

HPLC 同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷

师永清¹, 师永花^{2*}

(1. 西北民族大学化工学院, 兰州 730030; 定西市人民医院, 甘肃 定西 743000)

[摘要] 目的: 建立同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷含量的方法。方法: 采用双波长 RP-HPLC 法, Hibar C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 (A) 0.2% 磷酸水溶液-(B) 乙腈, 梯度洗脱依次为: 0~9.00 min 15% B, 9.00~10.00 min 15%~25% B, 10.00 min 以后 25% B, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 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 0.16~0.80 μg, 0.46~2.30 μg 线性关系良好, 平均回收率分别为 98.62%, 96.93%, RSD 分别为 1.97%, 2.12%。结论: 该法简便、准确、重现性好, 可用于同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷含量。

[关键词] 高效液相色谱; 牛黄清胃丸; 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)11-0086-04

Simultaneous Determination of Geniposide and Baicalin in Niu Huang Qingwei Pills by RP-HPLC

SHI Yong-qing¹, SHI Yong-hua^{2*}

(1. College of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;
2. Dingxi People's Hospital, Dingxi 743000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining geniposide and baicalin in Niu Huang Qingwei pills. **Method:** A double wavelength RP-HPLC method was developed. The analysis was performed on a Hibar C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with gradient elution using 0.2% phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) in the order of 0-9.00 min 15% B and 9.00-10.00 min 15%-25% B, after 10.00 min, 25% B, 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 at 30 ℃. **Result:** The calibration curves of geniposide and baicalin showed good linearity in the ranges of 0.16-0.80 μg and 0.46-2.30 μg. The average recoveries were 98.62% and 96.93% with RSD of 1.97% and 2.12% respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible for simultaneous determination of geniposide and baicalin in Niu Huang Qingwei pills.

[Key words] RP-HPLC; Niu Huang Qingwei pills; geniposide; baicalin

牛黄清胃丸由牛黄、大黄、栀子、黄芩、黄柏、桔梗、麦冬等 17 味中药组成, 具有清胃泻火、润燥通便之功效, 主要用于心胃火盛, 头晕目眩, 口舌生疮, 牙龈肿痛, 乳蛾咽痛, 便秘尿赤^[1]。栀子、黄芩为处方

中的重要组分, 其有效成分为栀子苷与黄芩苷, 其他制剂中采用 HPLC 单独测定栀子苷或黄芩苷的含量报道较多^[2-3], 双波长 RP-HPLC 测定牛黄清胃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 RP-HPLC 法同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷的含量, 为更好地控制其内在质量提供了科学依据。

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 键合硅胶柱 (4.6 mm × 150

[收稿日期] 20110127(009)

[第一作者] 师永清, 副教授, 研究方向: 中药质量控制, Tel: 13919107137, E-mail: syq631110@163.com

[通讯作者] * 师永花, 主管药师, 研究方向: 中药质量控制, Tel: 13809327898, E-mail: shiyonghua1976@126.com

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)。

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。对照品黄芩苷(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,牛黄清胃丸(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,批号 9013358,9013360,9013365)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Hibar C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相 A 0.2% 磷酸水溶液-B 乙腈, 梯度洗脱程序 0 ~ 9.00 min, 15% B, 9.00 ~ 10.00 min 15% ~ 25% B, 10.00 ~ 18.00 min 25% B, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 240 nm(栀子苷), 278 nm(黄芩苷), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

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、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 g \cdot L⁻¹ 的对照品溶液; 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 g \cdot L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取牛黄清胃丸约 1.0 g, 精密称定, 置研钵中研细, 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% 甲醇水溶液至刻度, 摇匀, 静置, 取上清液, 用孔径为 0.45 μm 的微孔过滤膜滤过, 取续滤液, 即得样品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 栀子苷、黄芩苷分别来源于处方中的药材栀子、黄芩, 按牛黄清胃丸的处方比例和生产工艺分别制备缺栀子、缺黄芩的阴性样品, 按 2.2.2 项下样品溶液的制备方法制备各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别取对照品溶液、样品溶液、缺栀子阴性样品溶液、缺黄芩阴性样品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别进样分析, 记录色谱图, 结果样品溶液分别与对照品溶液色谱图上有一保留时间相同的特征峰, 保留时间分别为 5.2 min(栀子苷)和 15.8 min(黄芩苷), 阴性样品在相同的保留时间处

无此特征峰, 如图 1, 2 所示, 表明阴性样品对测定组分无干扰。

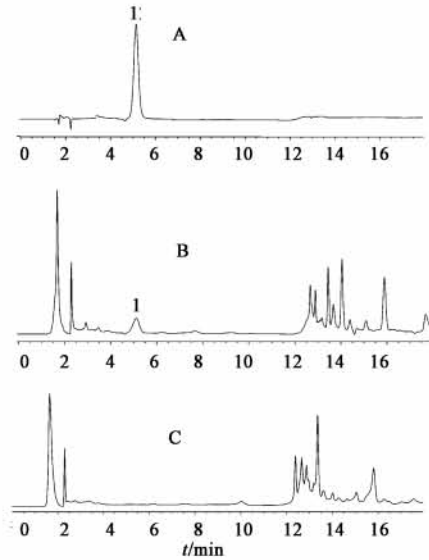


图 1 对照品(A)样品(B)缺栀子阴性样品(C)在 240 nm 处色谱
1. 栀子苷

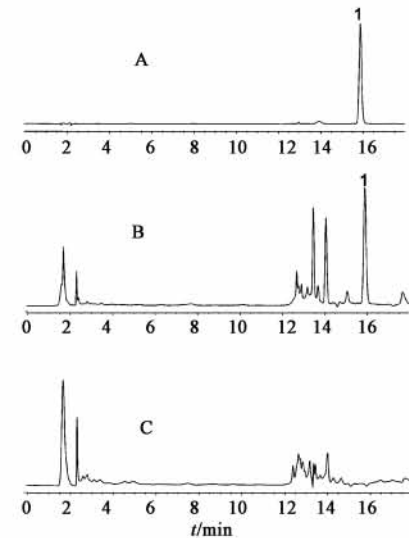


图 2 对照品(A)样品(B)缺黄芩阴性样品(C)在 278nm 处色谱
1. 黄芩苷

2.4 线性关系考察 取混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 自动进样 2, 4, 6, 8, 10 μL , 记录峰面积。分别以对照品进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归, 得栀子苷、黄芩苷回归方程分别为 $Y = 1791.2X - 12.2$ ($r = 0.9997$), $Y = 2919.3X - 14.8$ ($r = 0.9998$)。表明栀子苷、黄芩苷进样质量分别在 0.16 ~ 0.80 μg , 0.46 ~ 2.30 μg 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,连续自动进样 6 次,进样量 5 μL ,记录色谱图,结果 梔子苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.08%,1.37%。表明仪器精密良好。

2.6 稳定性试验 取配制好的同一批号牛黄清胃丸样品溶液,室温下放置,按 2.1 项下色谱条件,分别于配制后 0,2,4,6,8 h 进样,进样量 10 μL ,记录色谱图,梔子苷、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。

2.7 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,进样分析,进样量 10 μL ,记录梔子苷、黄芩苷峰面积,计算含量,结果梔子苷、黄芩苷含量 RSD 分别为 2.85%,3.49%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收试验 分别精密称取同一批号牛黄清胃丸样品(批号 9013358)约 0.4 g,共 6 份,分别精密加入梔子苷($0.16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、黄芩苷($0.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对照品储备溶液 2.0 mL,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 ,记录峰面积,结果见表 1。梔子苷、黄芩苷平均回收率分别为 99.63%,99.99%,RSD 分别为 2.08%,0.94%。

表 1 2 种成分加样回收试验($n=6$)

成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
梔子苷	0.401 1	369.97	320	680.42	98.62	98.62	1.97
	0.400 5	369.42	320	682.05	98.93		
	0.402 1	370.90	320	661.68	95.77		
	0.400 9	369.79	320	698.20	101.22		
	0.402 5	371.27	320	698.00	100.97		
	0.402 8	371.54	320	686.45	99.26		
黄芩苷	0.401 1	1 159.18	920	2 015.45	96.93	6.93	2.12
	0.400 5	1 157.44	920	2 099.33	101.05		
	0.402 1	1 162.70	920	2 040.50	97.97		
	0.400 9	1 158.60	920	2 114.06	101.71		
	0.402 5	1 163.22	920	2 072.68	99.49		
	0.402 8	1 164.09	920	2 129.89	102.20		

2.9 含量测定 取不同批号的牛黄清胃丸样品 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 10 μL ,记录峰面积,分别计算样品中梔子苷、黄芩苷的质量分数($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。每批样品测定 3 份,结果如表 2。

表 2 牛黄清胃丸中梔子苷、黄芩苷含量测定($n=3$)

批号	梔子苷/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%	黄芩苷/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
9013358	0.944	1.80	2.890	0.86
9013360	0.964	1.63	2.682	1.24
9013365	0.981	0.88	2.879	0.76

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。梔子苷、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。

3.4 小结 采用双波长 RP-HPLC 法同时测定牛黄清胃丸中梔子苷和黄芩苷进行含量,方法简便,结果准确,重复性好,为更好地控制其内在质量提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部. 卫生部药品标准: 中药成方制剂[S]. 1989.

[2] 马滕, 韩敏彩, 苏健, 等. 梔子及其制剂中梔子苷含量测定方法研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(7): 49.

[3] 张建新, 张华, 施瑛, 等. 黄芩苷的研究近况[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(3): 247.

[4] 杜英峰, 张兰桐, 靳怡然, 等. 多波长 RP-HPLC 法测定双黄连口服液中的黄芩苷、绿原酸和连翘苷[J]. 中成药 2009, 31(9): 1368.

[5] 中国药典. 一部[S]. 2005: 附录 114.

[责任编辑 蔡仲德]

远志不同炮制品皂苷类成分含量的比较

林敬开, 闫小平*, 官仕杰, 黎丽
(中国中医科学院 西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的: 研究生远志、制远志、蜜远志中皂苷类成分含量的差异。方法: 以远志酸和远志皂苷元含量为指标对 3 种炮制品进行 HPLC 测定。色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸 (41:59); 检测波长 210 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果: 远志酸含量和远志皂苷元含量, 均为制远志 > 生远志 > 蜜远志。结论: 不同炮制方法能改变远志皂苷类成分的含量, 蜜远志的远志酸含量与远志皂苷元含量均低于生远志与制远志。

[关键词] 远志; 炮制品; 远志酸; 远志皂苷元; 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(2011)11-0089-03

The Study on the Content of the Saponins in the Different Processed Products of Radix Polygalae

LIN Jing-kai, YAN Xiao-ping*, GUAN Shi-jie, LI Li
(Xi Yuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the difference of the saponins in the different processed products of Radix Polygalae (crude Radix Polygalae, licorice And Honey Processed Radix Polygalae). **Method:** The content of polygalacic acid and senegenin in the different processed products of Radix Polygalae was determine by HPLC using an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (41:59) as the mobile phase; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; temperatures was 25 °C and UV detection wavelength at 210 nm. **Result:** The order of the content of polygalacic acid and senegenin (from higher to lower) was: crude Radix Polygalae, licorice processed Radix Polygalae, honey processed Radix Polygalae. **Conclusion:** The different process method has some effects on the content of saponins in Radix Polygalae. The content of polygalacic acid and senegenin in honey processed Radix Polygalae was the lowest. The LD₅₀ experiment result suggests that honey processed can reduce the toxic composition of crude Radix Polygalae.

[Key words] Radix Polygalae; prepared products; Polygalacic acid; senegenin; HPLC

甘草制远志是目前临床应用最多的远志炮制品, 为 2010 年版《中国药典》所收载。而蜜远志亦为现今临床常用的炮制品种。毒理研究表明, 蜜制的确能降低远志生品的毒性^[4]。研究表明皂苷类成分

既是远志的药效成分, 也是其引起不良反应的毒性成分。目前 HPLC 法测定远志总皂苷含量主要以其水解产物为指标。远志皂苷类成分酸水解主要生成远志酸与远志皂苷元, 但水解过程不够稳定, 生成的皂苷元种类较多^[5]。而细叶远志皂苷是远志皂苷类成分碱水解的唯一产物, 是控制远志总皂苷含量较为理想的指标性成分^[6]。《中国药典》2010 年版亦将控制远志总皂苷含量的指标性成分由远志酸改为细叶远志皂苷。但目前市场上尚未提供合格的细叶远志皂苷对照品, 故本实验以远志酸和远志皂苷元含量为指标, 对生远志、制远志与蜜远志三者的皂苷

[收稿日期] 2011-01-25

[第一作者] 林敬开, 硕士, 研究方向: 中药制备工艺及质量标准, Tel: 010-62869813, E-mail: ljikai_2010@163.com

[通讯作者] * 闫小平, 主任药师, 研究方向: 中药制备工艺及质量标准, Tel: 010-62869813, E-mail: yanxiaoping1954@126.com