

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.05

高效液相色谱法测定清肺止咳散中黄芩苷含量

朱育红, 朱 弘

(陕西省兽药监测所, 西安 710016)

[收稿日期] 2019-01-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0027-07 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了测定清肺止咳散中黄芩苷的含量, 采用 C18 柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), 在室温下, 以甲醇-0.3%磷酸溶液(55:45)为流动相, 以 276 nm 为检测波长, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 建立了高效液相色谱测定方法。黄芩苷在 3.8~379 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好, $R^2=0.9998$, 平均回收率为 94.3% ($n=6$), RSD 为 0.92%。该方法简便、准确、可靠, 可用于控制清肺止咳散中黄芩苷的含量。

[关键词] 高效液相色谱法; 清肺止咳散; 黄芩苷

The Content of Baicalin in Qingfei Zhike Powder was Determined by HPLC

ZHU Yu-hong, ZHU Hong

(Shaanxi Provincial Veterinary Drug Monitoring Institute, Xi'an 710016, China)

Abstract: To determine the content of Baicalin in Qingfei Zhike Powder. Using C18 column(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), At room temperature, methanol-0.3% phosphoric acid solution (55:45) was used as the mobile phase, The detection wavelength was 276 nm, The flow rate of 1.0 mL/min, The temperature of column is 30 $^{\circ}\text{C}$. The results showed, Baicalin had a good linear relationship in 3.8~379.0 in the range of $\mu\text{g}/\text{mL}$, $R^2=0.9998$, The average recovery rate was 94.3% and RSD was 0.92%. This method is convenient accurate and fast, and can be used to control the content of scutellaria baicalensis in Qingfei Zhike Powder.

Key words: HPLC; Qingfei Zhike Powder; Baicalin

清肺止咳散收载于《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部, 是由桑白皮、知母、苦杏仁、前胡、金银花、连翘、桔梗、甘草、橘红、黄芩十味药材经粉碎、混合而制成的中药散剂, 具有清泻肺热, 化痰止痛的功能, 主治肺热咳嗽, 咽喉肿痛。现广泛应用于畜禽咳喘病的治疗, 但质量标准无含量测定方法。为了更好地控制其质量, 参考文献方法, 研究建立了采用反相高效液相法测定清肺止咳散中黄

芩苷的含量测定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 PerkinElmer 液相色谱仪, Waters 液相色谱仪, UV 检测器, Waters C18 柱、安捷伦 C18 柱、PerkinElmer C18 柱; Sartorius Cp225D 分析天平。

1.2 试药与试剂 黄芩苷对照品分别来源于中国食品药品检定研究院(批号为 110715-201720, 标示含量为 93.5%) 和中国兽医药品监察所(批号为

Z0271109, Z0271705 标示含量分别为 98.8%、96.8%)。

清肺止咳散样品,共 10 批,其中实验室自制小样 1 批(样品编号 1);哈尔滨摩天农科兽药有限公司 3 批,批号分别 20180514、20180515、20180516(样品编号 2-4);河北远征禾木药业有限公司 3 批,批号分别 3GN180201、3GN180202、3GN180203(样品编号 5-7);河南环通制药有限公司 3 批,批号分别 20160308、20180311、20180524(样品编号 8-10)。

清肺止咳散缺黄芩的阴性样品,按处方及制法制成缺黄芩的阴性样。制备小样、缺黄芩的阴性样的药材均购自西安怡康大药房。

甲醇 Fisher Chemical(国药集团化学试剂有限公司提供,色谱纯,批号:178337 等);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 参照《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部“清解合剂”中黄芩含量测定方法。流动相:甲醇-0.3%磷酸溶液(55:45);流速:1.0 mL/min;检测波长 276 nm;柱温:30 ℃;进样量:5~10 μL^[1]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品适量,

精密称定,加甲醇少许超声使溶解,加 50% 甲醇稀释,摇匀,制得黄芩苷对照品溶液(每 1 mL 含黄芩苷 0.1 mg)^[2]。

2.2.2 供试品溶液的制备 取实验室自制清肺止咳散小样 1.0 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,放至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[2]。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取缺黄芩阴性样 1.0 g,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液^[2]。

2.2.4 小样测试结果 按照 2.1 色谱条件,采用外标法,以峰面积计算,实验室自制小样每 1g 含黄芩苷 13.07 mg,13.13 mg,平均值为 13.1 mg。

2.3 系统适用性和专属性试验 精密量取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10、5 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项色谱条件测定,结果理论塔板数以黄芩苷峰计算为 6374(图 1-1)、7865(图 1-2);供试品色谱图中黄芩苷峰与临峰分离良好,与前峰分离度为 7.0(图 2-1),与后峰分离度为 2.0(图 2-2);阴性对照色谱在与对照品色谱相同保留时间处无干扰峰(图 3-1,3-2)。结果表明,系统适用性可以满足检测要求;处方中其他成分对黄芩定量检测无干扰,专属性也能满足检测要求^[1]。

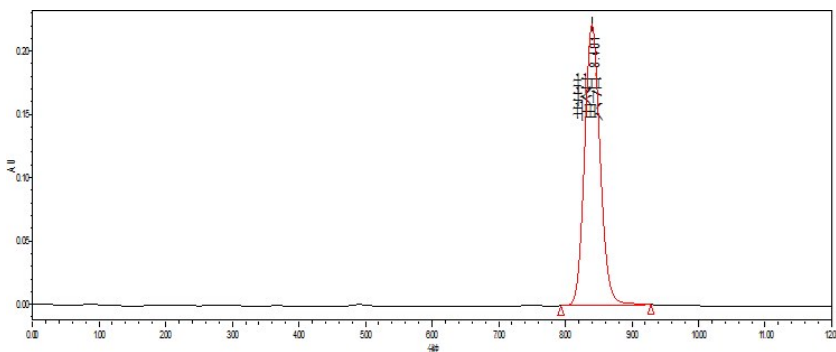


图 1-1 黄芩苷对照品色谱图(进样量 10 μL, Waters C18 柱,理论塔板数 6374)

Fig 1-1 Chromatogram of the Baicalin reference substance

(Injection volume, 10 μL, Column: Waters C18, Theoretical plate number: 6374)

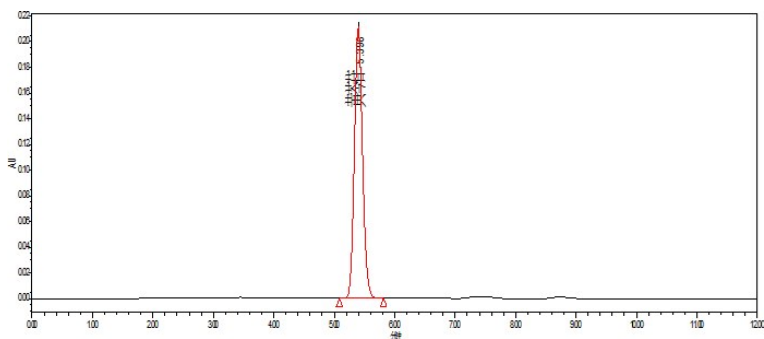


图 1-2 黄芩苷对照品色谱图(进样量 5 μ L, PE C18 柱, 理论塔板数 7865)

Fig 1-2 Chromatogram of the Baicalin reference substance

(Injection volume, 5 μ L, Column: PE C18, Theoretical plate number: 7856)

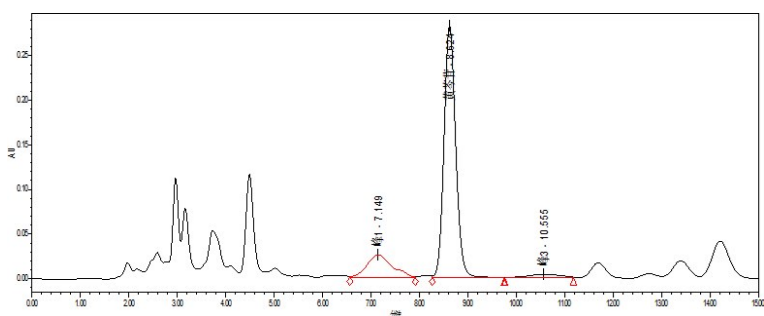


图 2-1 供试品色谱图(进样量 10 μ L, Waters C18 柱)

Fig 2-1 chromatogram of the test sample(Injection volume, 10 μ L, Column: Waters C18)

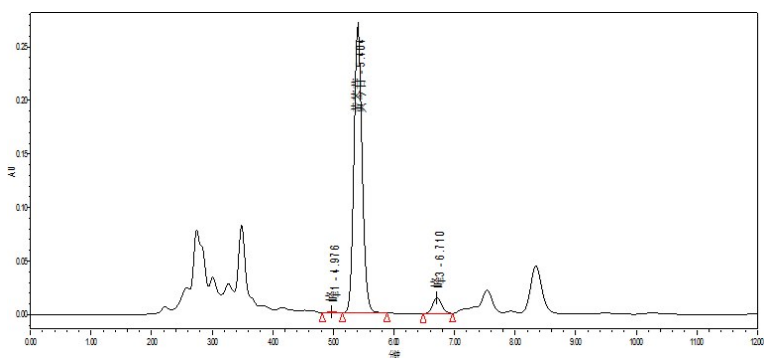


图 2-2 供试品色谱图(进样量 5 μ L, PE C18 柱)

Fig 2-2 chromatogram of the test sample(Injection volume, 5 μ L, Column: PE C18)

2.4 线性关系考察 取黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇少许超声使溶解,加 50% 甲醇稀释,制成每 1 mL 含黄芩苷 0.379 mg 的对照品贮备液。取贮备液,分别精密吸取 1、2、5 mL,置 100 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,制成①、②、③号溶液,浓度

分别为 3.8、7.6、19.0 μ g/mL,再分别精密吸取黄芩苷对照品贮备液 5、10、20 mL,置 50 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,制成④、⑤、⑥号溶液,浓度分别为 38、76、152 μ g/mL,以黄芩苷对照品贮备液作为⑦号溶液,浓度 0.379 mg/mL,按上述色谱条件,分

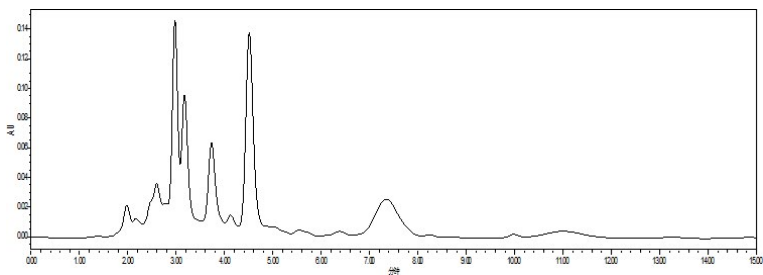


图 3-1 缺黄芩苷的阴性样品色谱图 (进样量 10 μL, Waters C18 柱)

Fig 3-1 Negative chromatogram of baicalin (Injection volume, 10 μL, Column: Waters C18)

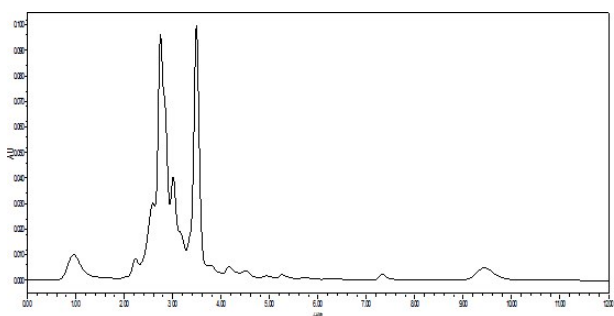


图 3-2 缺黄芩苷的阴性样品色谱图 进样量 5 μL, PE C18 柱

Fig 3-2 Negative chromatogram of baicalin (Injection volume, 5 μL, Column: PE C18)

别进样 5 μL, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 以进样浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程 $y = 16412x - 25735$, $R^2 = 0.9998$ ($n = 7$), 黄

芩苷在 3.8 ~ 379 μg/mL 范围内线性关系良好 (见图 4、图 5)。

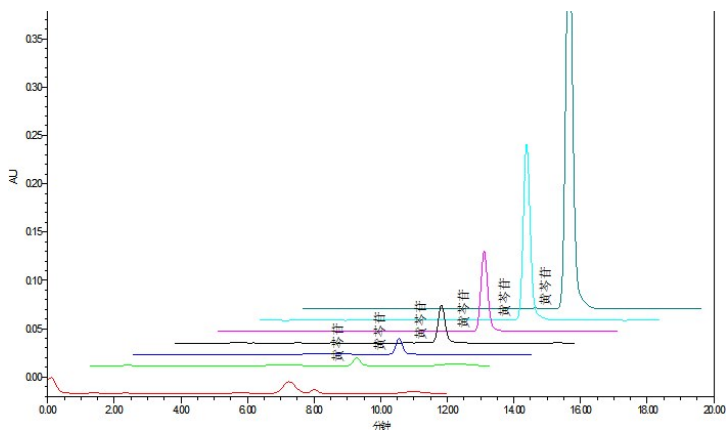


图 4 黄芩苷线性试验色谱峰综合图

Fig 4 Baicalin linear test chromatogram

2.5 准确度 采用加样回收的方法^[1]

2.5.1 黄芩苷对照品母液制备 取黄芩苷对照品

(Z0271705, 标示含量 96.8%) 57.5 mg, 置 200 mL 量瓶中, 加 20 mL 甲醇超声处理 30 分钟使溶解, 放至

室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,制成母液 A。

2.5.2 对照品溶液制备 取母液 A 3.00 mL,加 50% 甲醇稀释至 10.00 mL 即得。

2.5.3 样品制备 取样品 2、样品 7 各 3 份,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,精密加入黄芩苷母液 A 25 mL,按 2.2 项下供试品溶液制备方法制备样品溶液,上机测定,黄芩苷的回收率在 92.9%~95.3% 之间,平均回收率为 94.3%,RSD 为 0.92%,结果见表 1。

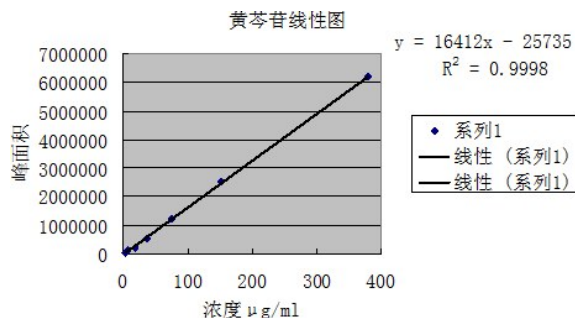


图 5 黄芩苷线性图

Fig 5 Baicalin linear graph

表 1 加样回收率试验

Tab 1 Recovries of Baicalin in preparation

序号	样品重量/g	黄芩苷含量/mg	黄芩苷添加量/mg	测得黄芩苷总含量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.51341	8.01	6.96	14.6	94.7%	94.3%	0.92%
2	0.44775	6.98	6.96	13.5	93.6%		
3	0.51093	7.97	6.96	14.6	95.3%		
4	0.41612	5.53	6.96	12.0	92.9%		
5	0.50457	6.71	6.96	13.3	94.7%		
6	0.49735	6.61	6.96	13.2	94.6%		

2.6 精密度 重复性 取 8 号样品 (批号为 20160308),按 2.2 项下供试品溶液制备方法,制成供试品溶液,重复进样 6 次,每次 10 μL,按上述色谱条件进行测定,测定黄芩苷峰面积相对标准偏差 RSD 为 0.21%,结果见表 2^[1]。

表 2 精密度试验

Tab 2 Precision test

序号	峰面积	平均峰面积	RSD%
1	3595718	3600147.8	0.21
2	3615117		
3	3596579		
4	3599793		
5	3598149		
6	3595531		

2.7 稳定性试验 取 4 号样品 (批号为 20180516),按 2.2 项下供试品溶液制备方法,制成供试品溶液,立即测定,再在 2、4、8、12、24 h 的时间点进行测定,结果表明,测定值在 24 h 内基本稳定,RSD 为 1.96%,结果见表 3^[1]。

表 3 稳定性试验

Tab 3 Stability test

时间	峰面积	平均峰面积	RSD%
0	2424272	2388800.3	1.96
2	2441913		
4	2415760		
8	2329479		
12	2337154		
24	2384224		

2.8 耐用性^[1]

2.8.1 色谱柱、进样量的耐用性 取清肺止咳散(9号样品,批号为20180311),按2.2项下供试品溶液制备方法制得样品溶液,按2.1项下色谱条件,分别在PE液相色谱仪上用waters柱、安捷伦柱、PE柱,在waters液相色谱仪上用waters柱,进样测试含量,进样量分别为5、10 μL,结果RSD分别为1.72%、1.12%。结果见表4。

2.8.2 流速的耐用性 取清肺止咳散(10号样品,批号为20180524),按2.2项下供试品溶液制备方法制得样品溶液,按2.1项下色谱条件,保持流动相比比例不变,于0.8 mL/min和1.2 mL/min流速条件下进样5 μL进行测试。二者测试结果相对偏差为0.71%,结果见表4。

2.8.3 流动相的耐用性 取清肺止咳散(10号样品,批号为20180524),按2.2项下供试品溶液制备方法制得样品溶液,将2.1项下色谱条件中流动相比比例调为50:50,其余保持不变,进样5 μL,进行测试,结果与原流动相比比例测得结果相对偏差为0.0%。

耐用性试验结果表明该方法能够耐受不同液相色谱仪,色谱柱,在进样量、流速、流动相比比例等因素小范围变化情况下,测定清肺止咳散中黄芩苷的含量无明显差异,说明耐用性良好。

2.9 样品含量测定 取三家企业产品,每家三批共9批样品,分别按2.2项下方法制备对照品溶液及供试品溶液,精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5 μL,上机测定峰面积,通过外标法计算黄芩苷的含量,结果见表5。

表4 耐用性试验

Tab 4 Serviceability test

仪器	PE液相色谱仪			waters液相色谱仪	平均值	RSD%
	waters柱	安捷伦柱	PE柱	waters柱		
含量(mg/g,进样5μL)	13.07	13.27	13.4	12.8	13.14	1.72%
含量(mg/g,进样10μL)	13.35	13.31	13.56	13.14	13.34	1.12%
0.8ml/min 流速含量 (mg/g,进样5μL)	13.32				13.42	0.71%
1.2 mL/min 流速含量 (mg/g,进样5μL)	13.51					
流动相(50:50)含量 (mg/g,进样5μL)	13.42				原流动相比比例 测得值 13.4	0.07%

表5 样品含量测定结果

Tab 5 Content determination results (n=2)

哈尔滨摩天农科兽药有限公司			河北远征禾木药业有限公司			河南环通制药有限公司		
样品编号	批号	含量 /(mg·g ⁻¹)	样品编号	批号	含量 /(mg·g ⁻¹)	样品编号	批号	含量 /(mg·g ⁻¹)
2	20180514	15.8	5	3GN180201	7.4	8	20160308	10.7
3	20180515	15.6	6	3GN180202	7.4	9	20180311	13.3
4	20180516	14.8	7	3GN180203	8.2	10	20180524	13.4

3 讨论与结论

3.1 含量测定成分的选择 清肺止咳散现收载于《中华人民共和国兽药典》2015年版二部,是由桑白皮、知母、黄芩等十味药材经粉碎、混合而制成的

中药散剂,处方量320g,其中黄芩45g,占14.06%,为君药。黄芩的主要成分为黄芩苷,具有显著的生物活性,具有抑菌、利尿、抗炎、降胆固醇、抗血栓形成、缓解哮喘、泻火解毒、止血、安胎、抗变态反应及

解痉作用,也为哺乳动物肝脏涎酶的特异性抑制剂,具有调节某些疾病的作用,也具有较强的抗癌反应生理效能。黄芩苷分子式为 $C_{21}H_{18}O_{11}$ 分子量(446)适中,化学性质稳定,适于作为含量测定目标成分^[3]。原质量标准无含量测定方法,为了更好地控制其质量,拟定采用 HPLC 测定黄芩苷的含量,并对测定方法进行了系统的考察,该方法操作简便,黄芩苷在 3.8~379 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好,方法准确度、精密度、日内稳定性和耐用性均能达到检测要求。

3.2 样品前处理方法的选择 黄芩苷是一种黄酮类化合物,易溶于甲醇等有机溶剂。参考《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部银黄提取物口服液含量测定项下前处理方法,本试验采用先用少量甲醇超声提取,再用 50% 甲醇稀释,结果证明该方法能够较为完全地提取出清肺止咳散中的黄芩苷,并且阴性无干扰。

3.3 含量测定限度的确定 拟定为每 1 g 清肺止咳散中含黄芩以黄芩苷计不得低于 10.0 mg。黄芩药材记载于《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部,其含量限度规定为不得少于 9.0%。实验室自制小样所用黄芩药材中黄芩苷含量为 9.7%,折合到清肺止咳散中,理论上应为 13.6 mg/g,实测值为 13.1 mg/g,黄芩苷的转移率为 96%。考虑到大生产实际,按转移率 80%、黄芩药材中黄芩苷含量不低于 9.0% 计算,每 1 g 肺止咳散中含黄芩苷应不得少于 10.1 mg,取整数为 10.0 mg。拟以此作为含量测定的限度。生产企业提供的 9 批样品中,6 批含量超出此限度,3 批未达到此限度。因黄芩苷实际无毒,上限未作规定^{[1][2]}。

3.4 结论 用高效液相法测定清肺止咳散中黄芩苷的含量,方法简便,准确,灵敏度高,回收率好,可有效控制该制剂中主药黄芩的含量,含量限度暂定为每 1 g 清肺止咳散中含黄芩以黄芩苷计不得低于 10.0 mg^[5]。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版二部[S].

China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia volume II 2015 edition[S].

- [2] 朱育红,潘康锁,等. 高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国兽药杂志,2018,52(12):49-53.
Zhu Y H, Pan K S, *et al.* The content of baicalin in putilan Anti-inflammatory Granule was determined by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Darg, 2018,52(12):49-53.
- [3] 李运景,陈钧茂,张锦兴,等. HPLC 测定清肺合剂中黄芩苷的含量[J]. 药品评价.2007(04):313-314.
Li Y J, Chen J M, Zhang J X, *et al.* Baicalin content determination in Qingfei mixture by HPLC [J]. Drug Evaluation. 2007(04):313-314.
- [4] 于波涛,张志荣,刘文胜,等. 黄芩苷稳定性研究[J]. 中草药,2002,33(3):218-220.
Yu B T, Zhang Z R, Liu W S *et al.* Study on the stability of baicalin [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs 2002,33(3):218-220.
- [5] 张景艳,张宏,王磊,等. 高效液相色谱法测定去滞散中柚皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中国兽药杂志,2017,51(12):36-41.
Zhang J Y, Zhang H, Wang L, *et al.* RP-HPLC Determination of Naringin and Neohesperidin in Quzhi San [J]. Chinese Journal of Veterinary Darg, 2017,51(12):36-41.
- [6] 李慧. 高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中黄芩苷的含量[J], 中南药学,2008(6),10(5):635-636.
Li H. Determination of Baicaiin in Pudilan xiaoyan Tabletes by HPLC[J], Zhongnan Pharmaceutical, 2008(6),10(5):635-636.
- [7] 孙艳涛,鞠建锋. 高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中黄芩苷的含量[J], 时珍国医国药 2006, 17(12)2502-2503.
Sun Y T, Ju J F. Determination of Baicalin in Pudilan Xiaoyan Tablet by HPLC [J], Lishizhen Medicine and Materia Medica Research. 2006,17(12)2502-2503.
- [8] 龙月红,邢朝斌,劳风云,等. 高效液相色谱法测定不同生境黄芩中的黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6)97-100.
Long Y H, Xing Z B, Lao F Y, *et al.* Determination of baicalin in Scutellaria baicalensis in different habitats by HPLC [J]. Chinese Journal of Experimental prescription. 2012,18(6)97-100.
- [9] 郭温迎,庄建芳. HPLC 法测定银黄颗粒中黄芩苷的含量. 中国中医药科技,2010,17(5)427.
Guo W Y, Zhuang J F. Determination of Baicalin in Yinhuang granules by HPLC. Chinese traditional medicine science and technology,2010,17(5)427.
- [10] 李文仕. 反相 HPLC 法测定感冒止咳颗粒中黄芩苷的含量[J]. 今日药学,2014,24(6):415-417.
Li W S. Determination of Baicalin in Ganmao-zhike granules by RP-HPLC [J]. pharmacy Today, 2014,24(6):415-417.