

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.05

HPLC 法同时测定芩黄颗粒中黄芩苷和甘草酸的含量

许艺凡,周冰,张聪,姚路路,杨会鲜,周德刚,张晓会

(国家兽用药品工程技术研究中心/洛阳惠中兽药有限公司,河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2019-10-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)02-0029-05 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了高效液相色谱法(HPLC)同时测定芩黄颗粒中黄芩苷和甘草酸的含量。采用 Agilent Eclipse XDB-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长为 252 nm,流速为 1.0 mL/min。结果显示,黄芩苷和甘草酸的进样浓度分别在 61.84~618.4、8.256~82.56 μg/mL($R^2=0.9999, 0.9999$) 范围内与峰面积呈良好线性关系;精密度、重复性和稳定性试验的 *RSD* 均小于 2.0%;平均加样回收率分别为 100.0%、99.2%,回收率的 *RSD* 分别为 1.0%、0.6% ($n=6$)。本方法操作简便、准确,可用于芩黄颗粒中黄芩苷和甘草酸含量的同时测定。

[关键词] 黄芩苷;甘草酸;高效液相色谱法;芩黄颗粒

The Content of Baicalin and Glycyrrhizic Acid in Qinhuang Granule Determined by HPLC

XU Yi-fan, ZHOU Bing, ZHANG Cong, YAO Lu-lu, YANG Hui-xian,
ZHOU De-gang, ZHANG Xiao-hui

(National Research Center for Veterinary Medicine/Luoyang Huizhong Veterinary Medicine Co., Ltd, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: To establish a method for simultaneous determination of baicalin and glycyrrhizic acid in Qinhuang granule by HPLC method, the chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at the flow of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 252 nm. The calibrations of baicalin and glycyrrhizic acid showed good linear relationships with the corresponding peak areas in the range of 61.84~618.4 μg/mL ($R^2=0.9999$) and 8.256~82.56 μg/mL ($R^2=0.9999$). *RSDs* of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries rates were 100.0% ($RSD=1.0%$, $n=6$) and 99.2% ($RSD=0.6%$, $n=6$). The method is simple and accurate. It can be used for simultaneous determination of baicalin and glycyrrhizic acid in Qinhuang granule.

Key words: baicalin; glycyrrhizic acid; HPLC; Qinhuang granule

芩黄颗粒是由黄芩、板蓝根、麻黄、山豆根、甘草、桔梗等六味中药组成的中兽药制剂,该方由《伤寒论》“麻杏甘石汤”药味加减而来,目前收载于《兽药质量标准》2017 年版。方中黄芩性寒、味苦,有清热燥湿、泻火解毒、凉血除热的作用,可治疗肺热咳嗽、湿热泻痢;甘草性平、味甘,有和中缓急、润肺解毒的功效,可治疗咽喉肿痛、肺痿咳嗽等症。该药在临床上主要用于鸡传染性支气管炎的预防与辅助性治疗^[1]。目前,芩黄颗粒质量标准中含量测定项分别对黄芩苷与甘草酸进行测定,也有学者单独研究了芩黄颗粒中甘草酸或黄芩苷的含量测定方法^[2-3],但未见有同时测定黄芩苷与甘草酸含量的相关报道。本研究首次建立了同时测定芩黄颗粒中黄芩苷和甘草酸含量的高效液相色谱方法,该方法简便、准确,可以提高该制剂在实际生产中的检验效率,为该制剂的质量控制提供了参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪,配备 2489 型紫外检测器;AB265 - S 电子分析天平, METTLER TOLEDO 公司;KQ - 500DB 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与材料 黄芩苷对照品(批号 110715 - 201720,含量:93.52%,中国食品药品检定研究院);甘草酸铵对照品(批号 110731 - 201720,含量:94.3%,中国食品药品检定研究院);芩黄颗粒(洛阳惠中兽药有限公司,批号:20190704、20190705、20190706,规格:500 g/袋);乙腈、甲醇均为色谱纯,Thermo Fisher Scientific 公司;磷酸为分析纯,天津大茂化学试剂厂;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB - C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:以乙腈为流动相 A,0.05% 磷酸溶液为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长:252 nm;柱温 30 °C;流速:1.0 mL/min;进样体积:10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	30	70
7	30	70
8	47	53
12	47	53
13	90	10
20	90	10
21	30	70
25	30	70

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取黄芩苷对照品、甘草酸铵对照品适量,精密称定,置于同一量瓶中,用适量甲醇使溶解,再加入 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成混合对照溶液(黄芩苷浓度为 0.3092 mg/mL、甘草酸铵浓度为 0.0413 mg/mL)(甘草酸重量 = 甘草酸铵重量/1.0207)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取处方中去除甘草、黄芩的其他药材,按芩黄颗粒处方比例和工艺制备阴性对照样品,按 2.2.2 项方法,制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图(图 1 ~ 图 3)。结果表明:供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应的位置上,有相同保留时间的色谱峰,且阴性无干扰,表明本方法专属性良好。

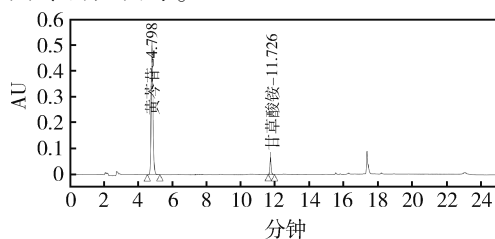


图 1 对照品色谱图

Fig 1 chromatogram of reference substance

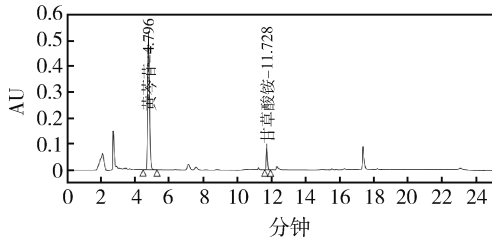


图 2 供试品色谱图

Fig 2 chromatogram of the test sample

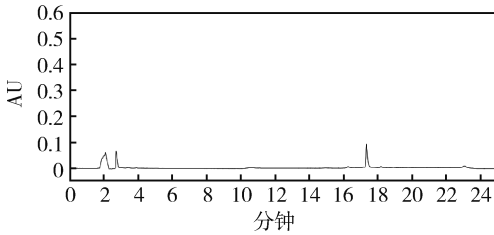


图 3 阴性色谱图

Fig 3 Negative chromatogram of baicalin and glycyrrhizic acid

2.4 线性关系考察 分别称取黄芩苷对照品、甘草酸铵对照品适量,精密称定,置于同一量瓶中,用适量甲醇使溶解,再加入 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成混合对照品储备液(黄芩苷浓度 0.6184 mg/mL、甘草酸铵浓度 0.08256 mg/mL)。精密量取混合对照品储备液 1、2、3、5、8 mL 于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制成线性对照溶液。分别精密吸取上述不同浓度的混合对照品溶液和对照品储备液各 10 μ L,注入液相色谱仪,记录峰面积。以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得黄芩苷的回归方程为: $Y = 12148 X + 2018.7, R^2 = 0.9999$;甘草酸的回归方程为: $Y = 8209.8 X + 463.92, R^2 = 0.9999$ 。表明黄芩苷的进样浓度在 61.84 ~ 618.4 μ g/mL 的范围内与峰面积线性关系良好;甘草酸的进样浓度在 8.256 ~ 82.56 μ g/mL 的范围内与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项的混合对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,记录色谱图,测得黄芩苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.5%、0.5% ($n=6$)。表明仪器精密度较好(表 2)。

表 2 精密度实验

Tab 2 Precision test

序号	黄芩苷峰面积	甘草酸铵峰面积
1	3784568	341019
2	3780912	341116
3	3824321	345204
4	3809914	343372
5	3808908	343722
6	3809509	343278
平均值	3803022	342952
$RSD/\%$	0.5	0.5

2.6 重复性试验 取批号 20190706 本品 6 份,精密称定,按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪,依法测定,结果黄芩苷、甘草酸的平均含量分别为 31.2、4.8 mg/g, RSD 分别为 0.9%、1.0% ($n=6$),结果表明,本法具有较好的重复性。

2.7 稳定性试验 取本品,精密称定,按 2.2.2 项制备供试品溶液,分别于第 0、2、4、6、8、10、12 h 各精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪,依法测定,结果黄芩苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.3%、0.4%。结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定性良好(表 3)。

表 3 稳定性试验

Tab 3 Stability test

时间/h	黄芩苷峰面积	甘草酸铵峰面积
0	3841229	415866
2	3825340	412068
4	3830570	414207
6	3856032	415448
8	3828989	413011
10	3826565	411758
12	3841450	415264
平均值	3835739	413946
$RSD/\%$	0.3	0.4

2.8 加样回收试验 取已知含量样品(批号:20190706)6 份,每份约 0.25 g,精密称定,按样品含量的 100% 分别加入黄芩苷和甘草酸对照品储备液,按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,分别精密吸

取 10 μL 注入液相色谱仪,依法测定,结果黄芩苷、甘草酸的平均加样回收率分别为 100.0%、99.2%,

RSD 分别为 1.0%、0.6% ($n=6$),表明方法准确度高(表 4、表 5)。

表 4 黄芩苷加样回收率

Tab 4 Recoveries of Baicalin in preparatio

称重/g	本底量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.25390	7.93	7.51	15.51	100.99	100.0	1.0
0.25320	7.90	7.51	15.29	98.31		
0.25217	7.87	7.51	15.42	100.54		
0.25844	8.07	7.51	15.60	100.26		
0.25560	7.98	7.51	15.45	99.52		
0.25986	8.11	7.51	15.63	100.13		

表 5 甘草酸加样回收率

Tab 5 Recoveries of Glycyrrhizic acid in preparatio

称重/g	本底量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.25390	1.24	1.20	2.44	100.13	99.2	0.6
0.25320	1.24	1.20	2.43	98.86		
0.25217	1.23	1.20	2.42	99.01		
0.25844	1.26	1.20	2.46	99.49		
0.25560	1.25	1.20	2.43	98.61		
0.25986	1.27	1.20	2.46	98.82		

2.9 样品测定 取芩黄颗粒 3 批(批号:20190704、20190705、20190706),按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,按 2.1 项色谱条件分别测定样品中黄芩苷和甘草酸的含量,三批样品的含量测定结果见表 6。

表 6 样品含量测定结果

Tab 6 Content determination results

批号	黄芩苷含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	甘草酸含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
20190704	29.0	4.7
20190705	29.0	4.7
20190706	31.2	4.8

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 分别取黄芩苷与甘草酸对

照品溶液,采用紫外分光光度法进行全波长扫描,结果黄芩苷的最大吸收波长为 277 nm、甘草酸的最大吸收波长为 252 nm。且两个成分在波长为 263 nm 处均具有较大的吸收。取供试品溶液,分别在 263 nm 和 252 nm 波长下依法测定,结果,在 252 nm 波长下,甘草酸峰的响应较 263 nm 下更高,因芩黄颗粒中黄芩苷的含量远高于甘草酸的含量,为使两种成分同时有较好的检出灵敏度,综合考虑,最终选择 252 nm 作为检测波长(图 4)。

3.2 流动相的选择 参考《中国兽药典》2015 年版二部甘草含量测定项下条件,采用乙腈-0.05% 磷酸为流动相进行试验^[4],同时根据文献报道,分别考察了乙腈-0.05% 磷酸溶液^[5-6]、甲醇-0.1% 磷酸溶液^[7]、乙腈-0.1% 磷酸溶液^[8]、甲醇-0.05% 磷酸溶液等流动相体系。最终选择乙

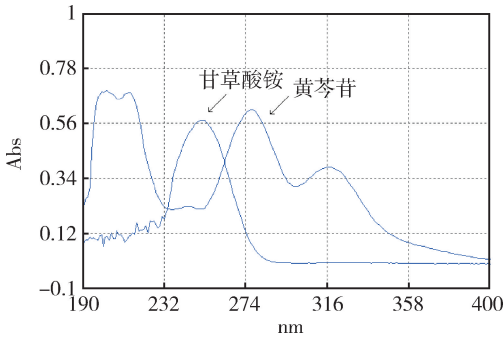


图 4 紫外全波长扫描图

Fig 4 Ultraviolet full wavelength scan

睛 -0.05% 磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱,主峰的分离效果较好,且基线较平稳,适用于黄芩苷与甘草酸的同时测定。

本文采用高效液相法同时测定了芩黄颗粒中黄芩苷与甘草酸的含量,该方法简便、准确、重复性好,对提高实际生产检验效率及本产品质量控制具有重要意义。

参考文献:

[1] 刘兴金, 张晓会, 李兴国, 等. 芩黄颗粒对人工感染鸡传染性支气管炎的预防试验[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2009, 29(5):72-73.
Liu X J, Zhang X H, Li X G, *et al.* Prevention of artificially infected chicken infectious bronchitis by Qihuang Granule[J]. Animal Science Abroad (Pigs and Poultry), 2009, 29(5):72-73.

[2] 张聪, 赵秋君, 张阔. 高效液相色谱法测定芩黄颗粒中甘草酸的含量[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(3):47-49.
Zhang C, Zhao Q J, Zhang G. Determination of Glycyrrhizic Acid in Qinhuang Granula by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2014, 48(3):47-49.

[3] 罗千古, 陶莉. HPLC 测定芩黄颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国现代中药, 2011, 13(8):34-39.
Luo Q G, Tao L. Determination of Baicalin in Qinhuang Granules by HPLC[J]. Modern Chinese Medicine, 2011, 13(8):34-39.

[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二〇一五年版[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Chinese Veterinary pharmacopoeia. 2015[S].

[5] 徐建, 康慧芬, 杨惠琳, 等. 甘草中甘草酸的含量测定方法研究[J]. 山东化工, 2018, 47(21):81-83.
Xu J, Knag H F, Yang H L, *et al.* Study on the Determination Method of Glycyrrhizic Acid in Glycyrrhiza[J]. Shandong Chemical Industry, 2018, 47(21):81-83.

[6] 费文静, 钱勇. 超高效液相色谱法测定不同产地甘草中甘草苷和甘草酸的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(2):339-343.
Fie W J, Qian Y. Determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in Gancao from different place by ultra performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(2):339-343.

[7] 黎春彤, 段斯庭, 李翔, 等. HPLC 法同时测定化痰祛斑胶囊中芍药苷、黄芩苷和黄芩素的含量[J]. 中国药师, 2018, 21(7):1287-1289.
Li C T, Duan S T, Li X, *et al.* Determination of Paeoniflorin, Baicalin and Baicalein in Huayuquban Capsules by HPLC[J]. China Pharmacist, 2018, 21(7):1287-1289.

[8] 庄志宏, 吴剑坤, 张林华. 基于 HPLC 法的芙蓉散质量控制方法研究[J]. 首都食品与医药, 2019, 26(12):186-187.
Zhuang Z H, Wu J K, Zhang L H. An improved quality control method for FURONG powder based on HPLC[J]. Capital Food Medicine, 2019, 26(12):186-187.

(编辑:侯向辉)