

## 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<sup>1</sup>, 师永清<sup>2\*</sup>

(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 C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>, 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-jian<sup>1</sup>, SHI Yong-qing<sup>2\*</sup>

(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 C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>. 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<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2-4]</sup>, 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-C<sub>18</sub> 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-C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>,检测波长分别为 240 nm(栀子苷), 278 nm(黄芩苷),柱温 30 ℃。

### 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<sup>-1</sup>,0.18 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液,4 ℃ 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<sup>-1</sup>,黄芩苷 0.09 g·L<sup>-1</sup> 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<sup>[1]</sup>,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。

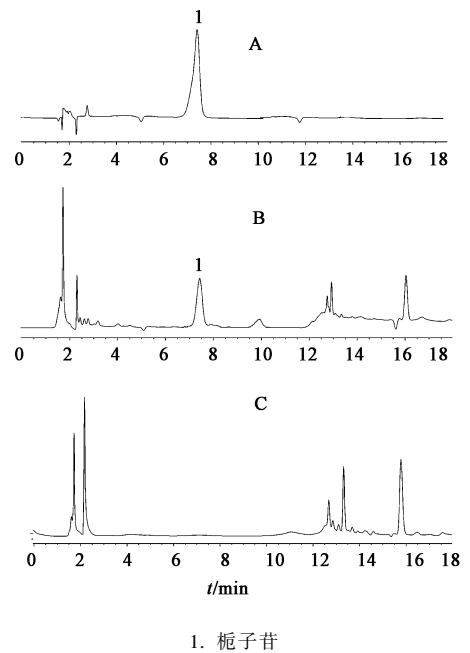


图 1 对照品(A)样品(B)缺栀子阴性样品(C)在 240 nm 处色谱

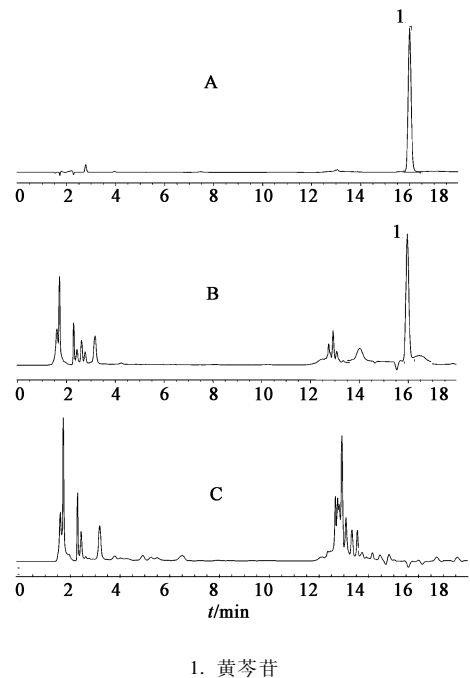


图 2 对照品(A)样品(B)缺黄芩阴性样品(C)在 278 nm 处色谱

**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  $Y = 1484.03X + 40.25$  ( $r = 0.9999$ );

$Y = 2\,494.5X + 14.94$  ( $r = 0.999\,6$ )。表明栀子苷进样量在  $0.08 \sim 1.28 \mu\text{g}$ , 黄芩苷进样量在  $0.09 \sim 1.44 \mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 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  $10 \mu\text{L}$ ,记录色谱图。结果栀子苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.68%,1.59%,表明仪器精密度良好。

**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  $15 \mu\text{L}$ 。计算栀子苷和黄芩苷的平均含量分别为  $0.010\,6, 0.093\,1 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,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  $0.45 \text{ g}$ ,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  $5.0 \text{ mL}$ ,分别置  $10 \text{ mL}$  量瓶中,各精密加入栀子苷对照品储备液( $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $0.2 \text{ mL}$ ,黄芩苷对照品储备液( $0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $1.2 \text{ mL}$ ,加 70% 甲醇水溶液定容,摇匀,静置,取上清液,用  $0.45 \mu\text{m}$  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  $15 \mu\text{L}$ ,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( $10 \text{ 丸} \times 9 \text{ 克}$ )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  $15 \mu\text{L}$ ,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	0.448 9	26.5	32	56.2	92.7	92.7
	0.450 2	26.6	32	58.8	100.6	
	0.451 2	26.7	32	55.8	91.0	
	0.452 4	26.7	32	56.2	92.1	
	0.449 2	26.5	32	56.1	92.4	
黄芩苷	0.448 8	26.5	32	56.2	92.7	
	0.448 9	232.9	216	452.2	101.5	101.5
	0.450 2	233.6	216	450.8	100.6	
	0.451 2	234.1	216	436.8	93.9	
	0.452 4	234.7	216	432.1	91.4	
	0.449 2	233.0	216	434.6	93.3	
	0.448 8	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]