

# HPLC 测定利咽解毒颗粒中黄芩苷和大黄素含量

刘阿静, 齐广才\*, 刘珍叶, 白梓静

(延安大学化学与化工学院, 陕西 延安 716000)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定利咽解毒颗粒中黄芩苷和大黄素含量的 HPLC 法并通过响应曲面优化法对二者的提取工艺进行优化。方法: 采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B)为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm 和 245 nm, 柱温 28 °C。结果: 黄芩苷和大黄素分别在 2.016 ~ 134.4, 0.408 0 ~ 27.20 mg·L<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系; 平均回收率(n=6)为 98.9% 和 97.8%。结论: 方法简便、准确、重复性好, 具有较强的实用价值。

**[关键词]** 利咽解毒颗粒; 黄芩苷; 大黄素; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0146-04

## Simultaneous Determination of Baicalin and Emodin in Liyan Jiedu Granules by HPLC

LIU A-jing, QI Guang-cai\*, LIU Zhen-ye, BAI Zi-jing

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of baicalin and emodin in Liyan Jiedu granules, response surface methodology (RSM) was applied to predict optimum conditions for extraction. **Method:** The analysis was carried out on an Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.2% phosphoric acid (B) with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength were set at 280, 245 nm, respectively. The column temperature was 28 °C. **Result:** The linear ranges of baicalin and emodin were 2.016-134.4 and 0.408 0-27.20 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. The average recoveries (n=6) of these were 98.9% and 97.8%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and repeatable, and can be used for the quality control of Liyan Jiedu granules.

**[Key words]** Liyan Jiedu granules; baicalin; emodin; HPLC

利咽解毒颗粒是由薄荷、板蓝根、连翘、山楂、牛蒡子(炒)、桔梗、大青叶、僵蚕、玄参、黄芩、地黄、天花粉、大黄等中药制成的一种临床常用制剂, 有清热解毒、清肺利咽的作用<sup>[1]</sup>。其含量分析方法有高效液相色谱法和近红外光谱法<sup>[2]</sup>。已有报道采用高效液相色谱法测定该制剂中黄芩苷的含量<sup>[3]</sup>、连翘苷的含量<sup>[4]</sup>和大黄素的含量<sup>[5]</sup>, 以及对其中挥发油的包

含工艺和稳定性的考察<sup>[6]</sup>。为了更好地控制该制剂的质量, 本文建立了 HPLC 波长切换技术同时测定利咽解毒颗粒中黄芩苷和大黄素 2 种有效成分的方法, 多指标综合评价其质量, 旨在为该制剂的质量控制提供实验依据。

### 1 材料

**1.1 仪器与试剂** Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪, AMY220 型电子分析天平, THZ-312 型台式恒温振荡器。对照品黄芩苷(批号 0715-9708)和大黄素(批号 110756-200110)均购自中国药品生物制品检定所。乙腈、甲醇为色谱纯(美国 DIKMA 公司), 磷酸为分析纯(天津市恒昊化学试剂厂), 水为双重蒸馏水。利咽解毒颗粒分别由神威

**[收稿日期]** 20120412(020)

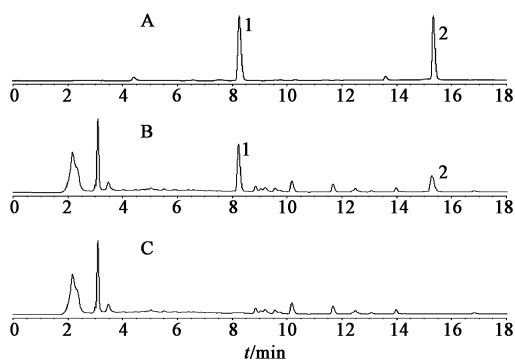
**[第一作者]** 刘阿静, 硕士, 从事色谱分析方向研究, Tel: 18700107157, E-mail: liuajing88@163.com

**[通讯作者]** \* 齐广才, 教授, 硕士生导师, 从事色谱分析方向研究, Tel: 13909112788, E-mail: qigc@163.com

药业有限公司(批号 11062111)和云南白药集团股份有限公司(批号 20100602)生产。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~8 min, 20%~40% A; 8~10 min, 40%~60% A; 10~12 min, 60%~82% A; 12~18 min, 82% A); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 28 ℃, 波长切换 0~15 min 280 nm, 15~18 min 245 nm; 进样量 20 μL。结果见图 1。



A. 混合对照; B. 供试品溶液; C. 阴性对照; 1. 黄芩苷; 2. 大黄素

图 1 利咽解毒颗粒中黄芩苷和大黄素的 HPLC

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品储备液** 准确称取对照品黄芩苷和大黄素适量, 分别置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得浓度分别为 420, 340 mg·L<sup>-1</sup> 的单一成分对照品储备液。精密量取黄芩苷对照品储备液 8.0 mL、大黄素对照品储备液 2.0 mL 置于同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品储备液 I (黄芩苷 134.4 mg·L<sup>-1</sup>, 大黄素 27.2 mg·L<sup>-1</sup>)。

**2.2.2 供试品溶液** 取利咽解毒颗粒, 研细混匀, 取细粉约 0.3 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞三角瓶中, 加入 64% 甲醇 20 mL, 再加 1 mL 盐酸, 摇匀, 置于恒温振荡中提取 55 min, 离心, 过滤, 取续滤液, 转移至 50 mL 量瓶中, 用 64% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

**2.2.3 空白试验** 按处方中的比例, 分别自制不含黄芩和大黄的阴性对照品, 按其工艺制成空白制剂, 并按 2.2.2 项下方法制成阴性对照液。

**2.3 标准曲线制作** 分别精密量取混合对照品储备液 I 0.15, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL, 分置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列浓度的对照品混合溶液。分别精密吸取上述系列对照品

混合溶液各 20 μL 注入色谱仪, 以色谱峰面积  $Y$  对对照品浓度  $X$  (mg·L<sup>-1</sup>) 进行回归, 得黄芩苷和大黄素回归方程分别为  $Y = 37.37X + 0.3433$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 33.50X + 11.84$  ( $r = 0.9999$ )。结果表明黄芩苷质量浓度在 2.016~134.4 mg·L<sup>-1</sup>, 大黄素质量浓度在 0.4080~27.20 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积线性关系良好。

**2.4 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 I 20 μL, 各重复进样 6 次, 按上述色谱条件操作, 以峰面积积分值计算, 黄芩苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.21%, 0.72%。

**2.5 重复性试验** 取同一批号(11062111)样品, 按 2.2.2 项下方法操作, 平行制备供试品溶液 6 份, 按上述色谱条件操作。黄芩苷、大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 2.3%。

**2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析。黄芩苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 2.3%, 2.6%。结果表明, 供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

**2.7 回收率试验** 精密称取 2.5 项下已测知含量的样品 6 份, 每份约 0.15 g, 分别精密加入黄芩苷对照品溶液(浓度为 420 mg·L<sup>-1</sup>) 1.1 mL, 大黄素对照品溶液(浓度为 340 mg·L<sup>-1</sup>) 0.1 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试溶液, 测定含量并计算回收率, 结果见表 1。

表 1 利咽解毒颗粒加样回收率试验 ( $n=6$ )

| 成分  | 取样量<br>/g | 样品<br>含量<br>/μg | 加入量<br>/μg | 实测值<br>/μg | 回收率<br>/% | 平均值<br>/% | RSD<br>/% |
|-----|-----------|-----------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 黄芩苷 | 0.152 4   | 461.2           | 462        | 920.1      | 99.3      | 98.9      | 0.58      |
|     | 0.153 7   | 465.1           | 462        | 921.7      | 98.8      |           |           |
|     | 0.151 0   | 456.9           | 462        | 909.6      | 98.0      |           |           |
|     | 0.150 3   | 454.8           | 462        | 911.3      | 98.8      |           |           |
|     | 0.151 4   | 458.1           | 462        | 915.8      | 99.1      |           |           |
|     | 0.151 9   | 459.6           | 462        | 920.0      | 99.7      |           |           |
| 大黄素 | 0.152 4   | 40.39           | 34         | 73.37      | 97.0      | 97.8      | 0.71      |
|     | 0.153 7   | 40.73           | 34         | 73.74      | 97.1      |           |           |
|     | 0.151 0   | 40.01           | 34         | 73.40      | 98.2      |           |           |
|     | 0.150 3   | 39.83           | 34         | 73.05      | 97.7      |           |           |
|     | 0.151 4   | 40.12           | 34         | 73.47      | 98.1      |           |           |
|     | 0.151 9   | 40.25           | 34         | 73.84      | 98.8      |           |           |

**2.8 样品含量测定** 分别取不同批次的样品, 每批样品取 3 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 记录峰面积, 按外标法计算含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定 (n=3)

| 批号       | 黄芩苷                   |       | 大黄素                   |       |
|----------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
|          | 含量/mg·g <sup>-1</sup> | RSD/% | 含量/mg·g <sup>-1</sup> | RSD/% |
| 11062111 | 3.026                 | 1.2   | 0.265 0               | 1.9   |
| 20120102 | 2.217                 | 2.3   | 0.215 8               | 1.6   |

### 3 讨论

**3.1 提取方法的选择** 参考文献<sup>[7-10]</sup>, 在单因素试验的基础上, 发现甲醇作为提取溶剂要比乙醇提取效果好, 故以甲醇为萃取溶剂, 并选取甲醇体积分数、料液比、温度和提取时间为自变量, 以黄芩苷和大黄素的含量为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合设计, 优化了两者的提取工艺, 结果见表 3。

表 3 实验因素水平

| 因素          | 水平   |      |      |
|-------------|------|------|------|
|             | -1   | 0    | 1    |
| A: 甲醇体积分数/% | 30   | 50   | 70   |
| B: 料液比/倍数   | 1:50 | 1:70 | 1:90 |
| C: 提取时间/min | 30   | 50   | 70   |
| D: 温度/℃     | 40   | 50   | 60   |

根据表 3 中的实验因素与水平的设计进行了 29 次实验, 实验结果见表 4。对表 4 的实验数据进行回归分析, 得二次多元回归方程(模型)为:

$$Y_1 = 3.16 + 0.053A + 0.035B - 0.021C + 6.000E - 003D - 0.049AB + 0.060AC - 0.037AD - 0.038BC + 0.083BD + 3.750E - 003CD - 0.097A^2 - 0.016B^2 - 4.250E - 003C^2 - 0.11D^2$$

$$Y_2 = 0.28 + 0.021A + 0.014B - 0.016C + 5.767E - 003D - 0.023AB + 0.026AC + 0.012AD - 0.022BC - 4.750E - 004BD - 5.550E - 003CD - 0.059A^2 - 0.021B^2 - 0.041C^2 - 0.023D^2$$

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性, 由 F 检验来判定, 概率 P (F > Fa) 的值越小, 则相应变量的显著程度越高。由表 5 可以看出, 黄芩苷含量和大黄素含量 P 均 < 0.01, 为极显著, 说明此模型模拟可靠, 能够很好地解释响应值的变化, 得到的回归方程模拟真实的 4 因素 3 水平的分析是

表 5 回归模型方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 黄芩苷 Y <sub>1</sub> |                          |      |         | 大黄素 Y <sub>2</sub>       |                          |      |         |
|------|-----|--------------------|--------------------------|------|---------|--------------------------|--------------------------|------|---------|
|      |     | 平方和                | 均方                       | F    | P       | 平方和                      | 均方                       | F    | P       |
| 模型   | 14  | 0.24               | 0.017                    | 5.44 | 0.001 6 | 0.047                    | 3.384 × 10 <sup>-3</sup> | 6.82 | 0.000 5 |
| 残差   | 14  | 0.044              | 3.117 × 10 <sup>-3</sup> |      |         | 6.949 × 10 <sup>-3</sup> | 4.963 × 10 <sup>-4</sup> |      |         |
| 失拟   | 10  | 0.044              | 4.364 × 10 <sup>-3</sup> |      |         | 6.949 × 10 <sup>-3</sup> | 6.949 × 10 <sup>-4</sup> |      |         |
| 误差   | 4   | 0.00               | 0.000                    |      |         | 0.00                     | 0.000                    |      |         |
| 总和   | 28  | 0.28               |                          |      |         | 0.054                    |                          |      |         |

可行的。

表 4 响应面分析试验

| No. | A/% | B /times | C /min | D /℃ | 黄芩苷含量 Y <sub>1</sub> | 大黄素含量 Y <sub>2</sub> |
|-----|-----|----------|--------|------|----------------------|----------------------|
|     |     |          |        |      | /mg·g <sup>-1</sup>  | /mg·g <sup>-1</sup>  |
| 1   | 1   | 0        | -1     | 0    | 2.977                | 0.156 1              |
| 2   | 0   | 0        | -1     | -1   | 3.104                | 0.231 2              |
| 3   | 0   | 0        | 0      | 0    | 3.161                | 0.281 5              |
| 4   | 0   | 0        | 0      | 0    | 3.161                | 0.281 5              |
| 5   | 1   | 1        | 0      | 0    | 3.138                | 0.217 2              |
| 6   | -1  | 1        | 0      | 0    | 3.071                | 0.197 2              |
| 7   | 0   | -1       | 1      | 0    | 3.141                | 0.211 5              |
| 8   | -1  | -1       | 0      | 0    | 2.870                | 0.139 6              |
| 9   | 0   | -1       | 0      | -1   | 3.130                | 0.208 4              |
| 10  | -1  | 0        | -1     | 0    | 3.096                | 0.192 8              |
| 11  | 0   | 1        | 1      | 0    | 3.100                | 0.193 8              |
| 12  | 1   | 0        | 1      | 0    | 3.136                | 0.202 6              |
| 13  | 1   | 0        | 0      | -1   | 3.003                | 0.195 4              |
| 14  | -1  | 0        | 0      | -1   | 2.796                | 0.176 4              |
| 15  | -1  | 0        | 0      | 1    | 2.980                | 0.200 4              |
| 16  | 0   | 1        | 0      | -1   | 3.034                | 0.256 3              |
| 17  | 0   | 0        | 1      | -1   | 2.986                | 0.208 3              |
| 18  | 0   | 1        | -1     | 0    | 3.210                | 0.293 6              |
| 19  | 0   | 0        | 0      | 0    | 3.161                | 0.281 5              |
| 20  | 0   | 1        | 0      | 1    | 3.105                | 0.245 3              |
| 21  | -1  | 0        | 1      | 0    | 2.995                | 0.135 5              |
| 22  | 0   | 0        | 1      | 1    | 3.015                | 0.193 4              |
| 23  | 1   | -1       | 0      | 0    | 3.132                | 0.252 5              |
| 24  | 0   | 0        | 0      | 0    | 3.161                | 0.281 5              |
| 25  | 0   | 0        | -1     | 1    | 3.118                | 0.238 5              |
| 26  | 0   | 0        | 0      | 0    | 3.161                | 0.281 5              |
| 27  | 0   | -1       | -1     | 0    | 3.100                | 0.221 4              |
| 28  | 1   | 0        | 0      | 1    | 3.038                | 0.268 3              |
| 29  | 0   | -1       | 0      | 1    | 2.869                | 0.199 3              |

### 3.2 黄芩苷和大黄素的响应曲面分析与模型优化

为了较好的描述 4 种因素两两间的协同效应, 利用响应曲面软件构建了以下因素对黄芩苷和大黄素含量影响的响应曲面图: 甲醇体积分数(A)和料液比(B); 甲醇体积分数(A)和提取时间(C); 甲醇体积分数(A)和提取温度(D); 料液比(B)和提取时间

(C);料液比(B)与提取温度;提取时间(C)与提取温度(D)。黄芩苷含量影响的响应曲面图见图2。对大黄素含量影响的处理过程与黄芩苷相似。

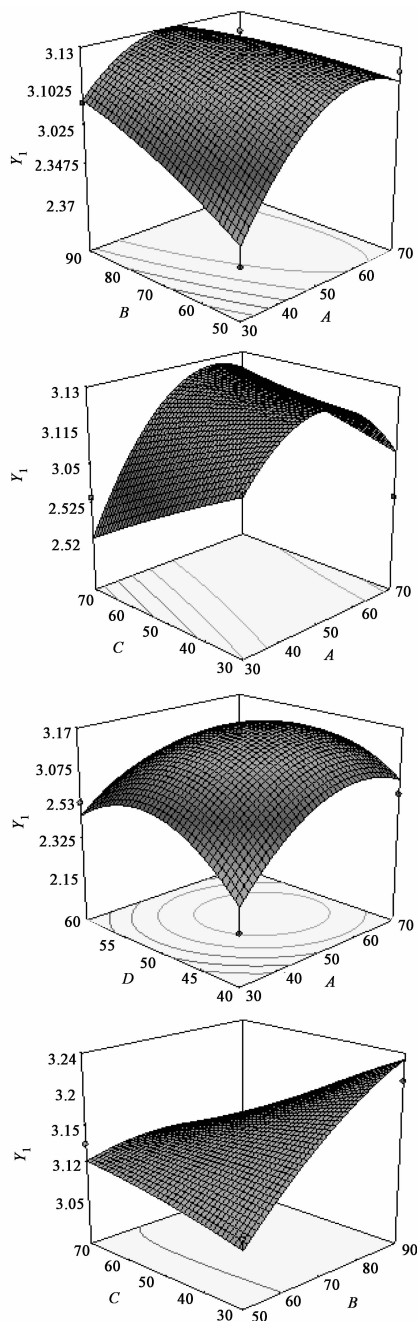


图2 甲醇体积分数、料液比、提取时间和温度对黄芩苷含量影响的响应曲面

根据回归模型,预测的样品中二组分含量提取的最佳工艺条件为甲醇浓度 64.02%,料液比 1:66.96,提取时间 53.67 min,提取温度 50.13 ℃,在最

佳条件下,黄芩苷和大黄素含量可达 3.154,0.266 9 mg·g<sup>-1</sup>。

**3.3 模型的验证试验** 在上述优化条件下共重复 3 次平行验证试验,考虑到实际操作,将最佳工艺修正为甲醇浓度 64%,料液比 1:67,提取时间 55 min,提取温度为 50 ℃。实际测得黄芩苷和大黄素的平均含量为 3.026,0.265 0 mg·g<sup>-1</sup>,两者与预测值相差均 < 5%,表明该工艺稳定可行,重复性好。

**3.4 流动相的选择** 考察了甲醇-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-水和乙腈-磷酸溶液等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱实验。结果表明,用乙腈-0.2% 磷酸溶液进行线性梯度洗脱最佳,各组分色谱峰分离较好,峰形对称。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2005:473.
- [2] 陈钟,李军山,彭新华. 近红外光谱法快速测定利咽解毒颗粒中黄芩苷含量[J]. 亚太传统医药,2011,9(7):25.
- [3] 陈强,周浓,张海珠. HPLC 测定利咽解毒颗粒中黄芩苷的含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(35):20029.
- [4] 王志巍,宋岳,李杰滨. HPLC 测定利咽解毒颗粒中连翘苷的含量[J]. 中国实用医药,2009,12(4):52.
- [5] 张焯,周浓,张海珠. HPLC 法测定利咽解毒颗粒中大黄素的含量[J]. 亚太传统医药,2009,11(5):40.
- [6] 罗晓琴,朱亮,刘文琴. 正交优选利咽解毒颗粒中挥发油的包合工艺及稳定性考察[J]. 中药材,2010,8(33):1335.
- [7] 魏凤玲,单光璇,朱立平,等. 大黄中总大黄素成分含量测定条件优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):14.
- [8] 宋亚芳,毛娜,杨红,等. 高效液相色谱法测定银黄颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):99.
- [9] 王洪志,范俊婷,刘勇,等. HPLC 法测定清胰片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(9):13.
- [10] Lianhong Yin, Binan Lu, Yan Qi, et al. Simultaneous determination of 11 active components in two well-known traditional Chinese medicines by HPLC coupled with diode array detection for quality control[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49:1101.

[责任编辑 顾雪竹]