

对中国兽药典中黄芩含量测定方法的改进

孙汝萌¹, 马惠文², 于仁良¹, 董彦梓²

(1 烟台绿叶动物保健品有限公司, 山东烟台 264003 2 烟台市畜牧检测中心, 山东烟台 264000)

[收稿日期] 2004-07-28 [文献标识码] B [文章编号] 1002-1280(2005)04-0021-03 [中图分类号] R927.2

[摘要] 采用反相高效液相色谱法测定黄芩中黄芩苷的含量。色谱柱为 luna C₁₈柱 (5 μm, 250 mm × 4.60 mm); 流动相为乙腈-水-磷酸 (30:70:0.1, V/V); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为 35 °C。黄芩苷浓度在 29.4~102.9 μg/mL 范围内, 峰面积与浓度间有良好的线性关系 ($r=0.9997$), 平均回收率为 98.6%, RSD 为 0.60%。

[关键词] 高效液相色谱法; 黄芩; 黄芩苷

黄芩是唇形科黄芩属植物黄芩的根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功能。黄芩中所含黄酮类活性成分种类较多, 含量较高, 主要有黄芩苷、黄芩素等^[1]。2000年版《中国兽药典》二部用 HPLC 方法测定黄芩中黄芩苷的含量 (以下简称药典法), 但笔者在实际检测过程中发现其色谱图极不理想 (峰前拖尾或多个色谱峰), 经改变流动相所用溶剂进行实验, 较好地解决了这一问题。

1 仪器与试剂

1.1 材料 黄芩饮片, 购自河北安国药材市场, 由烟台大学药学院张凤梅老师鉴定; 黄芩苷对照品, 批号 110715-200212, 购自中国药品生物制品检定所, 纯度 > 99.5%; 黄芩苷原料, 购自四川金堂天然植物药厂, 自己精制, 含量为 99.5%。

1.2 仪器与设备 高效液相色谱仪, Agilent1100 VWD, 紫外检测器, 美国 Agilent Technologies 公司; 电子天平, 德国赛多利斯公司。

1.3 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯试剂, 中国医药集团上海化学试剂公司; 磷酸, 分析纯, 山东济南化学试剂厂; 蒸馏水, 烟台绿叶动物保健品有限公司自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 luna C₁₈ 色谱柱 (5 μm, 250 mm × 4.60 mm, Phenomenex 公司); 流动相, 药典法为甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2, V/V)^[2], 本法为乙腈-

水-磷酸 (30:70:0.1, V/V); 流速 1.0 mL/min; 检测波长为 280 nm; 柱温 35 °C。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取黄芩苷对照品 14.7 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密移取对照品储备液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备^[2] 取黄芩饮片粉碎后的中粉约 0.3 g 精密称定, 加 70% 乙醇 40 mL, 加热回流 3 h 冷却至室温, 过滤, 滤液置 100 mL 量瓶中, 用少量 70% 乙醇洗涤容器和残渣, 洗液滤入同一量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

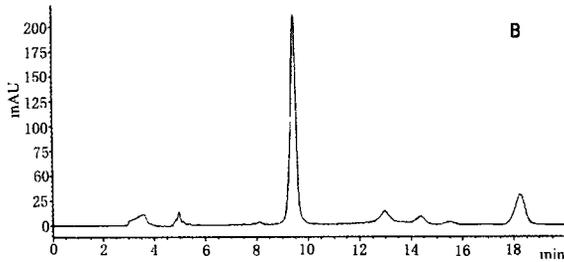
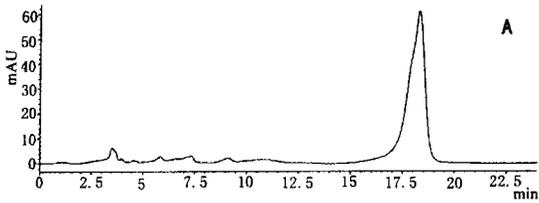
2.3 系统适用性试验 取 2.2.2 项下的对照品溶液 20 μL, 在 2 种色谱条件下分别注入色谱仪, 比较 2 种色谱条件的 4 种参数, 结果见表 1, 其色谱图见图 1。

2.4 标准曲线的制备 分别精密量取对照品储备液 2.34567 mL, 加甲醇稀释至 10 mL, 摇匀, 制得系列标准溶液。各取 20 μL 依次注入色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件测定黄芩苷的峰面积 (见表 2), 以浓度 C 为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准

曲线。经回归分析,得回归方程: $y = 47.2503x + 30.54$ $r = 0.9997$ 。结果表明黄芩苷浓度在 29.4~102.9 $\mu\text{g/mL}$ 范围内其峰面积与浓度呈良好线性关系。

表 1 系统适用性试验结果比较

	保留时间 /min	理论板数	分离度	对称因子
本法	9.431	10122	3.67	0.995
药典法	18.380	2717	3.51	2.300



A. 药典方法: 流动相为甲醇-水-磷酸 (47: 53: 0.2 V/V);
B. 本试验方法: 流动相为乙腈-水-磷酸 (30: 70: 0.1 V/V)

图 1 黄芩苷色谱图

表 2 黄芩苷含量测定标准曲线

浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	29.4	44.1	58.8	73.5	88.2	102.9
峰面积	1412	2085	2833	3541	4209	4857

2.5 重复性试验 取同一批黄芩中粉,称取 5 份,分别制备供试品溶液进行测定,经计算,本方法的 RSD 为 0.60% ($n=5$)。结果见表 3。

表 3 重复性试验结果

进样次数	1	2	3	4	5	平均值	RSD /%
含量 /%	11.45	11.31	11.32	11.45	11.37	11.38	0.60%

2.8 加样回收率试验 分别精密称取已知含量的黄芩中粉 9 份,每份 0.3 g 各精密加入一定量的黄芩苷原料(含黄芩苷为 99.5%),按 2.2.3 项下方法制备样品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,同时测定 2.2.2 项下对照品溶液,按外标法计算含量,与加入量比较计算回收率,结果见表 4。回收率与相对标准偏差符合要求,表明本方法具有良好的检测性能。

表 4 加样回收率试验结果

	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	/mg	/mg	/%	/%	/%
80%	24.602	24.191	98.33	98.30	0.50
	24.608	24.307	98.78		
	24.61	24.067	97.79		
100%	30.004	29.776	99.24	98.80	0.52
	30.011	29.684	98.91		
	30.006	29.479	98.24		
120%	36.405	35.735	98.16	98.62	0.46
	36.408	35.916	98.65		
	36.402	36.059	99.06		

2.9 样品测定 取 2 批黄芩饮片,按 2.2.3 项下方法制备样品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进行测定,同时采用药典方法测定样品,结果见表 5。

表 5 黄芩饮片含量测定结果 ($n=3$)

药品来源	本法		药典法	
	含量 /%	RSD /%	含量 /%	RSD /%
安国长安药行	11.4	0.51	11.2	1.81
安国宏昌药行	10.6	0.54	10.1	1.65

3 结论与讨论

3.1 系统适用性试验结果表明,本法的色谱条件明显优于药典法。

3.2 笔者按照《中国兽药典》2000 版黄芩的含量测定方法以甲醇-水-磷酸 (47: 53: 0.2 V/V) 为流动相,对照品与药材的黄芩苷峰形都极不理想,经反复调整流动相的比例,黄芩苷的峰形仍没有太大改进。先后使用美国 Agilent 公司的 ZORBAX ODS 柱 (5 μm , 150 mm \times 4.60 mm) 和 SUPELCO 公司的 Discovery C₁₈ 柱 (5 μm , 25 cm \times 4.60 mm), 换用美国 TSP 公司的液相色谱仪,图谱均不理想,有的色谱峰出现峰前拖尾,有的出现几个杂乱的峰。通过反复实验,排除了色谱仪、色谱柱等影响因素,最后以乙腈-水-磷酸 (30: 70: 0.1 V/V) 为流动相,改善了黄芩苷的峰形,并使样品的保留时间缩短一半。

3.3 笔者推测,改变流动相使黄芩苷峰形获得改进的原因可能是由于黄芩苷属酚羟基化合物^[1],呈弱酸性,在自然界中多与金属离子结合,以成盐的形式存在,即以离子态存在。离子态黄芩苷进入流动相难以瞬间还原为游离态,导致以离子态与游离态多种形式并存。将流动相换为乙腈-水-磷酸 (30: 70: 0.1 V/V),减小了流动相的极性,使固定

相、流动相与样品的极性相匹配, 有利于样品呈游离状态, 使黄芩苷的溶解度增加, 因此有效改善了样品组分的分离效果。

3.4 黄芩苷在甲醇中溶解度较小, 加入甲醇后超声 2 min 即可溶解。

3.5 该实验结果提示, 《中国兽药典》2000年版二部黄芩含量测定方法还应进一步完善。本文所述方法经过方法学考察, 表明方法可靠, 准确度高, 重

复性好, 适合于黄芩的含量测定。

参考文献:

- [1] 陈友梅, 张如意, 王禄昌, 等. 中药化学 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999: 172
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二部 二〇〇〇版 [S]. 255-256.

Improvement for the method of determining baicalin in scutellaria by HPLC

SUN Rurmeng¹, MA Huirwen², YU Ren-liang¹, DONG Yan-zi²

(1. Yantai Luye Animal Health Products Co Ltd, Yantai Shandong 264003;

2. Animal Husbandry Monitoring Center of Yantai, Yantai Shandong 264003, China)

Abstract A HPLC method was established by using the Luna C₁₈ column (5 μm, 250 mm × 4.60 mm). The mobile phase consisted of MeCN - purified water - phosphoric acid (30:70:0.1, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 280 nm, the temperature of column was 35 °C. The linear range of baicalin was 29.4~102.9 μg/mL, $r = 0.9997$, and the average recovery of the method was 98.6% with RSD of 0.60%.

Key words HPLC; *Scutellaria baicalensis* Georgi; baicalin

《兽药生产企业许可证》和兽药产品批准文号 将陆续在中国兽药信息网定期公布

农业部于 2005 年 3 月 11 日发布第 472 号公告, 从 2005 年 4 月 1 日起, 农业部将利用中国兽药信息网定期公布《兽药生产企业许可证》兽药产品批准文号等相关信息。农业部就有关事项公告如下:

一、兽药品种编号是兽药产品批准文号的重要组成部分, 自 2005 年起核发的产品批准文号的编制格式应符合《兽药产品批准文号管理办法》规定, 其品种编号应与公布的兽药品种编号一致。二、本公告公布的兽药品种编号均为兽药国家标准收录的品种, 对新增兽药国家标准或新增规格 (含量或包装) 的品种编号按品种分类及顺序编号, 农业部将定期公布。三、兽药品种编号中的兽药品种未注明规格的, 以农业部发布的该品种质量标准或兽药典载明的规格为准。四、兽药地方标准不实行品种编号。自 2005 年起农业部不受理兽药地方标准产品批准文号的申请, 该类产品批准文号有效期满后企业应停止生产, 企业所在地省级兽医行政管理部门应及时注销其产品批准文号。五、经兽药安全评价确定淘汰或禁用的品种, 农业部将公布废止该品种质量标准和品种编号的清单, 并限期停止生产、经营、使用。六、从 2005 年 4 月 1 日起, 农业部将利用中国兽药信息网 (<http://www.ivdc.gov.cn>) 定期公布《兽药生产企业许可证》兽药产品批准文号等相关信息。请各级兽医行政管理部门注重信息的收集、利用, 并依照公布的信息组织开展兽药监督执法工作。