

HPLC 法同时测定葛根芩连片中葛根素和黄芩苷的含量

吴永芹, 冯 凯, 周 慧, 赵新静, 李发美¹ (山东省济宁市药品检验所, 济宁 272025; ¹沈阳药科大学)

摘要: 目的 建立同时测定葛根芩连片中的葛根素和黄芩苷含量的方法。方法 采用高效液相色谱法, 使用 Ultimate LP-C18 色谱柱; 流动相: 甲醇-1%冰醋酸溶液; 检测波长: 0~20min, 250nm, 20~45min, 278nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35℃。结果 葛根素在 0.03869~0.7738 μg ($r=0.99999$) 范围内, 黄芩苷在 0.02052~0.4104 μg ($r=0.99999$) 范围内, 线性关系良好。葛根素平均回收率为 98.57%, RSD=1.6%; 黄芩苷平均回收率为 99.41%, RSD=1.9%。结论 本法专属性强、准确度高, 可作为葛根芩连片质量控制的方法。

关键词: 葛根素; 黄芩苷; 葛根芩连片; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2012) 03-0282-03

Simultaneous Determination of Puerarin and Baicalin in Gegen Qinlian Pills by HPLC

Wu Yongqin, Feng Kai, Zhou Hui, Zhao Xinjing and Li Famei¹ (Jining Institute for Drug Control, Shandong Province, Jining 272025; ¹Shenyang Pharmaceutical University)

ABSTRACT: **Objective** To establish the method for simultaneous determining puerarin and baicalin in Gegen Qinlian Pills by HPLC. **Methods** HPLC analysis was carried out by a Ultimate LP-C18 column. The mobile phase was methanol-0.1% glacial acetic acid. The detection wavelength was 0-20min, 250nm; 20-45min, 278nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 35℃. **Results** Puerarin showed good linearity in the range of 0.03869~0.7738 μg ($r=0.99999$), and baicalin showed good linearity in the range of 0.02052~0.4104 μg ($r=0.99999$). The average recovery of puerarin was 98.57%, RSD=1.6%, and the average recovery of baicalin was 99.41%, RSD=1.9%. **Conclusion** The method has better specificity, high accuracy and can be used for quality control of Gegen Qinlian Pills.

KEY WORDS: puerarin; baicalin; Gegen Qinlian Pills; HPLC

葛根芩连片是由葛根、黄芩、黄连、炙甘草四味药组成, 具有解肌清热、止泻止痢等功效。临床用于湿热蕴结所致的泄泻、痢疾, 症见身热烦渴、下痢臭秽、腹痛不适。《中国药典》2010 年版一部仅收录了葛根、黄连的含量测定, 为进一步对制剂质量进行有效控制, 本试验建立了 HPLC 法同时测定葛根芩连片中的葛根素和黄芩苷的含量的方法。

1 仪器与试剂

SHIMADZU LC-20AT 高效液相色谱仪, SHIMADZU SPD-20A 紫外检测器, SHIMADZU CTO-20A 柱温箱, SHIMADZU SIL-20A 自动进

样器, LC solution 色谱工作站。葛根素对照品 (批号: 110752-200511)、黄芩苷对照品 (批号: 715-200111) (中国药品生物制品检定所); 葛根芩连片 (A 厂, 批号: 080301、080302; B 厂, 批号: HE001、HE002; C 厂, 批号: 20080301、20080601; D 厂, 批号: 080716、080718; E 厂, 批号: 070917、070929; F 厂, 批号: 070904)。甲醇为色谱纯, 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

Ultimate LP-C18 色谱柱 (4.6mm×250mm,

5 μ m)。流速：1.0mL·min⁻¹。检测波长：0~20min, 250nm; 20~45min, 278nm。柱温：35℃。进样量：5 μ L。流动相：甲醇-1%冰醋酸溶液，梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序 %

时间(min)	甲醇	1%冰醋酸
0~15	25	75
20~43	60	40
45~70	25	75

2.2 对照品溶液的制备

精密称取葛根素和黄芩苷对照品适量，加甲醇制成浓度为 77.38 μ g·mL⁻¹和 41.04 μ g·mL⁻¹的混合溶液，即得对照品溶液，溶液用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤后进样。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 20 片，糖衣片除去糖衣，精密称定，

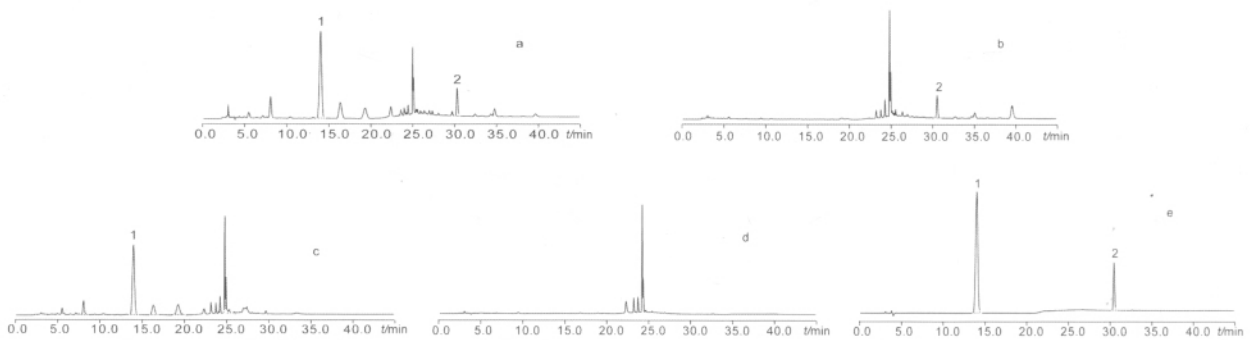
研细，取约 0.2g，精密称定，置于 100mL 具塞锥形瓶中，精密加入 70%乙醇 50mL，密塞，称定重量，超声（功率：250W，频率：40kHz）处理 30min，放冷至室温，再称定重量，用 70%乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液，溶液用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤后进样。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方比例和制备工艺制备缺葛根和黄芩的阴性对照样品，按“2.3”项下供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

2.5 干扰试验

取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 5 μ L 进样测定，葛根素峰和黄芩苷峰的理论板数分别不低于 11000 和 170000，葛根素峰和黄芩苷峰与其他组分色谱峰的分度度分别为 2.2 和 1.7，达到基线分离，阴性对照无干扰。结果见图 1。



a. 供试品溶液；b. 缺葛根阴性对照溶液；c. 缺黄芩阴性对照溶液；
d. 缺葛根和黄芩阴性对照溶液；e. 对照品溶液；1. 葛根素；2. 黄芩苷。

图 1 葛根芩连片 HPLC 色谱图

2.6 线性关系考察

取“2.2”项下的混合对照品溶液，用自动进样器精密吸取 0.5、1、3、5、7、10 μ L，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定，记录色谱图。以峰面积为纵坐标 Y，进样量 (μ g) X 为横坐标，绘制标准曲线。回归方程：

$$Y_{\text{葛根素}} = 4.5284 \times 10^3 X - 3.6908 \times 10^3 \quad r = 0.99999$$

$$Y_{\text{黄芩苷}} = 3.1576 \times 10^3 X - 1.0784 \times 10^3 \quad r = 0.99999$$

结果表明：葛根素在 0.03869~0.7738 μ g 范围内，黄芩苷在 0.02052~0.4104 μ g 范围内，线性关系良好。

2.7 精密度试验

取上述对照品溶液，进样 5 μ L，连续进样 5 次，按上述色谱条件测定，记录峰面积，葛根素和黄芩苷峰面积的平均值分别为 1747835 和 663540，

RSD 分别为 0.34% 和 0.26% (n=5)。结果表明，系统精密度良好。

2.8 重复性试验

取同一批号葛根芩连片样品（批号：20080301）6 份，按照“2.3”项下的方法平行制备供试品溶液 6 份。按照上述色谱条件进样测定，进样 5 μ L，葛根素和黄芩苷平均含量分别为 26.99mg·g⁻¹ 和 7.40mg·g⁻¹，RSD 分别为 0.34% 和 0.26% (n=6)。结果表明，方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液，在配制后第 0、2、4、8、14、24h 进样测定，进样 5 μ L，记录峰面积，葛根素和黄芩苷峰面积的平均值分别为 2560506 和 462593，RSD 分别为 0.30% 和 0.97%。结果表明，供试品溶液在 24h 内稳定。

2.10 回收率试验

用甲醇分别配制浓度为 $0.7735\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葛根素对照品溶液和浓度为 $0.4374\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芩苷对照品溶液。取已知含量的葛根芩连片样品(批号: 20080301, 含葛根素 $26.99\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和黄芩苷 $7.40\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 约 0.1g, 共 9 份, 精密称定, 置于 100mL 具塞锥形瓶中, 分别精密量取上述对照品溶液, 加入 50%、100%、150% 的葛根素和黄芩苷对照品, 按照“2.3”项下的方法制备样品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 进样 $5\mu\text{L}$, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

成分	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
葛根素	2.791	1.392	4.179	99.73	98.57	1.6
	2.799	1.392	4.166	98.20		
	2.748	1.392	4.136	99.74		
	2.748	2.785	5.471	97.78		
	2.769	2.785	5.425	95.37		
	2.748	2.785	5.485	98.29		
	2.820	4.177	6.964	99.19		
	2.777	4.177	6.965	100.30		
	2.785	4.177	6.946	99.60		
黄芩苷	0.7652	0.3937	1.166	101.80	99.41	1.9
	0.7674	0.3937	1.157	98.95		
	0.7533	0.3937	1.136	97.15		
	0.7533	0.7873	1.559	102.30		
	0.7592	0.7873	1.542	99.37		
	0.7533	0.7873	1.539	99.74		
	0.7733	1.203	1.946	97.53		
	0.7615	1.203	1.945	98.40		
	0.7637	1.203	1.934	97.26		

2.11 样品含量测定

取 11 批样品, 按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 $5\mu\text{L}$, 按照上述色谱条件测定, 记录峰面积, 计算样品中葛根素和黄芩苷的含量, 结果见表 3。

表 3 含量测定结果 ($n=3$) $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$

批号	葛根素含量	黄芩苷含量
080301	12.42	3.41
080302	10.37	2.67
HE001	13.02	5.00
HE002	13.12	5.08
20080301	6.17	0.38
20080601	5.34	0.99
080716	9.94	3.28
080718	10.11	3.36
070917	1.34	11.97
070929	1.18	5.98
070904	14.05	1.71

3 讨论

3.1 检测波长的选择

在 230~300nm 波长范围内扫描紫外吸收光谱, 葛根素在 250nm 波长处、黄芩苷在 278nm 波长处有最大吸收, 两者吸收峰差距大。分别记录 250nm 和 278nm 条件下的色谱图, 与切换波长记录的色谱图计算结果比较, 250nm 下黄芩苷的测定结果偏低, 278nm 下葛根素的含量测定结果偏低, 所以把检测波长定为 0~20min, 250nm; 20~45min, 278nm, 切换波长记录色谱图。

3.2 流动相的选择

比较了甲醇-1%冰醋酸溶液不同比例及其他不同组成的流动相, 如甲醇-0.2%磷酸溶液、甲醇-0.5%冰醋酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.5%冰醋酸溶液。结果发现, 选择本文所用流动相, 梯度洗脱, 待测成分分离较好且峰形最佳。

3.3 提取条件的选择

比较加热回流提取 30min 和超声提取 30min 的含量结果, 发现加热回流提取和超声提取的结果基本一致, 选择超声提取方法。分别采取不同浓度的乙醇溶液 (30%、50%、70%) 和甲醇溶液 (50%、70%、100%)、不同的超声时间 (30、40、50min)、不同的提取溶剂用量 (50、60、70、80、90、100mL)、不同的柱温 (25、30、35、40℃)、不同的提取次数 (1、2、3 次) 进行提取, 结果表明, 本文所用方法即可提取比较完全。

参考文献:

- [1] 中国药典 [S]. 一部, 2010: 1147-1148.
- [2] 威雪勇, 傅海珍, 戴恩达, 等. HPLC 法测定葛根芩连微丸中黄芩苷含量 [J]. 江苏大学学报, 2006, 16 (1): 53-55.
- [3] 张科卫, 蔡皓, 池玉梅, 等. HPLC 双波长法测定葛根芩连微丸中葛根素、黄芩苷的含量 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 42-45.
- [4] 陈红军. RP-HPLC 法测定葛根芩连片中葛根素的含量 [J]. 中国药房, 2007, 18 (18): 1408-1409.
- [5] 雷鹏, 刘韶, 李新中, 等. 葛根芩连汤饮片汤剂、配方颗粒汤剂中黄芩苷含量比较 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25 (11): 1008-1010.
- [6] 刘青, 赵敏. HPLC 法测定葛根芩连片中黄芩苷的含量 [J]. 齐鲁药事, 2007, 26 (03): 157-158.
- [7] 惠涛, 杨宗辉. HPLC 法测定清热解毒片中黄芩苷的含量 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23 (4): 206-207.
- [8] 杨立伟, 龙飞, 肖树雄. HPLC 法测定消炎清热胶囊中黄芩苷的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19 (21): 1632-1634.
- [9] 林芳, 蒋平, 王文清, 等. 反相高效液相色谱法测定葛根芩连胶囊中葛根素含量 [J]. 药物鉴定, 2006, 15 (3): 29-30.
- [10] 李向阳, 李振国. 葛根芩连片中葛根素含量测定方法的验证 [J]. 中医研究, 2007, 20 (5): 29-31.