

双波长 HPLC 同时测定熊胆丸中栀子苷和黄芩苷的含量

师永清(西北民族大学化工学院, 兰州 730030)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定熊胆丸中栀子苷和黄芩苷含量的方法。方法 色谱柱为 Hibar C₁₈ 柱(150 mm×4.6 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, B: 15%(0~9 min), 15%→25%(9~10 min), 25%(10~17 min); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为室温; 检测波长分别为 240 nm(栀子苷), 278 nm(黄芩苷)。结果 栀子苷、黄芩苷保留时间分别为 4.5, 15.6 min 左右, 进样质量分别在 0.08~0.8, 0.23~2.3 μg 内线性关系良好, 线性回归方程分别为 $Y=1\ 413.8X+20.75$, $r=0.999\ 8(n=5)$; $Y=2\ 788.7X+11.4$, $r=0.999\ 9(n=5)$, 平均回收率分别为 96.0%, 103.6%, RSD 分别为 1.75%, 2.01%。结论 该法快速、准确, 重复性、精密度良好, 适用于测定熊胆丸中栀子苷和黄芩苷的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 熊胆丸; 栀子苷; 黄芩苷

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)08-0762-04

Simultaneous Determination of Geniposide and Baicalin Content in Xiongdan Pills by Double Wavelength HPLC

SHI Yongqing(College of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a double wavelength HPLC for simultaneously determination of geniposide and baicalin in Xiongdan pills. **METHODS** The analysis was performed on an Hibar C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with gradient elution using 0.2% phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) in the order of B 15%(0–9 min), 15%→25%(9–10 min), 25%(10–17 min), 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 room temperature. **RESULTS** The calibration curves of geniposide and baicalin showed good linearity in the ranges of 0.08–0.8 μg and 0.23–2.3 μg. The average recoveries were 96.0% and 103.6% with RSD of 1.75% and 2.01%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible for simultaneous determining geniposide and baicalin in Xiongdan Pills.

KEY WORDS: HPLC; Xiongdan pills; geniposide; baicalin

熊胆丸由龙胆草、泽泻(盐制)、地黄、当归、栀子、菊花、车前子(盐制)、决明子、柴胡、防风、黄芩、木贼、黄连粉、薄荷脑、大黄、冰片、熊胆等 17 味药材组成, 具有清热散风、止痛退翳之功效。主要用于治疗风热或肝经湿热引起的目赤肿痛、羞明多泪^[1]。栀子与黄芩是该处方的主要组分, 其有效成分为栀子苷和黄芩苷, 原标准对其

含量测定未作规定, 文献报道单独测定其他制剂中栀子苷、黄芩苷含量的方法较多^[2-5], 有关 HPLC 同时测定熊胆丸中栀子苷和黄芩苷双组分的含量, 未见文献报道。本实验采用双波长 HPLC 同时测定熊胆丸中栀子苷和黄芩苷双组分的含量, 方法简便、分离度好、结果准确, 为更好地控制其内在质量提供了科学依据。

作者简介: 师永清, 男, 副教授 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 Hibar C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); AS 3120 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)。

对照品: 栀子苷(批号: 0749-9404, 供含量测定用)、黄芩苷对照品(批号: 715-200111, 供含量测定用)均由中国药品生物制品检定所提供; 熊胆丸(云南白药集团股份有限公司, 批号: 20081102; 吉林省华侨药业有限公司, 批号: 20080601; 吉林省通化博祥药业有限公司, 批号: 090710)均为市售品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hibar C₁₈ 柱(150 mm×4.6 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: 15%(0~9 min), 15%→25%(9~10 min), 25%(10~17 min), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 240 nm(栀子苷)、278 nm(黄芩苷); 柱温为室温。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取减压干燥至恒重的栀子苷、黄芩苷对照品 1.6, 2.3 mg, 分别置于 10, 5 mL 量瓶中, 用甲醇超声溶解并定容, 即得栀子苷、黄芩苷浓度分别为 0.16, 0.46 mg·mL⁻¹ 的对照品储备溶液; 分别精密吸取上述对照品储备溶液, 按体积比 1:1 混合均匀, 即得栀子苷、黄芩苷浓度分别为 0.08, 0.23 mg·mL⁻¹ 的对照品混合溶液。

2.2.2 样品溶液的制备 取熊胆丸约 0.5 g, 精密称定, 用 40 mL 70% 甲醇水溶液定量转移至 50 mL 量瓶中, 超声提取 30 min, 取出放冷至室温, 加 70% 甲醇水溶液定容, 摇匀, 静置, 取上清液, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得样品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 栀子苷、黄芩苷分别来源于处方中的药材栀子、黄芩, 按熊胆丸的处方比例和生产工艺分别制备不含黄芩、栀子的阴性对照样品, 按“2.2.2”项下样品溶液的制备方法分别制备阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别取对照品溶液、样品溶液、阴性样品溶液, 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 4.5, 15.6 min, 阴性样品无此特征峰, 表明阴性样品对所测组分无干扰, 色谱图见图 1 和图 2。

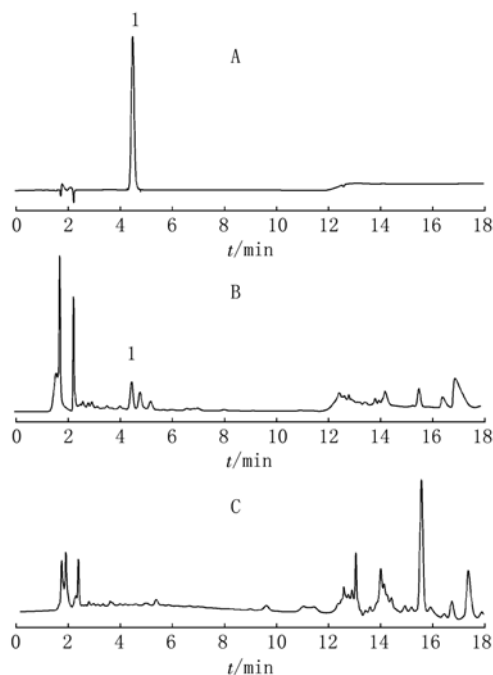


图 1 240 nm 处色谱图

A—对照品; B—样品; C—阴性样品; 1—栀子苷

Fig 1 Chromatograms at 240 nm

A—control; B—sample; C—negative sample; 1—gardenoside

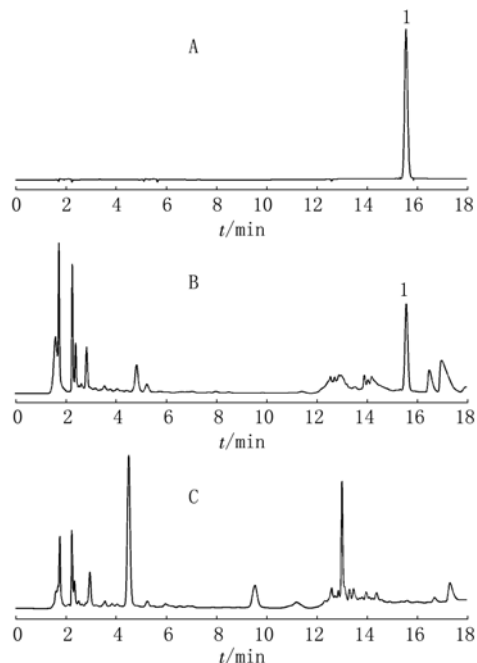


图 2 278 nm 处色谱图

A—对照品; B—样品; C—阴性样品; 1—黄芩苷

Fig 2 Chromatograms at 278 nm

A—control; B—sample; C—negative sample; 1—baicalin

2.4 线性关系考察

取含栀子苷($0.08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和黄芩苷($0.23\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,自动进样1,2,4,6,8,10 μL ,记录峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标,进样质量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,进行线性回归,得栀子苷、黄芩苷回归方程分别为 $Y=1\,413.8X+20.75$, $r=0.999\,8(n=5)$ 、 $Y=2\,788.7X+11.4$, $r=0.999\,9(n=5)$ 。结果表明,栀子苷、黄芩苷进样质量分别在0.08~0.8,0.23~2.23 μg 内线性关系良好。

2.5 仪器精密度试验

取同一浓度的对照品混合溶液,按“2.1”项下色谱条件,自动重复进样6次,进样量5 μL ,记录色谱图,结果栀子苷、黄芩苷峰面积RSD分别为1.5%,1.76%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取配制好的同一批号熊胆丸样品溶液,室温下放置,分别于制备后0,2,4,6,8 h各进样一次,进样量为10 μL ,结果栀子苷、黄芩苷峰面积RSD分别为1.72%,2.85%。表明样品溶液在8 h

内基本稳定。

2.7 重复性试验

分别精密称取同一批号样品6份,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10 μL ,分别记录栀子苷、黄芩苷峰面积,计算样品含量,栀子苷、黄芩苷含量RSD分别为2.14%,1.73%,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(批号:20081102)熊胆丸6份,每份约0.25 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法,分别制备样品溶液。精密吸取上述样品溶液各5.0 mL,分别置10 mL量瓶中,各加含栀子苷 $0.16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷 $0.46\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液0.60,0.25 mL,加甲醇定容,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”项下色谱条件,分别进样分析,进样量10 μL ,记录峰面积,结果见表1,栀子苷、黄芩苷平均回收率分别为96.0%,103.6%,RSD分别为1.75%,2.01%。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 The result of recovery test($n=6$)

称样量/g	样品溶液中被测成分的量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.250 1	栀子苷	103.3	96	189.2	94.9	1.75
0.251 1		103.7	96	196.2	98.2	
0.252 2		104.2	96	187.3	93.6	
0.250 8		103.6	96	192.2	96.3	
0.250 1		103.3	96	189.8	95.2	
0.252 1	黄芩苷	104.1	96	195.3	97.6	2.01
0.250 1		117.3	115	240.0	103.3	
0.251 1		117.8	115	245.2	105.3	
0.252 2		118.3	115	244.4	104.8	
0.250 8		117.6	115	243.6	104.7	
0.250 1		117.3	115	241.2	103.8	
0.252 1		118.2	115	232.8	99.8	

2.9 含量测定

分别取3批不同批号熊胆丸样品,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,分别进样分析,进样量20 μL ,记录峰面积,分别计算样品中栀子苷、黄芩苷的含量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$),结果见表2。

3 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-

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of sample determination($n=3$)

批次	栀子苷		黄芩苷	
	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
20081102	4.130	1.80	4.690	0.86
20080602	3.940	1.63	4.360	1.24
090710	3.860	0.88	4.660	1.76

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,

各成分峰形好,与其他干扰峰分离较好。

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, 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%和 100%的甲醇水溶液作为溶剂进行超声提取,结果以 70%的甲醇溶液为溶剂,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,结果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,本实验选择 70%甲醇为溶剂,超声提取 30 min。

3.4 结论

本实验以栀子苷和黄芩苷含量为定量指标,

能够对熊胆丸进行更全面的质量控制。方法研究表明,采用双波长 HPLC 同时测定栀子苷和黄芩苷的含量,方法简便,结果准确,重复性好。

REFERENCES

- [1] WS₁-B-0460-90. Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China Prescription of Chinese Patent Medicines(卫生部药品标准中药成方制剂) [S]. 1990.
- [2] FU C S, LOU H X, ZHANG X S. Chemical composition and pharmacological effects of Fructus Gardeniae [J]. World Notes Plant Med(国外医药 植物药分册), 2004, 19(4): 152-156.
- [3] NI H Y, ZHANG C H, FU H Z. Research and development of Fructus Gardeniae [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 25(4): 538-541.
- [4] LU M, XIE D, XIAN H Z. RP-HPLC simultaneous determination of geniposide and baicalin in Lanqin oral solution [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2008, 14(9): 7-9.
- [5] LIU R X. HPLC determination simultaneously of gentiopicroside and geniposide in Longdan Xiegan pill by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2007, 29(8): 1170-1172.

收稿日期: 2010-11-08