

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.020

高效液相色谱法测定痔复康颗粒中黄芩苷含量*

陈 锋¹, 孟庆海², 赖新华¹, 徐晓梅¹, 林晓春¹, 李庆德¹, 郑锦坤^{1△}

(1. 广东省粤北人民医院, 广东 韶关 512026; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 建立测定痔复康颗粒中黄芩苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 InertSustain AQ-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 ℃, 检测波长为 254 nm, 进样量为 10 μL。结果 黄芩苷质量浓度在 5~320 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$); 平均加样回收率为 100.14%, RSD 为 0.98% ($n=6$); 黄芩苷的平均含量为 0.834 5 mg/g。结论 该方法高效、准确、可靠, 可用于痔复康颗粒黄芩苷含量的测定。

关键词:痔复康颗粒; 高效液相色谱法; 含量测定; 黄芩苷

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)21-0070-03

Content Determination of Baicalin in Zhifukang Granules by HPLC

CHEN Feng¹, MENG Qinghai², LAI Xinhua¹, XU Xiaomei¹, LIN Xiaochun¹, LI Qingde¹, ZHENG Jinkun¹

(1. Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong, China 512026; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210023)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of baicalin in Zhifukang Granules. Methods The InertSustain AQ-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile(A) and 0.1% methanoic acid solution(B) were eluted by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 ℃, the detection wavelength was 254 nm, and the injection volume was 10 μL. Results The content of baicalin was linear in the range of 5-320 μg/mL($r=0.999\ 9$). The average recovery was 100.14%, and the RSD was 0.98% ($n=6$). The average content of baicalin in 4 batches of samples was 0.834 5 mg/g. Conclusion The established method is efficient, accurate and reliable, which can be used for the content determination of baicalin in Zhifukang Granules.

Key words: Zhifukang Granules; HPLC; content determination; baicalin

痔复康颗粒为粤北人民医院的特色医院制剂(粤药制字 Z20071535), 有 20 多年的临床实践基础, 由黄芩、槐米、黄芪、当归、大黄、柴胡、升麻、甘草等药材组方, 具有清热利湿、润肠通便、消肿止痛、益气生肌之功效, 临床用于治疗痔核脱垂、肛门肿痛, 以及便秘、便血等症。方中黄芩为君药, 味苦, 性寒, 归肺、胆、脾、大肠、小肠经, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎^[1]的功效。黄芩苷为黄芩主要活性成分之一^[2], 具有多种药理作用, 如消炎、解热、抗病毒、抗肿瘤、抗菌等作用^[3-14]。2015 年版《中国药典(一部)》将黄芩苷作为黄芩的质量控制指标^[1]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法测定痔复康颗粒中黄芩苷含量, 以完善其质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器及 Chem StationA. 10.02 色谱工作站, 美国安捷伦公司; CPA225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司, 精度为 0.1 mg); MICRO-17R 型冷冻离心机(美国 Thermo 公司); Milli-Q Advantage A10 型

超纯水机(美国 Millipore 公司); WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 试药

痔复康颗粒(粤北人民医院制剂室, 批号分别为 170609, 171109, 180702, 180925); 黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 110715-201821); 水为超纯水, 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: InertSustain AQ-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 ℃; 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~7 min 时 5% A, 7~17 min 时 15% A, 17~22 min 时 27% A, 22~30 min 时 32% A, 30~36 min 时 70% A。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加入 50% 甲醇溶解并定容, 配制黄芩苷质量浓度为 320 μg/mL 的对照品溶液。依次进行倍比稀释, 配成 7 个不同质量浓度

*基金项目: 广东省韶关市卫生计生科研计划项目[Y18081]。

第一作者: 陈锋, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)chenfeng871224@163.com。

△通信作者: 郑锦坤, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)1061384858@qq.com。

(320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$) 的系列对照品溶液。

供试品溶液: 取样品颗粒, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率为 140 W, 频率为 42 kHz) 1 h, 放冷, 再称定质量, 用上述 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

阴性对照品溶液: 按样品处方比例, 称取缺黄芩的其余药材, 并按生产工艺制备缺黄芩的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备缺黄芩的阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别精密吸取上述溶液各 10 μL , 按拟定色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱图中, 在与对照品溶液色谱相应位置上有相同保留时间的色谱峰, 而阴性对照无干扰, 表明专属性良好。色谱图见图 1。

线性关系考察: 精密吸取 2.2 项下系列对照品溶液 10 μL , 按拟定色谱条件进样测定, 以质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标。绘制标准曲线, 得黄芩苷的回归方程 $Y = 12.785X + 22.096$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 黄芩苷质量浓度在 5 ~ 320 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取黄芩苷对照品溶液, 按拟定色谱条件进样测定, 重复进样 6 次, 记录峰面积。结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.79% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 170609)样品, 依法制备供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 时按拟定色谱条件进样测定。结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.26% ($n = 5$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 170609)样品, 依法平行制备供试品溶液 6 份, 按拟定色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算含量。结果黄芩苷含量的 RSD 为 1.10% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量(0.894 mg/g)的同一批(批号为 170609)样品 0.5 g, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 精密加入对照品溶液适量, 按拟定色谱条件进样测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芩苷加样回收试验结果($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.5	447	450	891.6	98.80	100.14	0.98
0.5	447	450	892.9	99.09		
0.5	447	450	901.2	100.93		
0.5	447	450	899.3	100.51		
0.5	447	450	898.4	100.31		
0.5	447	450	902.3	101.18		

2.4 样品含量测定

样品(批号分别为 170609, 171109, 180702, 180925), 依法制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 按拟定色谱条件进样测定, 计算样品中黄芩苷的含量。结果 4 批样品中黄芩苷含量分别为 0.894, 0.725, 0.888, 0.831 mg/g, 平均含量为 0.834 5 mg/g。

3 讨论

3.1 检测波长选择

取黄芩苷对照品溶液, 在 200 ~ 500 nm 波长范围内扫描, 最大吸收波长为 254 nm, 且在 254 nm 波长处得到的峰形、峰高最适宜, 故选择 254 nm 作为检测波长。

3.2 流动相选择

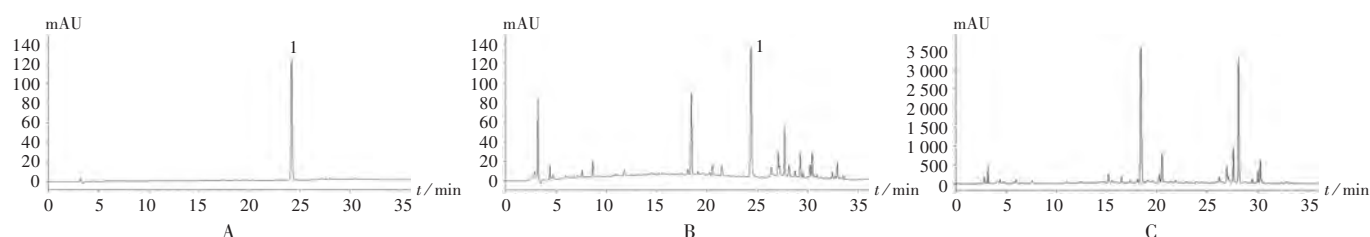
本研究中考察乙腈-甲酸水溶液、甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液等洗脱体系。经比较发现, 乙腈-0.1% 甲酸水溶液的分离效果较佳, 故选择其作为洗脱体系, 并优化得到最佳洗脱程序, 黄芩苷的保留时间为 24.4 min。

3.3 提取溶剂和提取时间确定

本研究中比较了甲醇溶液(100%, 50%, 10%, 含 5% 浓氨试液)及乙醇溶液(100%, 50%, 10%, 含 5% 浓氨试液)提取的效果, 结果以 50% 甲醇溶液提取时效果最好, 待测成分提取率相对较高。本研究中还考察了超声提取时间为 30, 60, 90 min 时待测成分含量随时间的变化情况, 在 60, 90 min 时, 成分含量未见明显变化, 故确定超声时间为 60 min。

3.4 方法评价

本研究建立的 HPLC 法高效、准确、可靠, 选择的指标成分贴近该制剂的主要药味及功能主治, 可为完善



1. 黄芩苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图