

文章编号:1000-5862(2013)05-0527-03

HPLC 法测定银黄口服液中黄芩苷的含量

韦国兵 胡奇军 廖夫生

(江西中医药大学药学院,江西 南昌 330004)

摘要:采用效液相色谱法,色谱柱为 Kromasil 100-5 ODS2 C₁₈ (5 μm 250 mm × 4.6 mm),柱温为室温,流动相为相甲醇-水-0.1 mol/L 磷酸(45.0:55.0:0.2),流速为 1 mL/min,检测波长为 280 nm,建立了银黄口服液中黄芩苷的含量测定方法。在上述条件下,黄芩苷在 0.002 72 μg · mL⁻¹ ~ 0.054 40 mg · mL⁻¹ (r = 0.999 1) 范围内具有良好的线性关系,平均回收率为 100.07%,RSD = 1.13%。该法简单、准确且快速,可作为银黄口服液中黄芩苷的含量测定方法。

关键词:HPLC;银黄口服液;黄芩苷;含量

中图分类号:R 286 **文献标志码:**A

0 引言

银黄口服液是由黄芩提取物与金银花提取物制成的中药复方制剂,具有清热解毒、消炎之功效,临床用于外感风热、肺胃热盛所致的咽干、喉核肿大、口渴、发热、急慢性扁桃体炎、急慢性咽炎和上呼吸道感染等症状^[1]。绿原酸、黄芩苷是银黄口服液的主要活性成分。按 2010 年版《中国药典》^[2] 规定,黄芩苷是黄芩中的标志性成分之一,用于鉴定黄芩等同科植物,因此测定黄芩苷的含量可用于银黄口服液的质量测定。《中国药典》分别对金银花提取物中的绿原酸和黄芩提取物中的黄芩苷进行测定,但未对银黄口服液制剂中的黄芩苷进行测定^[3]。本文参考相关文献^[4-6],通过试验,以黄芩苷含量为指标,建立了 HPLC 法测定该制剂中黄芩苷的含量测定方法。

1 仪器与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国,Agilent 公司)、G1314B 紫外检测器;GZX-9070 MBE 恒温箱;色谱柱 Kromasil 100-5c18ODS2 (5 μm,250 mm × 4.6 mm,瑞典,Kromasil 公司)、电子天平 AB104-N (瑞士,METTER 公司);超声波清洗机 KQ-100 型

(江苏昆山超声仪器有限公司)。

金银花、黄芩药材均购自江西省樟树市药材市场;黄芩苷购自中国药品生物检定所(质量分数 > 99%);甲醇为色谱纯;其他为分析纯;水为双蒸馏水。

1.2 银黄口服液的制备

取黄芩和金银花,参照《中国药典》^[2] 进行提取,分别得黄芩提取物和金银花提取物;将黄芩提取物加水适量使之溶解,用 8% 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 8.0,过滤,滤液与金银花提取物合并,用质量分数为 8% 的氢氧化钠溶液调节 pH 值到 7.2,煮沸 1 h,过滤,加入单糖浆适量,加水至全量,摇匀,用质量分数为 8% 的氢氧化钠溶液调节 pH 值到 7.2,加水至 1 000 mL,滤过,灭菌即得银黄口服液样品。

1.3 色谱分析

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil 100-5c18 (5 μm 250 mm × 4.6 mm)。流动相:甲醇-水-磷酸(45.0:55.0:0.2)。检测波长:280 nm;柱温:室温;检测波长 280 nm;流速:1 mL · min⁻¹,理论塔板数按黄芩苷的色谱峰计算不少于 2 000。

1.3.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥的黄芩苷对照品 3.4 mg 于 25 mL 的容量瓶中,加甲醇至刻度,超声 20 min,摇匀,定容至刻度,即得到浓度为 0.136 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 精密吸取银黄口服液

收稿日期:2013-06-02

基金项目:江西省教育厅科技课题(GJJ10213)和江西中医药大学校级中医药专项课题(2012-1-10)资助项目。

作者简介:韦国兵(1976-),男,湖南沅江人,副教授,主要从事药物质量标准及中药活性成分分析研究。

2.0 mL 置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,超声 30 min 摇匀过滤,定容至刻度,即得供试品溶液。

1.3.4 阴性样品溶液的制备 取金银花按照《中国药典》(2010 版)制备工艺制备成相应的阴性样品溶液^[2]。

1.3.5 线性关系考察 精密吸取 $0.136 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷对照品溶液 0.2、0.4、1.2、3 和 4 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别得到 0.002 78、0.005 44、0.013 6、0.027 2、0.040 8、0.054 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。分别取以上 6 种对照品溶液各进样 $10 \mu\text{L}$,记录色谱图色谱峰面积,以进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积值 Y 为纵坐标作线性回归,回归方程为: $Y = 4\,746.5x - 79.640$, $r = 0.999\,1$,表明黄芩苷进样量在 $0.002\,72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.054\,40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

1.3.6 精密度试验 取浓度为 $0.027\,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,精密吸取对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,测定精密度。

1.3.7 稳定性试验 取配置好的同一供试品溶液分别在 0、2、4、6、8 和 12 h 进样各 $10 \mu\text{L}$,记录峰面积,计算 RSD 值。

1.3.8 重复性试验 取同一批号银黄注射液样品(批号:130415)6 份,精密吸取,按 1.3.10 节样品含量测定方法进行测定。

1.3.9 回收率试验 取银黄注射液样品(批号:130424)6 份,再分别用移液管精密移取 1 mL 溶液于 3 只 10 mL 容量瓶中,进行编号。再分别用移液管量取对照品溶液($0.129 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)相当于供试品溶液质量的 80%、100%、120% 于上述 3 个容量瓶中,摇匀,按样品溶液制备项下操作,进样、记录色谱峰面积并计算回收率。

1.3.10 样品测定 精密量取对照品与样品溶液各 $10 \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,按上述方法测定。记录色谱图,以外标法计算样品中黄芩苷的含量。

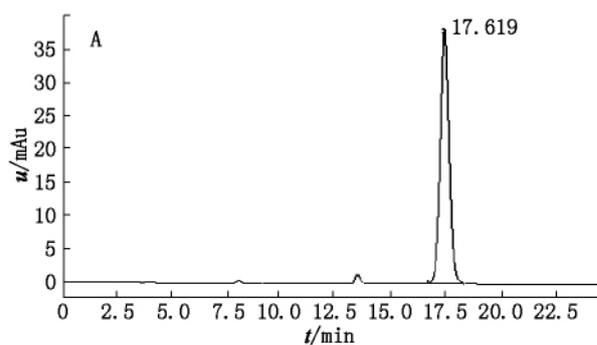
2 结果

2.1 色谱分离

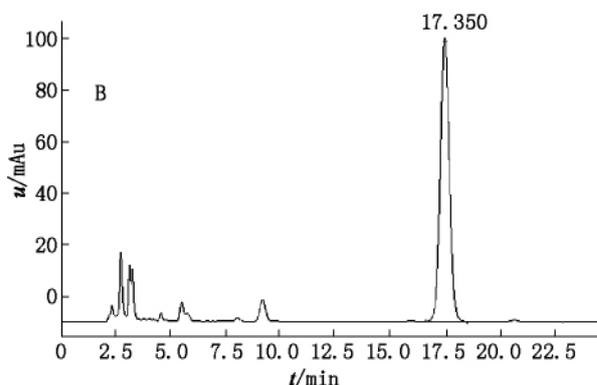
分别进样对照品、供试品和阴性样品,按本法进行测定得到图 1 所示的色谱图。

2.2 线性关系考察

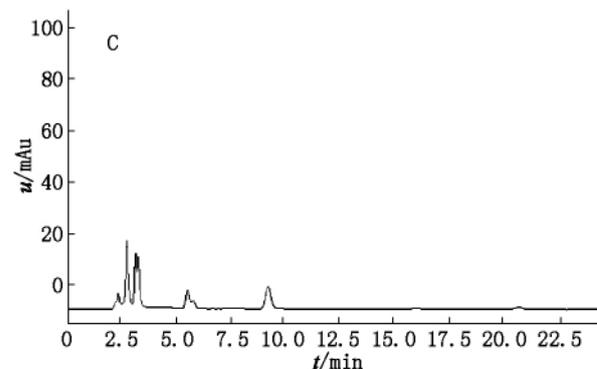
线性考察表明黄芩苷进样量在 $0.002\,72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.054\,40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好



A: 黄芩苷对照品



B: 银黄口服液



C: 阴性对照品

图 1 高效液相色谱图

的线性关系。

2.3 精密度试验

取 1 项下的对照品溶液($0.027\,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),按上述条件重复连续进样 6 次,平均峰面积为 5 659, $RSD = 0.89\%$ 。

2.4 重复性试验

取同一批号银黄注射液样品(批号:130415),平行制备供试品溶液 6 份,精密吸取,按上述方法进行测定。测得黄芩苷含量为 $0.948\,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.05%。

2.5 稳定性试验

取配置好的同一供试品样品溶液于室温放置,

分别于放置 0、2、4、6、8 和 12 h 后按上述方法进行分
析. 各进样 10 μL , 记录峰面积, 计算 RSD 值, RSD 为
1.2%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定.

2.6 加样回收率试验

加样回收结果见表 1.

表 1 回收率试验结果

编号	样品中黄芩 的含量/mg	苷加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
1	1.300 0	1.032 0	2.330 8	99.88		
2	1.300 0	1.032 0	2.347 0	101.45		
3	1.300 0	1.032 0	2.345 4	101.30		
4	1.300 0	1.290 0	2.587 2	99.78		
5	1.300 0	1.290 0	2.591 8	100.14	100.07	1.13
6	1.300 0	1.290 0	2.586 8	99.75		
7	1.300 0	1.548 0	2.831 5	98.93		
8	1.300 0	1.548 0	2.849 5	100.10		
9	1.300 0	1.548 0	2.822 7	98.36		

2.7 样品的测定

按上述方法精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入
液相色谱仪, 按照外标法根据峰面积计算样品中黄
芩苷的含量, 结果见表 2.

表 2 样品含量测定结果 ($n=3$)

批号	样品黄芩苷的 含量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	黄芩苷的平均 含量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD /%
20060102	0.946 5		
20060102	0.933 6	0.944 9	1.10
20060102	0.954 5		

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

黄芩苷为一种黄酮衍生物, 具有显著的生物活
性, 其水溶性很小, 具有一定的脂溶性. 查阅文献后,
分别用甲醇、50% 的甲醇、70% 甲醇作为提取溶剂进行
提取, 结果发现用 50% 的甲醇溶液提取得到的色谱
峰^[7]、峰型、分离得较好, 因此用 50% 的甲醇进行提取.

根据文献^[8]制备供试品, 结果发现, 超声处理
30 min 即可提取完全, 得到的峰形较好, 干扰少.

3.2 流动相的选择

本实验对文献提供的色谱条件分别进行了考察
分析. 宋卫青等^[9-10]用高效液相色谱法测黄芩苷的含
量, 本实验改变甲醇-水-磷酸的比例进行试验, 会使
峰型变化, 最终确定甲醇-水-磷酸(45.0:55.0:0.2)为
最佳的流动相. 能排除其他成分的干扰, 且峰型
理想.

3.3 检测波长的选择

取黄芩苷对照品溶液, 用紫外分光光度计在
200~400 nm 范围内测黄芩苷的吸收曲线, 发现黄
芩苷在 280 nm 处有最大吸收, 因此选 280 nm 作为

测定波长.

黄芩苷在本处方中含量较高, 而且稳定. 当前关
于黄芩苷的含量测定方法很多, 其中以高效液相色
谱法较为成熟且方便易行, 专属性高. 本文通过对提
取溶剂、流动相、检测波长等色谱条件的选择对银黄
口服液中的黄芩苷进行快速、准确地定量与定性分
析, 该方法可行而且准确度高, 结果可靠, 可用于银
黄口服液的质量控制.

4 参考文献

- [1] 朱啸风, 孙钦美, 刘景俊. 银黄口服液中黄芩苷和绿原
酸含量的测定 [J]. 齐鲁药事 2004, 23(6): 25-26.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典(一部) [M]. 北京: 中国医
药科技出版社 2010: 205-206; 1082-1083.
- [3] 桑旭峰, 吴海雯, 徐奇超. HPLC 同时测定银黄口服液中绿
原酸和黄芩苷含量 [J]. 中成药 2005, 27(1): 96-98.
- [4] 孟品佳, 孙毓庆. 高效液相色谱法分离金银花成分及测
定绿原酸含量 [J]. 药物分析杂志 1990, 10(1): 58.
- [5] 韦国兵. HPLC 法测定二妙胶囊中盐酸小檗碱的含量
[J]. 中国现代医学杂志 2010, 20(11): 1701-1703.
- [6] 王娅, 方志青, 林野, 等. 高效液相色谱法测定地表灰尘
中的 16 种多环芳烃 [J]. 江西师范大学学报: 自然科
学版 2012, 36(3): 313-316.
- [7] 申去非, 张莉, 朱铁梁, 等. 黄芩苷含量测定方法研究进
展 [J]. 中医药信息 2009, 26(4): 14-16.
- [8] 王晓琴, 赵瑛, 支德娟, 等. 水提取物中黄芩苷含量的测
定方法 [J]. 时珍国医国药 2006, 17(10): 1898-1899.
- [9] 翁代群, 喻强. 中成药制剂中黄芩苷含量测定方法研究
进展 [J]. 重庆中草药研究 2003(2): 58-61.
- [10] 罗小敏, 陈建真. 黄芩及其制剂中黄芩苷定量方法研究
进展 [J]. 世界科学技术, 中医现代化 2006, 8(5):
75-79.

(下转第 534 页)

The Research on the Fermentation Production of Nitrile Hydratase by Using Waste Cell Solution as Nitrogen Source

SUN Wan-ju ,WANG Xiao-lan*

(College of Life Science ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract:The waste cells in fermentative production were often discarded directly ,causing environmental pollution and the waste of resources. Nitrogen source in the waste cell solution can be reused in the production of nitrile hydratase instead of yeast extract when the cell wall was destroyed. Ultrasonic freezing and thawing and hot alkaline were investigated for cell wall-breaking. The results showed that hot alkaline was more effective for higher amino nitrogen content. The optimum reaction conditions were NaOH $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h ,which is elected by orthogonal experiment ,then the amino nitrogen concentration reached $24.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The suitable ratio (3:2) was determined through its impact on the nitrile hydratase activity by using waste cell solution replaced a certain amount of yeast extract as nitrogen source. Compared with the original medium's enzyme activity $1.055 \times 10^7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ whose nitrogen source was complete yeast extract ,the nitrile hydratase activity was $1.063 \times 10^7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the medium containing waste cell solution.

Key words:waste cell ;solution ;nitrogen source ;nitrile hydratase

(责任编辑:刘显亮)

(上接第 529 页)

The Determination for Baicalin in Yinhuang Oral Liquid by HPLC

WEI Guo-bing ,HU Qi-jun ,LIAO Fu-sheng

(Department of Pharmacy ,Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine ,Nanchang Jiangxi 330004 ,China)

Abstract:To establish a HPLC method for the determination of baicalin in Yinhuang Oral Solution. The HPLC analysis was carried out on a Kromasil 100-5 ODS2 C_{18} ($5 \mu\text{m}$ $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$) column with the temperature at the room temperature. The mobil phase was methanol-water- 0.1 mol/L phosphoric acid (45.0:55.0:0.2) ,with flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,and the detection wavelength was set at 280 nm for determination of baicalin. The linear range of baicalin was $0.00272 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.05440 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9991$) ,the average recovery this method was 100.07% and the RSD was 1.13% . The method is simple rapid accurate and can be used for the quality control of the Yinhuang Oral Solution and its content determination.

Key words:HPLC ;Yinhuang Oral Solution ;baicalin ;content

(责任编辑:刘显亮)