

双波长 HPLC 同时测定防风通圣丸中 栀子苷和黄芩苷的含量

侯志坚¹, 师永清^{2*}

(1. 定西市药品检验所, 甘肃 定西 743000; 2. 西北民族大学化工学院, 兰州 730030)

[摘要] 目的: 建立同时测定防风通圣丸中栀子苷和黄芩苷含量的方法。方法: 采用双波长 HPLC, Hibar C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长分别为 240 nm(栀子苷)、278 nm(黄芩苷), 柱温 30 ℃。结果: 栀子苷和黄芩苷进样量分别在 0.16 ~ 0.8 μg, 0.24 ~ 1.2 μg, 线性关系良好, 平均回收率分别为 96.0%, 100.7%, RSD 分别为 2.96%, 2.86%。结论: 该法简便、准确、重复性好, 可用于同时测定防风通圣丸中栀子苷和黄芩苷含量。

[关键词] 反相高效液相色谱; 防风通圣丸; 栀子苷; 黄芩苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0080-03

Simultaneous Determination of Geniposide and Baicalin Content in Fangfengtongsheng Pill by Double Wavelength HPLC

HOU Zhi-jian¹, SHI Yong-qing^{2*}

(1. Dingxi Institute for Drug Control, Dingxi 743000, China;

2. College of Chemical Engineering Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining geniposide and baicalin in Fangfengtongsheng pill. **Method:** A double wavelength RP-HPLC method was developed. The analysis was performed on a Hibar C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with gradient elution using acetonitrile-0.2% phosphoric acid, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Geniposide and baicalin were detected at 240 nm and 278 nm respectively. The column temperature was 30 ℃. **Result:** The calibration curves of geniposide and baicalin showed good linearity in the ranges of 0.16-0.8 μg and 0.24-1.2 μg. The average recoveries were 96.0% and 100.7% with RSD of 2.96% and 2.86%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible for simultaneous determining geniposide and baicalin in Fangfengtongsheng pill.

[Key words] RP-HPLC; Fangfengtongsheng pill; geniposide; baicalin

防风通圣丸由防风、荆芥穗、薄荷、麻黄、大黄、芒硝、栀子、滑石、桔梗、石膏、川芎、当归、白芍、黄芩、连翘、甘草、白术(炒)等 17 味药材组成, 具有解

表通里, 清热解毒之功效, 主要用于治疗外寒内热, 表里俱实, 恶寒壮热, 头痛咽干, 小便短赤, 大便秘结, 风疹湿疮等症。标准收载常规检查鉴别项, 含量测定未作规定^[1], 难以有效控制产品质量。单独测定防风通圣丸中栀子苷或黄芩苷含量的方法文献报道较多^[2-4], 但同时测定防风通圣丸中栀子苷和黄芩苷的含量未见文献报道。本文采用双波长 HPLC 同时测定防风通圣丸中栀子苷和黄芩苷的含量, 方法简便, 分离度好, 结果准确, 适用于防风通圣丸的产品质量控制分析。

[收稿日期] 20110311(014)

[第一作者] 侯志坚, 主管药师, 本科, 从事中药质量检验及中药质量标准研究, Tel: 13909321589, E-mail: houzhijian1963@163.com

[通讯作者] * 师永清, 副教授, 本科, 从事药物分析教学和药品质量标准研究, Tel: 13919107137, E-mail: syq631110@163.com

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),色谱柱为 Hibor-C₁₈ 柱(4.6 mm × 160 mm, 5 μm), AS3120 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); EL204-2C 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),磷酸(分析纯,天津市百世化工有限公司),水为超纯水。黄芩苷(批号 715-200111,供含量测定用)、栀子苷(批号 0749-9404,供含量测定用)均由中国药品生物制品检定所提供;防风通圣丸(批号 090901,091201,100313,甘肃众友药业股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hibor-C₁₈ 柱(4.6 mm × 160 mm, 5 μm),流动相 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱依次为(0.00 ~ 9.00 min) 12% B,(9.00 ~ 10.00 min) 12% ~ 25% B,(10.00 min 以后),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长分别为 240 nm(栀子苷),278 nm(黄芩苷),柱温 30 °C。

2.2 溶液的制备

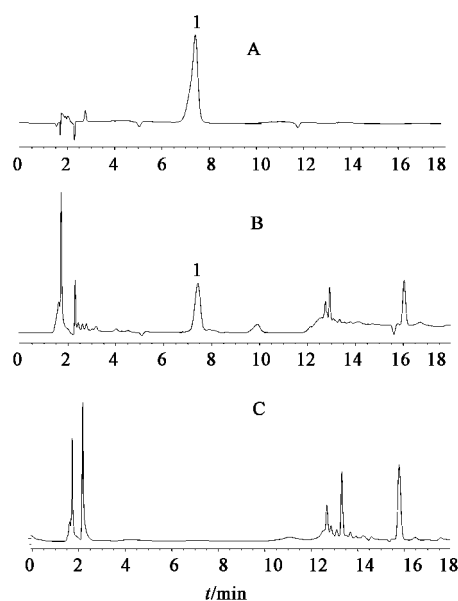
2.2.1 对照品溶液 精密称取减压干燥至恒重的栀子苷对照品 8.0 mg,黄芩苷对照品 9.0 mg,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解,放冷至室温,定容,即得含栀子苷、黄芩苷 0.16 g·L⁻¹,0.18 g·L⁻¹ 的对照品储备液 4 °C 保存,临用时取出,放至室温。分别精密量取上述对照品储备溶液,按体积 1:1 混合均匀,即得含栀子苷 0.08 g·L⁻¹,黄芩苷 0.09 g·L⁻¹ 的对照品混合溶液。

2.2.2 样品溶液 取样品适量,剪碎,精密称取约 0.9 g,置研钵中研细,以 70% 甲醇水溶液 40 mL 定量转移至置 50 mL 量瓶中,超声提取 30 min,放冷至室温,70% 甲醇水溶液定容,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 阴性对照样品溶液 栀子苷、黄芩苷分别来源于处方中的药材栀子、黄芩,按防风通圣丸的处方比例和生产工艺^[1],分别制备缺栀子、缺黄芩阴性对照样品,按 2.2.2 项下方法制备阴性对照样品溶液。

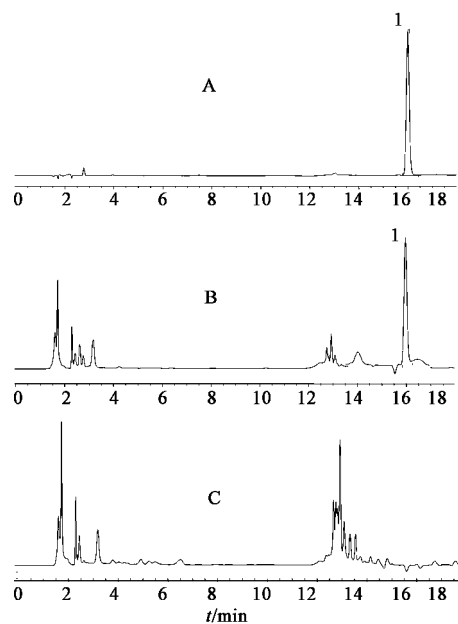
2.3 专属性试验 取对照品溶液、样品溶液及各阴性对照样品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样分析,结果在样品溶液色谱图中,分别有与对照品溶液栀子苷、黄芩苷保留时间一致的特征峰,保留时间分

别为 7.5,16.0 min,阴性对照样品无此特征峰,如图 1 2。表明阴性样品对所测组分无干扰。



1. 栀子苷

图 1 对照品(A)样品(B)缺栀子阴性样品(C)在 240 nm 处色谱



1. 黄芩苷

图 2 对照品(A)样品(B)缺黄芩阴性样品(C)在 278 nm 处色谱

2.4 标准曲线与线性范围 取对照品混合溶液,按上述 2.1 项下色谱条件,自动进样 1,4,8,12,16 μL,记录色谱图。以对照品进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得栀子苷、黄芩苷回归方程分别为 $Y = 1484.03X + 40.25$ ($r = 0.9999$);

$Y = 2494.5X + 14.94$ ($r = 0.9996$)。表明栀子苷进样量在 0.08 ~ 1.28 μg , 黄芩苷进样量在 0.09 ~ 1.44 μg 线性关系良好。

2.5 精密性试验 取对照品混合溶液,按 2.1 项下色谱条件,自动重复进样 5 次,进样量 10 μL ,记录色谱图。结果栀子苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.68%、1.59%,表明仪器精密性良好。

2.6 重复性试验 取同一批号样品(批号 090901) 6 份,按 2.2.2 项下方法分别制备样品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样分析,进样量 15 μL 。计算栀子苷和黄芩苷的平均含量分别为 0.0106, 0.0931 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.79%、2.49%,表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取配制好的同一批号样品溶液(批号 090901),室温下放置,分别于配制后 0、2、4、6、8 h 各进样 1 次,记录色谱图。栀子苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 2.81%、3.63%,表明样品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.8 加样回收试验 取同一批号(090901)防风通圣丸样品约 0.45 g,共 6 份,精密称定,按 2.2.2 项下方法,分别制备样品溶液。精密吸取上述溶液各 5.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,各精密加入栀子苷对照品储备液(0.16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.2 mL,黄芩苷对照品储备液(0.18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.2 mL,加 70% 甲醇水溶液定容,摇匀,静置,取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 2.1 项中色谱条件,分别进样分析,进样量 15 μL ,计算各被测成分的平均回收率,结果如表 1。

2.9 样品含量测定 取不同批号的防风通圣丸样品(10 丸 \times 9 克) 3 批,分别按 2.2.2 项下方法制备样品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样分析,进样量 15 μL ,记录峰面积,分别计算样品中栀子苷、黄芩苷的含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。每批样品测定 3 份,结果如表 2。

3 小结与讨论

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。

表 1 防风通圣丸中栀子苷和黄芩苷加样回收试验($n=6$)

被测成分	称样量	样品中含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率
	/ g	/ μg	/ μg	/ μg	/ $\%$	/ $\%$
栀子苷	0.4489	26.5	32	56.2	92.7	92.7
	0.4502	26.6	32	58.8	100.6	
	0.4512	26.7	32	55.8	91.0	
	0.4524	26.7	32	56.2	92.1	
	0.4492	26.5	32	56.1	92.4	
黄芩苷	0.4488	26.5	32	56.2	92.7	
	0.4489	232.9	216	452.2	101.5	101.5
	0.4502	233.6	216	450.8	100.6	
	0.4512	234.1	216	436.8	93.9	
	0.4524	234.7	216	432.1	91.4	
	0.4492	233.0	216	434.6	93.3	
	0.4488	232.8	216	428.6	90.6	

表 2 防风通圣丸中栀子苷黄芩苷含量测定($n=3$)

批号	栀子苷		黄芩苷	
	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/ $\%$	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/ $\%$
090901	0.591	2.61	5.188	1.85
091201	0.546	1.63	4.872	1.45
100313	0.563	1.15	5.007	2.13

栀子苷、黄芩苷分别在 240、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,结果以 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 70% 甲醇为溶剂,超声提取 30 min。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:456
- [2] 赵排风,蔡旭升,赵晓波. HPLC 法测定防风通圣丸中大黄素、大黄酚的含量[J]. 中国药师,2009,12(11):1590
- [3] 王晓勇,赵卫,张军华,等. RP-HPLC 法测定防风通圣丸中黄芩苷的含量[J]. 中国药品标准,2003,4(2):23.
- [4] 尹姗姗,姚令文. 高效液相色谱法测定防风通圣丸中黄芩苷含量[J]. 中国药业,2007,21(11):902.

[责任编辑 蔡仲德]