

# HPLC同时测定炎热清软胶囊中栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的含量

龙厚宁<sup>1</sup>, 印酬<sup>1</sup>, 孟小夏<sup>1,2</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 王鹏娇<sup>1</sup>, 高秀丽<sup>1\*</sup>

(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 2. 贵州金宇药业有限公司, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定炎热清软胶囊中栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的含量。方法:样品采用石油醚回流脱脂,70% 甲醇超声提取 30 min。采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.4% 磷酸溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,检测波长 240 nm。结果:炎热清软胶囊中 3 种有效成分的分离度良好,栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的平均回收率分别为 100.63%,100.77% 和 97.67%,RSD 分别为 1.9%,1.5% 和 1.1%,(n=6)。结论:该方法简便准确、灵敏度高、专属性强,重复性好,可用于炎热清软胶囊的质量控制。

**[关键词]** 炎热清软胶囊; 高效液相色谱法; 栀子苷; 黄芩苷; 汉黄芩苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0034-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060034

## Simultaneous Determination of Geniposide, Baicalin and Wogonoside in Yanqing Soft Capsules by HPLC

LONG Hou-ning<sup>1</sup>, YIN Chou<sup>1</sup>, MENG Xiao-xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, WANG Peng-jiao<sup>1</sup>, GAO Xiu-li<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Jinyu Pharmaceutical Co. Ltd., Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method to determine geniposide, baicalin and wogonoside in Yanqing soft capsules. **Method:** The samples were degreased with petroleum ether and extracted with 70% methanol for 30 min in a ultrasonic mode. Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was eluted with the mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid in a gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 240 nm. **Result:** The average recoveries were 100.63% for geniposide with RSD of 1.9%; 100.77% for baicalin with RSD of 1.5%; and 97.67% for wogonoside with RSD of 1.14%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, highly sensitive, specific and repeatable. It can be used for the quality control of Yanqing soft capsules.

**[Key words]** Yanqing soft capsules; HPLC; geniposide; baicalin; wogonoside

炎热清软胶囊为贵州金宇药业有限公司的独家品种,炎热清软胶囊处方是由柴胡、黄芩、龙胆、栀子、石膏、知母、玄参、薄荷脑等 8 味药材组成,具有解表清里、清热解毒功效。用于呼吸道炎、支气管

炎、肺炎、急性扁桃体炎,也可用于泌尿系感染、胆道感染。现代药理研究表明,黄芩中黄酮类成分黄芩苷和汉黄芩苷具有解热、抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[1-5]</sup>,栀子中的主要成分栀子苷具有抗炎、镇痛、

**[收稿日期]** 20150706(016)

**[基金项目]** 贵州省普通高校微生物与生化药学工程研究中心项目(黔教合 KY 字[2015]338)

**[第一作者]** 龙厚宁,在读硕士,药师,从事药物质量分析研究,中药药效物质基础及质量和体内药物分析研究,Tel:15761600426,E-mail:longhouning1984@163.com

**[通讯作者]** \*高秀丽,硕士,教授,从事药物制剂质量研究与新药研发,Tel:0851-88416167,E-mail:1550434689@qq.com

保肝、利胆等作用<sup>[6]</sup>。现执行标准中只有黄芩苷的含量测定,虽有文献报道<sup>[7-9]</sup>同系列相关产品中龙胆苦苷、栀子苷的含量测定,也都是以1种组分作为检测目标,目前还未见同时测定炎热清制剂中多组分的含量。中药复方制剂成分复杂,化学效应变化多样,单一指标的定量测定并不能从整体上反应出药物的质量,为更好地控制该制剂的质量,本研究对炎热清软胶囊中多种有效成分同时进行含量测定,既可以提高产品内在质量,又可以节约质量控制成本。同时也为同系列产品的质量控制在原质量标准的基础上,新增同时测定炎热清软胶囊中栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的含量,并对该方法进行验证,为炎热清软胶囊的质量控制提供了科学依据。

### 1 材料

1100系列高效液相色谱仪(包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器,美国Agilent公司),AB104-N型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),SG8200H型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司),TGL-16C型高速离心机(上海市安亭电子仪器厂)。

对照品栀子苷、黄芩苷(中国食品药品检定研究院,批号110749-200512,110715-201117),汉黄芩苷(四川省维克奇生物科技有限公司,批号130603,纯度 $\geq 98\%$ )。炎热清软胶囊(贵州金宇药业有限公司,批号20150401,20150405,20150408,规格每粒装0.6g)。乙腈色谱纯,水为娃哈哈饮用纯净水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

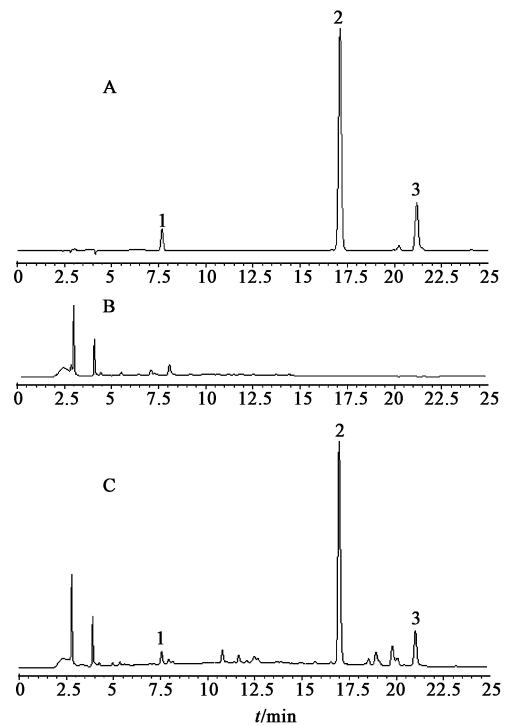
**2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 15%~25% A; 8~13 min, 25%~31% A; 13~22 min, 31%~40% A; 22~30 min, 40% A),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长240 nm,柱温30℃,进样量10 μL,栀子苷、黄芩苷、汉黄芩苷的分离度分别为9.80, 1.75, 2.33。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为23.13, 692.29, 52.14 mg·L<sup>-1</sup>的单独对照品溶液;再分别精密量取栀子苷对照品溶液3 mL,黄芩苷对照品溶液1 mL和汉黄芩苷对照品溶液5 mL置10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制得混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液及阴性对照溶液的制备** 取装量

差异项下的本品内容物,混匀,取约0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入石油醚(30~60℃)30 mL,60℃水浴回流1 h,滤过,弃去石油醚液,药渣和滤纸挥干溶剂,精密加入70%甲醇50 mL,密塞并称定质量,超声处理(功率260 W,频率50 kHz)30 min,放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按炎热清软胶囊处方比例及相同生产工艺制得缺栀子和黄芩的阴性样品。同法制得阴性对照溶液。

**2.4 干扰试验** 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μL,注入液相色谱仪,其他成分对栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的含量测定无干扰。见图1。



A. 混合对照品; B. 阴性对照; C. 供试品; 1. 栀子苷; 2. 黄芩苷; 3. 汉黄芩苷

图1 炎热清软胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Yanreqing soft capsules

**2.5 线性关系考察和最低检测限** 取质量浓度分别为23.13, 692.29, 52.14 mg·L<sup>-1</sup>的栀子苷、黄芩苷、汉黄芩苷的单独对照品溶液,栀子苷对照品溶液分别进样1, 3, 5, 7, 9, 12 μL,黄芩苷对照品溶液分别进样1, 2, 4, 6, 8, 10 μL,汉黄芩苷对照品溶液分别进样10, 15, 20, 25, 30, 35 μL,将6个不同质量浓度的样品溶液,按2.1项下色谱条件测定峰面积,以对照品进样量(X)对峰面积积分值(Y)进行线性回归,得回归方程,结果表明3种待测成分在各自线性

范围内呈良好线性关系。见表 1。分别配制不同质量浓度的栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷对照品甲醇溶液,在上述色谱分析条件下按色谱响应信噪比(S/N) ≥ 3 计算,3 种活性成分的最低检测量分别为 0.23, 0.46, 1.04 ng。

表 1 3 种活性成分的回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of three active ingredients

成分	回归方程	r	线性范围/μg
栀子苷	$Y = 1.245 \times 10^3 X + 18.674$	0.999 7	0.023 1 ~ 0.277 6
黄芩苷	$Y = 1.336 \times 10^3 X - 3.933$	0.999 9	0.692 2 ~ 6.922 0
汉黄芩苷	$Y = 0.539 \times 10^3 X + 8.455$	0.999 9	0.521 4 ~ 2.085 4

**2.6 精密度试验** 精密吸取上述混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,记录色谱图,以峰面积计算,栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 0.6%, 0.4%,结果表明仪器精密度良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一批炎热清软胶囊(20150401)供试品溶液,在室温条件下分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18 h 进样,按 2.1 项下色谱条件测定栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的峰面积,其 RSD 分别为 0.7%, 0.6%, 0.5%。结果表明供试品溶液在室温条件下放置 18 h 内稳定。

**2.8 重复性试验** 取同一批炎热清软胶囊(20150401)按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,按 2.1 项下色谱条件进行测定,并进样分析,结果炎热清软胶囊中栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷 3 种活性成分的平均质量分数分别为 0.654, 16.665, 7.104 mg/粒, RSD 分别为 0.7%, 0.5% 和 0.5%,表明该方法重复性良好。

**2.9 加样回收率试验** 取已知含量的炎热清软胶囊样品(批号 20150401,规格 0.6 g/粒)的内容物 0.3 g,平行制备 6 份,分别精密加入 3 种对照品溶液,栀子苷(0.160 5 g·L<sup>-1</sup>) 2 mL,黄芩苷(0.846 4 g·L<sup>-1</sup>) 5 mL,汉黄芩苷(0.625 6 g·L<sup>-1</sup>) 5 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件测定栀子苷、黄芩苷、汉黄芩苷的含量,计算回收率及 RSD。结果见表 2。

**2.10 样品含量测定** 取已知含量的炎热清软胶囊样品 0.6 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并平行制备 2 份,测定峰面积,并计算含量。结果见表 3。

### 3 讨论

通过栀子苷、黄芩苷和汉黄芩苷的紫外吸收光

表 2 炎热清软胶囊 3 种活性成分加样回收率测定

Table 2 Recoveries rate of three active ingredients in Yanreqing soft capsules

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
栀子苷	0.299 1	0.324	0.321	0.651	101.8	100.63	1.9
	0.298 9	0.324	0.321	0.648	100.9		
	0.299 3	0.324	0.321	0.647	100.6		
	0.298 8	0.324	0.321	0.644	99.8		
	0.298 2	0.323	0.321	0.642	99.5		
黄芩苷	0.299 5	0.324	0.321	0.649	101.2		
	0.299 1	8.345	4.232	12.624	101.1	100.77	1.5
	0.298 9	8.339	4.232	12.592	100.5		
	0.299 3	8.350	4.232	12.637	101.3		
	0.298 8	8.336	4.232	12.560	99.8		
汉黄芩苷	0.298 2	8.320	4.232	12.624	101.7		
	0.299 5	8.356	4.232	12.596	100.2		
	0.299 1	3.554	3.128	6.623	98.1	97.67	1.1
	0.298 9	3.552	3.128	6.611	97.8		
	0.299 3	3.557	3.128	6.619	97.9		
汉黄芩苷	0.298 8	3.551	3.128	6.591	97.2		
	0.298 2	3.543	3.128	6.621	98.4		
	0.299 5	3.559	3.128	6.581	96.6		

表 3 炎热清软胶囊样品中 3 种活性成分的含量测定 mg/丸

Table 3 Contents of geniposide, baicalin and wogonoside in Yanreqing soft capsules mg/pill

批号	栀子苷	黄芩苷	汉黄芩苷
20150401	0.65	16.67	7.10
20150405	0.64	16.70	7.27
20150408	0.66	16.65	7.15

谱可知,栀子苷最大吸收波长为 240 nm,黄芩苷最大吸收波长分别为 216, 278, 316 nm,汉黄芩苷最大吸收波长为 274 nm,样品中黄芩苷的含量明显高于栀子苷,故本实验采用栀子苷的最大吸收波长 240 nm 作为检测波长,在此波长下 3 种活性成分的检测灵敏度均良好。

参照原标准及相关文献<sup>[10-11]</sup>,分别比较了甲醇-水、乙腈-水等不同流动相系统,最终选择乙腈-0.4% 磷酸水溶液作为流动相,并进行梯度洗脱,在该条件下,栀子苷、黄芩苷与汉黄芩苷峰形较好,分离度良好,保留时间适中。

炎热清软胶囊中含有脂溶性辅料,若用溶剂直

接进行提取,部分样品易粘壁,且溶剂提取后部分样品呈颗粒状,经检测发现提取不完全,故先对样品进行脱脂。本试验考察了超声、回流和索氏提取 3 种方法脱脂效果,及超声、回流提取方法,并比较了石油醚(30 ~ 60 ℃)与石油醚(60 ~ 90 ℃)试验效果,及不同浓度的甲醇和乙醇提取效果,最终选择先用石油醚(30 ~ 60 ℃)回流脱脂,使样品分散均匀,对脱脂后的样品再用 70% 甲醇超声提取,该方法操作简便易行。

中药药效物质基础组成复杂,所含成分含量较低,处方中各味药在处理方式上也不尽相同,若仅以单一成分的含量测定作为质控指标是有限的,应综合考虑药物中所含的活性成分,建立多指标含量测定方法,并制定合理的限度,才能更好地控制药品质量,从而保证制剂的安全性和有效性<sup>[12]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] 李倩楠,葛晓群. 黄芩苷及黄芩复方制剂解热机制研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(5): 342-345, 363.
- [2] 孙冬梅,邴枣园,李岩,等. 黄芩苷对耐药性金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J]. 吉林医学, 2011, 32(13): 2587-2588.
- [3] 辛文好,宋俊科,何国荣,等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-653, 659.
- [4] 洪铁,杨振,绳娟,等. 黄芩苷抗肿瘤作用及机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1676-1678.
- [5] Sun Y, Zhao Y, Yao J, et al. Wogonoside protects against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice by inhibiting NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation [J]. Bio Chem Pharmacol, 2015, 94(2): 142-154.
- [6] 陈雁,张现涛,张雷红,等. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 1-5.
- [7] 赵昱玮,于淼,司学玲,等. 炎热清片中龙胆苦苷的薄层鉴别及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 118-120.
- [8] 苏明武,王坤玲,邓超,等. 高效液相色谱法测定炎热清胶囊药材浸膏栀子苷含量[J]. 医药导报, 2008, 27(11): 1386-1387.
- [9] 车勇,卢宁,陈世平. HPLC 法测定炎热清颗粒中栀子苷的含量[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(10): 594-596.
- [10] 陈晓虎,苏晶,王慧,等. UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分[J]. 中草药, 2014, 45(7): 955-959.
- [11] 黄春燕,姜莉莉,王伟,等. RP-HPLC 同时测定黄连解毒汤 7 种活性成分[J]. 浙江预防医学, 2011, 23(11): 15-19.
- [12] 胡娟,吴志生,黄美霞,等. 中药复方制剂质量控制中含量测定指标的选择思路[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(3): 71-72.

[责任编辑 顾雪竹]