

HPLC 测定芩丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚

吕士杰, 李妍, 芦晓晶, 姜艳霞, 徐俊杰, 王程, 郭淑英*

(吉林医药学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定芩丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚质量分数的方法。方法: 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 黄芩苷以甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2) 为流动相; 检测波长 280 nm。栀子苷以乙腈-水 (15:85) 为流动相; 检测波长 238 nm。丹皮酚以甲醇-水 (45:55) 为流动相; 检测波长 274 nm。流速均为 1.0 mL·min⁻¹。结果: 黄芩苷、栀子苷和丹皮酚分别在 0.006 ~ 0.096, 0.005 ~ 0.080 mg·mL⁻¹ 和 0.005 ~ 0.050 mg·mL⁻¹ 线性关系良好。平均回收率分别为黄芩苷 98.8%, RSD 0.75% (n=9); 栀子苷 99.7%, RSD 0.94% (n=9); 丹皮酚 98.4%, RSD 1.41% (n=9)。结论: 本方法操作简单、快速、准确、重复性好。

[关键词] 高效液相色谱法; 芩丹颗粒; 黄芩苷; 栀子苷; 丹皮酚

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0081-04

Determination of Baicalin, Jasminoidin and Paeonol in Qindan Particles by HPLC

LV Shi-jie, LI Yan, LU Xiao-jing, JIANG Yan-xia, XU Jun-jie, WANG Cheng, GUO Shu-ying*

(Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To build the method for determination of baicalin, jasminoidin and paeonol in Qindan Particles by HPLC. **Method:** An Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used. The mobile phase of baicalin was CH₃OH-H₂O-P (47:53:0.2), the detection wave length was set at 280 nm. And the mobile phase of jasminoidin was acetonitrile-H₂O (15:85), the detection wave length was set at 238 nm. For paeonol, the mobile phase was CH₃OH-H₂O (45:55), the detection wave length was set at 274 nm. All flow rates were 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Under each condition, the calibration curves of baicalin, jasminoidin and paeonol were linear at the ranges of 0.006 ~ 0.096 mg·L⁻¹, 0.005 ~ 0.080 mg·L⁻¹ and 0.005 ~ 0.050 mg·mL⁻¹, respectively. And the each average recoveries of the method were 98.8% for baicalin (RSD 0.75%, n=9); 99.7% for jasminoidin (RSD 0.94%, n=9); 98.4% for paeonol (RSD 1.41%, n=9). **Conclusion:** The developed method is simple, accurate and repeatable for determination of baicalin, jasminoidin and paeonol in Qindan Particles.

[Key words] HPLC; Qindan Particles; baicalin; jasminoidin; paeonol

急性微波辐射损伤可致阳热亢盛、灼伤阴津, 肺胃受损。按照《本草纲目》谓“寒能胜热、折火之本

也”理论拟定芩丹颗粒组方, 该药由黄芩、牡丹皮、栀子等 10 味药材制成的复方制剂, 具有清热凉血、滋阴生津、扶正固本功效, 可用于微波辐射损害造成的体温升高、呼吸困难、心烦胸闷、口干唇裂、倦怠乏力、胃肠黏膜充血等症状^[1]。方中主药黄芩性味苦寒, 归肺胃大肠经, 有清热泻火, 解毒凉血等功效; 栀子滋阴清热、解毒凉血、润肺养胃; 丹皮清热凉血、解毒散瘀。3 种药材主要成分为黄芩苷、栀子苷和丹

[收稿日期] 2009-10-26

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(200705407)

[第一作者] 吕士杰, 教授, 主要从事微波辐射损伤与防护研究; Tel: (0432)4560459

[通讯作者] *郭淑英, Tel: (0432) 64560530, E-mail: guosy2000@163.com

皮酚。作者在参考有关文献的基础上^[2-3],通过建立 HPLC 测定芩丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚,为芩丹颗粒质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

Agilent-1100 型 HPLC 仪, VWD 检测器, Agilent-1100 色谱工作站(均为美国安捷伦公司); H110D 电子天平(德国 Sartorius 公司); JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

黄芩苷、栀子苷和丹皮酚对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号为 110715-200514, 110749-200511, 110708-200505); 甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余均为分析纯;芩丹颗粒为我院自制(规格 10g/袋,批号 080601)。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷的含量测定方法学考察

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 12 mg 加甲醇制成 0.12 mg·mL⁻¹ 的溶液,即得黄芩苷对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品粉末 4.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,摇匀,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得黄芩苷供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 ZORBAXSB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱;黄芩苷以甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)为流动相;柱温为 30 °C;检测波长 280 nm。流速为 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,见图 1。黄芩苷与杂峰分离度大于 1.5;理论塔板数按黄芩苷计算大于 3 000。

2.1.4 线性关系考察 精密量取黄芩苷对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀;精密吸取 10 μL,按上述色谱条件测定黄芩苷的峰面积。以质量浓度 X (mg·mL⁻¹) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 2.23 \times 10^5 X + 1.23 \times 10^3$, $r = 0.999 5$,表明在 0.006 ~ 0.096 mg·mL⁻¹ 内呈良好线性关系。

2.1.5 精密度 精密吸取供试品溶液重复进样 6 次,按上述色谱条件操作,测定黄芩苷峰面积, RSD 为 0.87%。

2.1.6 稳定性 精密吸取同一供试品溶液,按上述色谱条件于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定黄芩苷峰面积,

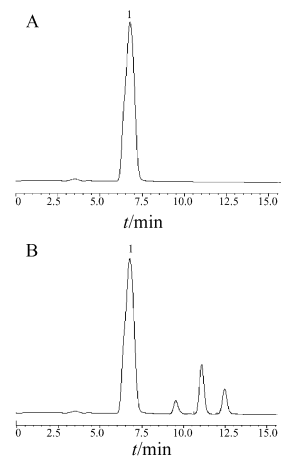


图 1 芩丹颗粒 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 黄芩苷

RSD 为 1.27%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.1.7 重复性 取同一批号样品(批号 080601) 6 份,分别制成供试品溶液,按上述测定法测定, RSD 为 1.64%。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液(批号 080601) 5 mL 置 10 mL 量瓶中,各 9 份,分别精密加入黄芩苷对照品适量并定容至刻度。按上述色谱条件操作,计算回收率,结果见表 1。

表 1 黄芩苷加样回收率试验 (n = 9)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.024	0.019 2	0.042 97	98.8		
0.024	0.019 2	0.042 91	98.5		
0.024	0.019 2	0.043 22	100.1		
0.024	0.024	0.047 66	98.6	98.8	0.75
0.024	0.024	0.047 42	97.6		
0.024	0.024	0.047 62	98.4		
0.024	0.028 8	0.052 42	98.7		
0.024	0.028 8	0.052 74	99.8		
0.024	0.028 8	0.052 42	98.7		

注:称样量均为 4.5 g。

2.2 栀子苷含量测定方法学考察

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品 10 mg 加甲醇制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的溶液,即得栀子苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末 1.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,摇匀,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量

取续滤液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得栀子苷供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 ZORBAXSB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (15:85) 为流动相, 柱温 25 °C, 检测波长 238 nm。流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。见图 2。栀子苷与杂峰分离度大于 1.5; 理论塔板数按栀子苷计算大于 3 000。

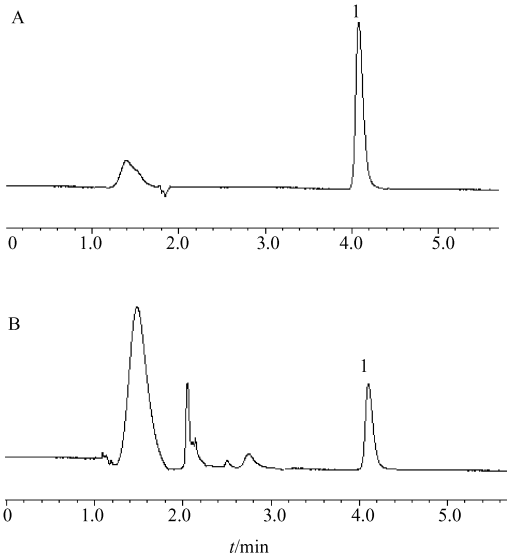


图 2 芩丹颗粒 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 栀子苷

2.2.4 线性关系的考察 精密量取栀子苷对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀; 精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定栀子苷的峰面积。以质量浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程栀子苷 $Y = 1.23 \times 10^4 X + 1.48 \times 10^4$, $r = 0.9999$, 结果表明, 栀子苷在 0.005 ~ 0.080 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.2.5 精密性 精密吸取供试品溶液重复进样 6 次, 按上述色谱条件操作, 测定丹皮酚峰面积, RSD 为 1.15%。

2.2.6 稳定性 精密吸取同一供试品溶液, 按上述色谱条件于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定栀子苷峰面积, RSD 1.67%, 结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.2.7 重复性 取同一批号样品 (批号 080601) 6 份, 分别制成供试品溶液, 按上述测定法测定, RSD 1.24%。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液 (批号 080601) 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 各 9 份, 分

别精密加入栀子苷对照品适量并定容至刻度。按上述色谱条件操作, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 栀子苷加样回收率试验 ($n = 9$)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.011	0.008 8	0.019 62	98.0		
0.011	0.008 8	0.019 93	101.5		
0.011	0.008 8	0.019 76	99.6		
0.011	0.011 0	0.021 93	99.4	99.7	0.91
0.011	0.011 0	0.021 96	99.7		
0.011	0.011 0	0.022 01	100.0		
0.011	0.013 2	0.024 21	100.1		
0.011	0.013 2	0.024 16	99.7		
0.011	0.013 2	0.024 07	99.0		

注: 称样量均为 1.1 g。

2.3 丹皮酚的测定方法学考察

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品 10 mg 加甲醇制成 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得丹皮酚对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取本品粉末 4.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得丹皮酚供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 ZORBAXSB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-水 (45:55) 为流动相, 柱温为 25 °C, 检测波长 274 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。见图 3。丹皮酚与杂峰分离度大于 1.5; 理论塔板数按丹皮酚计算大于 3 000。

2.3.4 线性关系考察 精密量取丹皮酚对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀; 精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定丹皮酚的峰面积。以质量浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $Y = 2.02 \times 10^6 X - 2.51 \times 10^2$, $r = 0.9997$, 表明在 0.005 ~ 0.050 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.3.5 精密性 精密吸取供试品溶液重复进样 6 次, 按上述色谱条件操作, 测定丹皮酚峰面积, RSD 0.93%。

2.3.6 稳定性 精密吸取同一供试品溶液, 按上述色谱条件每次间隔 1 h 连续测定 6 次, 测定峰面积,

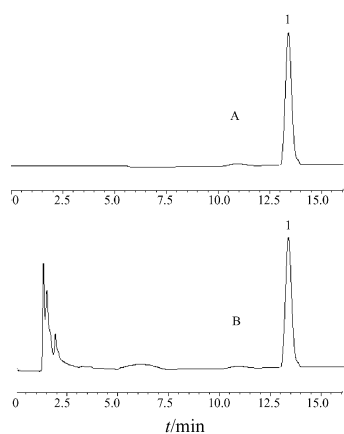


图 3 芩丹颗粒 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 丹皮酚

RSD 为 1.33%, 结果表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

2.3.7 重复性 取同一批号样品(批号 080601)6 份, 分别制成供试品溶液, 按上述测定法测定, RSD 为 1.34%。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液(批号 080601)5 mL 置 10 mL 量瓶中, 各 9 份, 分别精密加入丹皮酚对照品适量并定容至刻度。按上述色谱条件操作, 计算回收率, 结果见表 3。

表 3 丹皮酚加样回收率试验 (n=9)

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.008 8	0.019 53	97.0			
0.008 8	0.019 58	97.5			
0.008 8	0.019 84	100.5			
0.011 0	0.021 68	97.1	98.4	1.41	4.5
0.011 0	0.022 04	100.4			
0.011 0	0.021 72	97.5			
0.013 2	0.024 11	99.3			
0.013 2	0.023 89	97.7			
0.013 2	0.024 07	99.0			

注: 称样量均为 0.011 g。

2.4 样品测定 按上述方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 以外标法计算, 测定 3 批样品, 结果见表 4。

表 4 样品含量测定 (n=3)

No.	黄芩苷	栀子苷	丹皮酚
080601	5.29	1.27	0.24
080602	5.27	1.28	0.26
080603	5.30	1.26	0.23

mg·g⁻¹

3 讨论

3.1 检测波长的选择 黄芩苷、栀子苷和丹皮酚经过紫外扫描可知, 黄芩苷较大吸收峰波长为 210, 280 nm; 栀子苷较大吸收峰波长为 238 nm; 丹皮酚较大吸收峰波长为 211, 274 nm。由于在短波长处甲醇有吸收, 基线不稳, 故选择黄芩苷检测波长为 280 nm, 栀子苷检测波长为 238 nm, 丹皮酚检测波长为 274 nm。

3.2 流动相的选择 测定黄芩苷时对流动相甲醇-水-磷酸的不同比例进行试验, 观察不同磷酸比例对主产物峰检测的影响^[4], 结果表明, 磷酸比例过多或过少, 都表现为柱效较低, 且有后拖尾和前拖尾现象。以甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)为流动相比比例时, 柱效较高, 主成分色谱峰的塔板数、分离度均良好。

3.3 提取方式的选择 回流提取 30 min 黄芩苷的含量与超声提取 30 min 的结果基本一致。对超声提取时间 20, 30, 40 min 进行比较, 结果表明, 超声提取 30 min 即可提取完全。对提取溶剂选择^[5], 根据黄芩苷理化性质及工艺, 选择了 70% 乙醇、50% 甲醇、甲醇为溶剂, 结果发现前两者作溶剂时提取杂质较多, 因此以甲醇为提取溶剂最佳。

[参考文献]

- [1] 吕士杰, 雷钧涛, 任旷, 等. 芩丹扶正胶囊的制备及其微波辐射损伤效应[J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 111.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 281.
- [3] 刘凯, 李三鸣, 何媛, 等. HPLC 法测定茵栀黄软胶囊中黄芩苷、栀子苷和绿原酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 122.
- [4] 盛龙生, 何丽一, 徐连连, 等. 药物分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 236.
- [5] 王宏志, 喻春皓, 高钧, 等. HPLC 分析比较炮制和提取方法对黄芩活性成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1637.

[责任编辑 顾雪竹]