

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.12.08

高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量

朱育红¹, 潘康锁¹, 林涛², 苏敏³, 晏永新⁴, 杨彦平²

(1.陕西省兽药监测所, 西安 710016; 2.西安雨田农业科技有限公司, 西安 710075;

3.西安国联质量检测技术股份有限公司, 西安 710105; 4.江西新世纪民星动物保健品有限公司, 南昌 330096)

[收稿日期] 2018-06-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0049-05 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了测定蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量。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(45 : 55)为流动相, 以 280 nm 为检测波长, 流速为 1.0 mL/min, 建立了高效液相色谱测定方法。黄芩苷在 10.08~151.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, $R^2=0.9999$, 平均回收率为 99.8%, RSD 为 1.03%。该方法准确、简便、快速, 可用于控制蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量。

[关键词] 蒲地蓝消炎颗粒; 高效液相色谱法; 黄芩苷

The Content of Baicalin in Putilan Anti-inflammatory Granule Determined by HPLC

ZHU Yu-hong¹, PAN Kang-suo¹, LIN Tao², SU Min³, YAN Yong-xin⁴, YANG Yan-ping²

(1. Shaanxi Provincial Veterinary Drug Monitoring Institute, Xi'an 710016, China;

2. Xi'an Yutian agricultural science and technology limited company, Xi'an 710075, China;

3. Xi'an Guolian Federation of quality testing technology Limited, Xi'an 710105, China;

4. Jiangxi new century minxing animal health products limited company, Nanchang 330096, China)

Abstract: To determine the content of scutellaria baicalensis in putilan Anti-inflammatory granules. Using C18 column(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), At room temperature, methanol-0.3% phosphoric acid solution (45 : 55) was used as the mobile phase, The detection wavelength was 280 nm, The flow rate of 1.0 mL/min, A HPLC method for determination was established. The results showed, Baicalin had a good linear relationship in 10.08 ~ 151.2 in the range of $\mu\text{g}/\text{mL}$, $R^2=0.9999$, The average recovery rate was 99.8% and RSD 1.03%. This method is accurate, simple and fast, and can be used to control the content of scutellaria baicalensis in putilan anti-inflammatory granules.

Key words: Pudilan anti-inflammatory granule; HPLC; baicalin

蒲地蓝消炎颗粒是运用中兽医传统理论, 在中华人民共和国卫生部《部颁标准》第三册所载“蒲地蓝消炎片”的基础上研制的中兽药三类新药。处

方由黄芩、蒲公英、板蓝根和苦地丁四味药材组成。该药是采用提取精制的方法制成的中药颗粒剂, 具有清热解毒, 抗炎消肿之效, 用于鸡传染性支气管

炎诱发的咳喘证。收载在中华人民共和国卫生部《部颁标准》第三册的蒲地蓝消炎片原标准无含量测定方法。为更好的控制蒲地蓝消炎颗粒的质量,参考文献方法,研究建立了采用反相高效液相法测定蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量测定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 岛津 LC20 高效液相色谱仪;安捷伦 1100 型高效液相色谱仪;色谱柱 Kromasil 100-5-C18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm);电子天平(型号 BP211D)购自德国塞托里斯公司。

1.2 试药与试剂 黄芩苷对照品(批号为 110715-201117,标识含量为 91.7%)来源于中国食品药品检定研究院;蒲地蓝消炎颗粒样品(每 1 g 相当于原生药 1.5 g)三批,批号分别 20120203、20120204、20120205,来源于江西新世纪民星动物保健品有限公司;甲醇为色谱醇,天津市科密欧化学试剂有限公司生产;水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相:甲醇-0.3%磷酸溶液(45:55);流速:1.0 mL/min;检测波长 280 nm;柱温:室温;进样量:10 μL 。

2.2 溶液的制备

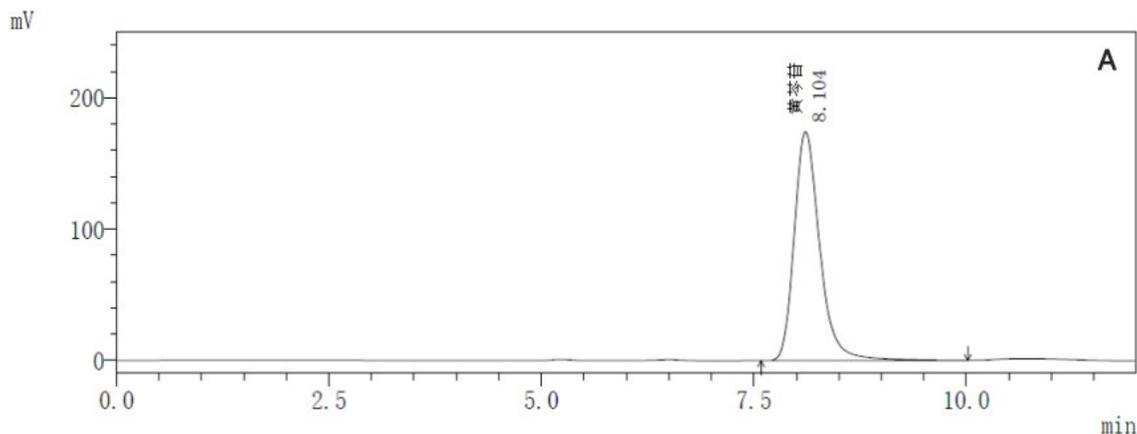
2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品适量,

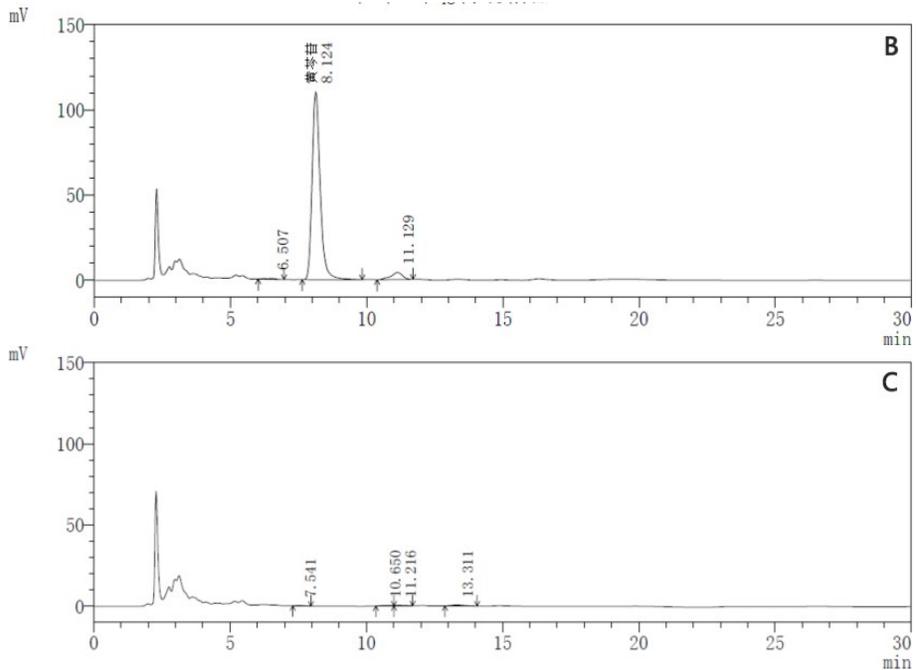
精密称定,加甲醇少许使溶解,加 50%甲醇稀释,制成每 1 mL 含 0.25 mg 的黄芩苷对照品贮备液(实际浓度为 0.252 mg/mL),精密量取黄芩苷对照品贮备液 5 mL,置 25 mL 容量瓶中,加 50%甲醇溶液稀释至刻度(实际浓度为 50.4 $\mu\text{g/mL}$),即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取蒲地蓝消炎颗粒适量,研细,取细粉约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%甲醇 100 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz)20 min,放冷,再称定重量,用 50%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方及制法制备不含黄芩的阴性制剂,取黄芩阴性制剂,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

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 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 7016,供试品色谱图中黄芩苷峰与临峰分离良好,分离度为 3.92,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 1)。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,专属性能满足检测要求。





(A; Radix scutellariae; B; Pudilan Anti-inflammatory Granule; C; Scutellariae Radix negative control)

图 1 专属性试验色谱图 (A、B、C 分别为黄芩苷、蒲地蓝消炎颗粒供试品、黄芩阴性对照)

Fig 1 HPLC chromatograms of specific test

2.4 线性关系考察 取黄芩苷对照品贮备液(浓度 0.252 mg/mL),分别精密吸取 1、2、5、10、15 mL,置 25 mL 容量瓶中,加 50%甲醇至刻度,按上述色谱条件,分别进样 10 μL,按上述色谱条件测定峰面积。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 $y=39.396x-2.1797$, $R^2=0.9999$ ($n=5$),黄芩苷在 10.08~151.2 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.5 准确度 采用加标回收的方法,在已知含量的蒲地蓝消炎颗粒中,加入一定质量的黄芩苷对照

品,按供试品溶液制备方法制备,使其制备后在供试品中的量为其限度值的 100%,共制备 6 份。再按 2.1 项色谱条件测定峰面积,计算黄芩苷的量,用实测值与供试品中含有量之差,除以加入对照品量,计算黄芩苷回收率,即得。

回收率 $R(100\%) = (\text{实测量} - \text{供试品中含有量}) / \text{添加量} \times 100\%$

测定结果,黄芩苷的回收率在 98.4%~101.4% 之间,平均回收率为 99.8%,RSD 为 1.03%,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

Tab 1 Recoveries 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	0.1546	2.522	3.01	5.538	100.2		
2	0.1483	2.419	3.01	5.408	99.3		
3	0.1511	2.464	3.01	5.478	100.1		
4	0.1490	2.430	3.01	5.426	99.5	99.8	1.03
5	0.1482	2.417	3.01	5.379	98.4		
6	0.1519	2.477	3.01	5.531	101.4		

2.6 精密度的取供试品(批号为 20120203)溶液,精密量取 10 μL ,按 2.1 色谱条件重复进样 6 次,测得黄芩苷峰面积 *RSD* 为 1.19%,结果见表 2。

表 2 精密度的试验
Tab 2 Precision test

序号	峰面积	平均峰面积	<i>RSD</i> /%
1	1966.6		
2	1991.3		
3	1962.5	1987.55	1.19
4	2004.6		
5	1976.8		
6	2023.5		

2.7 耐用性 取同一批蒲地蓝消炎颗粒(批号为 20120203)样品,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,保持流动相比比例和流速不变,在岛津 LC20 高效液相色谱仪和 Agilent1100 色谱仪上分别使用 Kromasil 100-5-C18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm)柱和 Agilent XDB-C18 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)色谱柱,于 20 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行测试,考察方法的耐用性,结果表明该方法能够耐受不同液相色谱仪,色谱柱,柱温等因素的小范围变化,测得蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量无明显差异,说明耐用性良好,结果见表 4。

表 4 耐用性试验

Tab 4 serviceability test

仪器	岛津 LC20 高效液相色谱仪			Agilent1100 高效液相色谱仪		
色谱柱	Kromasil 100-5-C18			Agilent XDB-C18 柱		
柱温/ $^{\circ}\text{C}$	20	30	40	20	30	40
含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	16.11	16.17	16.15	16.19	16.12	16.15

2.8 稳定性试验 取供试品(批号为 20120203)的样品,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,立即测定,再在 2、4、6、8 h 的时间点进行测定,结果 *RSD* 为 1.08%,表明测定值在 8 h 内基本稳定,结果见表 3。

表 3 稳定性试验

Tab 3 Stability test

时间	峰面积	平均峰面积	<i>RSD</i> /%
0	2019.7		
2	2018.1		
4	2029.4	2006.90	1.08
6	1981.1		
8	1986.2		

2.9 样品含量测定 取 3 批蒲地蓝消炎颗粒(批号分别为 20120203、20120204、20120205)分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 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 5 样品含量测定结果(单位: mg/g)

Tab 5 Content determination results (unit: mg/g)

批号	含量 1 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	含量 2 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均值 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
20120203	16.09	16.19	16.14
20120204	16.28	16.36	16.32
20120205	16.35	16.59	16.47

3 讨论与结论

3.1 含量测定成分的选择 蒲地蓝消炎颗粒处方源于中华人民共和国卫生部《部颁标准》第三册“蒲地蓝消炎片”,是由黄芩、蒲公英、板蓝根、苦地丁四味药材提取精制制成的中药颗粒剂,具有清热解毒,抗炎消肿之效,用于鸡传染性支气管炎诱发的咳喘证。黄芩为该制剂的君药,其主要成分为黄芩苷。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,故选择

黄芩苷作为含量测定成分。采用 HPLC 测定蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量,操作简便,黄芩苷在 10.08~151.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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,具有显著的生物活性。其提取分离方法主要有水浴回流提取法,水提酸沉法、醇提酸沉法、有机溶剂超声法等方法。参考《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部双黄连口服液含量测定项下前处理方法,本试验采用 50% 甲醇作为溶剂,超声处理 20 min,结果证明该方法能够较为完全地提取出蒲地蓝消炎颗粒中的黄芩苷,并且阴性对照无干扰。

3.3 结论 用高效液相法测定蒲地蓝消炎颗粒中黄芩苷的含量,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。

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] 姚丽佳,谢静,将万浪.蒲地蓝消炎片质量标准研究[J].中华综合临床医学杂志,2008,6(3):61-63.
Yao L J., Xie J., Jiang W L. Study on the quality standard of Pudilan[J]. Chinese Journal of comprehensive clinical medicine, 2008,6(3):61-63.

[3] 曹兵,胡春雪,熊叶红.蒲地蓝消炎片质量控制方法研究[J].大理学院学报,2008,6:4-6.
Cao B, Hu C X, Xiong Y H., Study on the quality control method of Pudilan Anti-inflammatory tablets[J]. journal of dali university, 2008,6:4-6.

[4] 宋茹,迟归兵,袁继民.蒲地蓝消炎片的质量标准研究[J].解放军药科学学报,2008,24:229-231.
Song R, Chi G B, Yuan J M. Study on the quality standard of Pudilan[J]. The people's liberation army pharmaceutical journals, 2008,24:229-231.

[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 Drug, 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 Tablets by HPLC[J]. Zhongnan Pharmaceutical, 2008(6),10(5):635-636.

[7] 黄睿,张双.高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中黄芩苷的含量[J].黑龙江医药,2006,19(1):4-5.
Huang R, Zhang S. Determination of Baicaiin in Pudilanxiaoyan Tablets by HPLC [J]. Heilongjiang Medicine Journal 2006,19(1):4-5.

[8] 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.

[9] 王薇,刘冬丽,李维熙,等.蒲地蓝消炎片中黄芩苷的含量测定[J].中国民族民间医药,2016(2),25(3):17-18.
Wang W, Liu D L, Li W X et al. Determination of Baicalin in Pudilan Xiaoyan Tablet [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2016(2),25(3):17-18.

[10] 陆益,黎远冬,梁宁生,等.高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中黄芩苷的含量[J].中国医院药学杂志,2006,26(11):1442-1443.
Lu Y, Li Y D, Liang N S, et al. Determination of Baicalin in Pudilan Xiaoyan Tablet by HPLC [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2006,26(11):1442-1443.

[11] 魏尊喜.高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中黄芩苷的含量[J].中国药业,2006,15(17):38-39.
Wei Z X. Determination of Baicalin in Pudilan Xiaoyan Tablet by HPLC [J]. China Pharmaceuticals 2006,15(17):38-39.

[12] 李志雄.蒲芩消炎片的药学研究[D].湖北:湖北中医学院,2004.
Li Z X. Pharmaceutical Study Pudilan Anti-inflammatory tablets [D]. Hubei: Hubei College of Traditional Chinese Medicine, 2004.

[13] 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.

[14] 郭温迎,庄建芳. HPLC 法测定银黄颗粒中黄芩苷的含量[J].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 [J]. Chinese traditional medicine science and technology, 2010,17(5):427.