验检验任务的 12 个科室负责人及技术人员代表 38 人参加了会议。

(中检所所长办公室、药品市场监督办公室供稿)