

# 小柴胡颗粒薄层鉴别及黄芩苷含量测定方法的研究

赵志军, 王连水

(河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

**摘要:**目的: 制定小柴胡颗粒的质量标准。方法: 采用 HPLC 测定了制剂中黄芩苷的含量, 固定相为 USA Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱(5 $\mu$ m, 4.6mm  $\times$  150mm), 甲醇-水-冰醋酸(46: 54: 1) 为流动相, 检测波长为 277nm; 同时对处方中的柴胡、黄芩和甘草进行了薄层鉴别。结果: 通过方法学考察, 黄芩苷在 0.05956~ 2.3824 $\mu$ g 范围内, 呈良好的线性关系。黄芩苷的平均回收率为 99.88%, RSD 为 0.76% ( $n=5$ ); 薄层图谱斑点清晰, 阴性对照无干扰。结论: 方法简便、准确、重现性好。可用于控制小柴胡颗粒质量。

**关键词:** 小柴胡颗粒; 黄芩苷; HPLC; 柴胡; 甘草

**中图分类号:** R284.1   **文献标识码:** B   **文章编号:** 1005-9903(2005)03-0022-02

小柴胡颗粒是由黄芩、柴胡、甘草、党参等药味制成的中药口服制剂, 具有解表散热, 疏肝和胃的功效, 临床用于寒热往来, 胸胁苦满, 心烦喜吐, 口苦咽干等病症, 为卫生部药品标准(中药成方制剂 WS<sub>3</sub>-B-1498-93) 收录的品种, 原标准项下只有性状和检查项, 没有含量测定。为有效控制其制剂质量, 采用 HPLC 法测定了黄芩中黄芩苷的含量, 并对黄芩、柴胡和甘草进行了薄层鉴别。

## 1 仪器与材料

高效液相色谱仪: 岛津 LC-10ADVP 泵; SPD-M10AVP 二极管阵列检测器; CLASS-VPLC 色谱工作站。硅胶 G(青岛海洋化工厂生产)。小柴胡颗粒(批号 20021201, 20021206, 20021218) 及处方中各味药材由河北以岭医药研究院有限公司提供。黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所提供, 0715-9909); 甘草酸铵、柴胡对照药材(中国药品生物制品检定所提供)。甲醇为色谱纯, 其它试剂试药均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 柴胡** 取本品 10g, 研细, 加甲醇 50mL, 加热回流 1h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20mL 使溶解并转移至分液漏斗中, 用乙醚振摇提取 3 次(20, 10, 10mL), 弃去乙醚液, 水层用水饱和的正丁醇萃取 3 次(20, 10, 10mL), 弃去水层, 合并正丁醇层, 加等体积氨试液, 摇匀, 放置分层, 分取上层液, 再加等体积正丁醇饱和的水洗涤 1 次, 分取上层液蒸干, 残渣加

甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取柴胡对照药材 2g, 加水 30mL, 加热回流 1.5h, 放冷, 滤过, 滤液转移至分液漏斗中, 同上法制成对照药材溶液。再取按处方工艺制成的不含柴胡的样品, 同法制成阴性对照液。吸取上述三种溶液各 10 $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(30: 8: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以含 4% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显一个相同颜色的斑点, 阴性对照液无干扰。

**2.2 黄芩** 取本品 10g, 加甲醇 50mL, 加热回流 1h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取黄芩苷对照品, 加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取按处方工艺制成的不含黄芩的样品, 同法制成阴性对照液。吸取上述三种溶液各 5 $\mu$ L, 分别点于同一以含 4% 醋酸钠的羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5: 3: 1: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铁乙醇溶液。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照液无干扰。

**2.3 甘草** 取本品 5g, 研细, 加水 30mL, 加热回流 30min, 放冷, 滤过, 滤液转移至分液漏斗中, 用水饱和正丁醇萃取 2 次, 每次 20mL, 合并提取液, 用正丁醇饱和的水洗涤 2 次, 每次 30mL, 弃去水层, 分取正丁醇层, 蒸干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取甘草酸铵对照品, 加甲醇制成每 1mL 含

2mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取按处方工艺制成的不含甘草的样品, 同法制成阴性对照液。吸取上述三种溶液各 5 $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上, 以正丁醇-冰醋酸水(6:1:3) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照液无干扰。

#### 2.4 黄芩苷的含量测定

**2.4.1 色谱条件** 色谱柱为 USA Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱(规格 4.6mm × 150mm, 5 $\mu$ m); 甲醇-水-冰醋酸(46:54:1) 为流动相; 检测波长为 277nm; 流速 1.0mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 室温。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 取小柴胡颗粒适量, 研细, 精密称取约 0.8g, 置 50mL 量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 超声处理 20min 使溶解, 放置至室温, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5mL, 置 10mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 $\mu$ m) 滤过, 即得。

**2.4.3 对照品溶液的制备** 精密称取黄芩苷对照品约 10mg, 置 25mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 1mL 至 25mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1mL 溶液中含黄芩苷 15 $\mu$ g)。

**2.4.4 阴性对照溶液的制备** 取按处方比例及生产工艺制备的不含黄芩原药材的小柴胡颗粒, 按供试品溶液的制备同法操作即得。

**2.4.5 标准曲线的制备** 将浓度为 2.978、5.956、9.4976、14.89、29.78、59.56、119.12 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液分别吸取 20 $\mu$ L 注入 HPLC, 以进样量( $\mu$ g) 为横坐标, 峰面积积分值 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为  $Y = 86686333X - 9891.5$ ,  $r = 0.99995$  ( $n = 7$ )。试验表明, 黄芩苷对照品在 0.05956~2.3824 $\mu$ g 范围内线性关系良好。

**2.4.6 精密度试验** 精密吸取黄芩苷对照品溶液与某一供试品溶液各 20 $\mu$ L 重复进样 5 次, 测定峰面积积分值, 对照品峰面积积分值的 RSD 为 0.16%, 供试品峰面积积分值的 RSD 为 0.74%, 说明仪器性能良好。

**2.4.7 稳定性试验** 取同一对照品溶液与同一供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 24, 30h 进样测定, 黄芩苷对照品峰面积积分值的 RSD 为 0.16%, 供试品黄芩苷峰面积积分值的 RSD 为 0.42%, 说明黄芩苷至少

在 30h 内稳定。

**2.4.8 重复性试验** 取同一批供试品按样品测定项下方法操作, 测定, 计算含量。同一批供试品 5 次测定的黄芩苷平均含量为 1.9440mg/g, RSD 为: 0.73%。说明方法重复性良好。

**2.4.9 回收率试验** 采用加样回收试验, 取已知含量的同一批供试品各 5 份, 精密称定, 分别精密添加一定量的黄芩苷对照品, 按供试品制备所述方法测定含量(同时测定样品含量), 计算回收率。5 次测定的平均回收率为 99.88%, RSD 为 0.76%。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果

| 序号 | 对照品加入量(mg) | 总测得量(mg) | 样品含量(mg) | 对照品测得量(mg) | 回收率(%) |
|----|------------|----------|----------|------------|--------|
| 1  | 0.7743     | 1.5477   | 0.7795   | 0.7682     | 99.21  |
| 2  | 0.7743     | 1.5462   | 0.7794   | 0.7668     | 99.03  |
| 3  | 0.7743     | 1.5619   | 0.7821   | 0.7798     | 100.71 |
| 4  | 0.7743     | 1.5571   | 0.7788   | 0.7783     | 100.52 |
| 5  | 0.7743     | 1.5537   | 0.7799   | 0.7738     | 99.94  |

**4.4.10 样品测定** 取样品 3 批, 依法测定含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(mg/袋)

| 批号       | 黄芩苷含量 | 平均含量  |
|----------|-------|-------|
| 20021201 | 19.44 |       |
| 20021206 | 15.45 | 16.42 |
| 20021218 | 14.38 |       |

### 3 讨论

柴胡薄层色谱供试液的制备, 是通过乙醚反复萃取以除去脂溶性杂质, 再以氨试液洗涤以进一步除去杂质。实验证明, 省略上述任何一步操作都会使薄层色谱干扰严重, 甚至无法观察到清晰的斑点。

黄芩苷在水、乙醇、甲醇中的溶解性均不理想, 而易溶于稀醇溶液中, 以 50% 甲醇做提取溶媒为佳。应用二极管阵列检测器和色谱工作站测得供试品中黄芩苷色谱峰与黄芩苷对照品色谱峰的吸收光谱, 选定最大吸收波长 277nm 为测定波长。

#### 参考文献:

- [1] 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, 2000. 65, 232, 248.
- [2] 苏强, 倪艳, 王瑞明, 等. 祛痰洁颜胶囊的薄层鉴别和黄芩苷的含量测定[J]. 中成药, 2003, 25(1): 30-32.