

HPLC 法同时测定小儿双解止泻颗粒中葛根素和黄芩苷的含量

张胜娜¹ 吴素香² 薛海娜¹ 姜茜¹ (1. 瑞安市中医院 浙江瑞安 325200; 2. 浙江中医药大学)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定小儿双解止泻颗粒中葛根素和黄芩苷含量的方法。方法: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 的磷酸溶液, 流动相 B 为甲醇, 二元梯度洗脱; 检测波长: 265 nm; 流速: 1.0 ml·min⁻¹; 柱温: 30℃; 进样量 20 μl。结果: 葛根素进样量在 0.121~1.942 μg 范围内($r=0.9995$), 黄芩苷进样量在 0.230~3.686 μg 范围内线性关系良好($r=0.9995$); 平均加样回收率分别为 98.10% 和 98.20%, RSD 分别为 1.34% 和 1.11% ($n=6$)。结论: 该法简便、快速、准确, 可用于小儿双解止泻颗粒的质量控制。

关键词 小儿双解止泻颗粒; 葛根素; 黄芩苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2015)05-0863-03

Simultaneous Determination of Puerarin and Baicalin in Xiao'er Shuangjie Zhixie Granules by HPLC

Zhang Shengna¹, Wu Suxiang², Xue Haina¹, Jiang Qian¹ (1. Zhejiang Ruian Hospital of TCM, Zhejiang Ruian 325200, China; 2. Zhejiang University of TCM)

ABSTRACT Objective: To establish a method for the determination of puerarin and baicalin in Xiao'er Shuangjie Zhixie granules by HPLC. **Methods:** An Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm 5 μm) was used. The mobile phase A was 0.1% phosphoric acid solution and the mobile phase B was methanol with gradient elution. The detection wavelength was 265 nm, the flow rate was 1.0 ml·min⁻¹, the column temperature was 30℃ and the sample size was 20 μl. **Results:** The linear range of puerarin was 0.121~1.942 μg ($r=0.9995$) and that of baicalin was 0.230~3.686 μg ($r=0.9995$). The average recovery was 98.10% and 98.20% with RSD of 1.34% and 1.11% ($n=6$), respectively. **Conclusion:** The method is convenient and accurate, which can be used in the determination of puerarin and baicalin in Xiao'er Shuangjie Zhixie granules.

KEY WORDS Xiao'er Shuangjie Zhixie granules; Puerarin; Baicalin; HPLC

小儿双解止泻颗粒是一种针对小儿急慢性腹泻的纯中药制剂,由黄芩、升麻、地锦草、葛根、车前子(盐炒)、诃子(煨)六味中药经提取精制而成,具有解表清热、去湿止泻的功效,用于小儿轮状病毒肠炎之湿热证。黄芩中所含的黄芩苷具有消炎、抗菌等药理作用^[1];葛根中所含的葛根素可升阳止泻,用于小儿因腹泻而导致的阳气不足、阴气过盛。现行药品标准^[2]中只以黄芩苷的含量为质量控制的指标成分,对其他成分含量未做要求。本文通过系列试验建立了同时测定小儿双解止泻颗粒中葛根素和黄芩苷含量的 HPLC 方法,报道如下。

1 仪器与试剂

Waters e2695 型高效液相色谱仪,2489 型双波长紫外检测器,Empower 色谱工作站,PL5124 pall 型优普超纯水制备系统,BP-211D 电子分析天平,KQ5200DB 型数控超声波清洗器,SHB-411A 型循环水式多用真空泵。葛根素对照品(批号:110752-201313)、黄芩苷对照品(批号:110715-201318)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水。小儿双解止泻颗粒(内蒙古惠丰药业有限公司,批号:131201、131002、131003)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取葛根素对照品 6.07 mg 于 10

ml 量瓶中,加流动相使溶解,并用流动相定容至刻度,摇匀,即得葛根素浓度 607 μg·ml⁻¹ 的储备液 I。精密称取黄芩苷对照品 14.40 mg 置 25 ml 量瓶中,加流动相使溶解,并用流动相定容至刻度,摇匀,即得黄芩苷浓度 576 μg·ml⁻¹ 的储备液 II。分别取储备液 I 和 II 各 2 ml 和 4 ml 至 10 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得葛根素 121.400 μg·ml⁻¹ 和黄芩苷 230.400 μg·ml⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液 取小儿双解止泻颗粒适量,研细,取约 0.1 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加流动相 50 ml,密塞,称定重量,超声处理(240 W,40 kHz) 40 min,放冷至室温,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

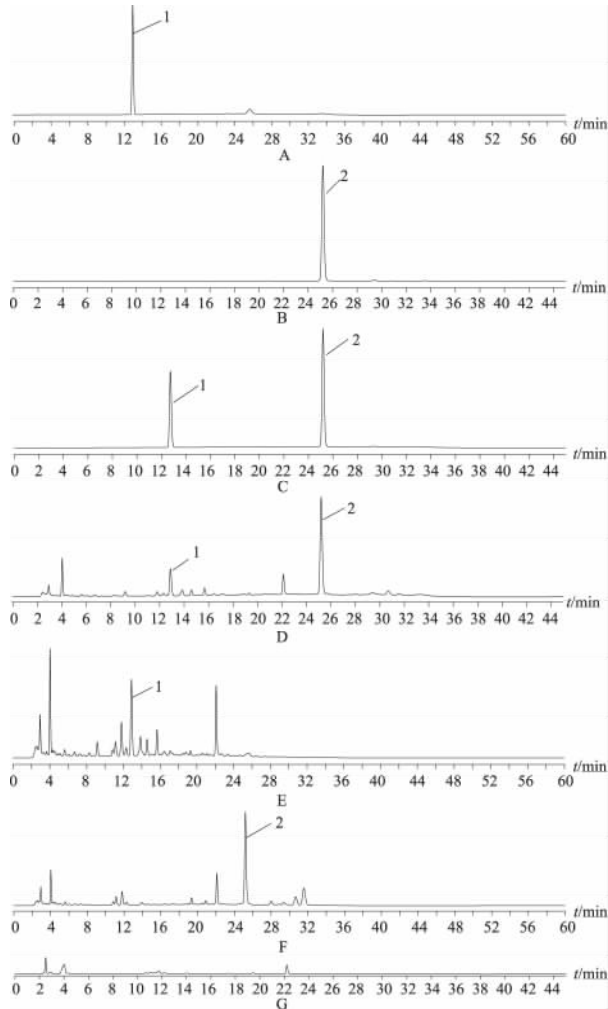
2.1.3 阴性样品溶液 按小儿双解止泻颗粒的组成处方及工艺,分别制备缺黄芩、缺葛根及同时缺黄芩和葛根的阴性样品,照“2.1.2”项下方法制得阴性样品溶液。

2.2 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.1% 磷酸为流动相,梯度洗脱,洗脱程序见表 1; 流量: 1.0 ml·min⁻¹; 检测波长: 265 nm; 柱温: 30℃; 进样体积: 20 μl。在选定的色谱条件下,测得小儿双解止泻颗粒样品、对照品和阴性样品色谱图见图 1。结果表明在此色谱条件下葛根素和黄芩苷与其他组分均能达到基线分离,样品

表1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相	
	A(0.1% 磷酸)	B(甲醇)
0	80	20
10	70	30
15	60	40
20	50	50
30	50	50
35	80	20
45	80	20



A. 葛根素对照品 B. 黄芩苷对照品 C. 葛根素和黄芩苷混合对照品 D. 小儿双解止泻颗粒样品 E. 缺黄芩阴性样品
F. 缺葛根阴性样品 G. 缺黄芩和葛根阴性样品

1. 葛根素 2. 黄芩苷

图1 HPLC 色谱图

中其他成分对葛根素及黄芩苷的测定无干扰。

2.3 线性关系考察

精密量取“2.1.1”项下的葛根素和黄芩苷混合对照品贮备液0.25、0.5、1.0、2、4 ml 分别置于5 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为系列对照品混合溶液。在上述色谱条件下分别进样20 μl ,记录峰面积,以对照品进样量(X , μg)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,计算葛根素和黄芩苷的回归方程分别为:葛根素: $Y = 3 \times 10^6 X + 8.43 \times 10^4$, $r = 0.9995$;黄芩苷: $Y = 3 \times 10^6 X + 7.83 \times 10^4$, $r = 0.9995$ 。结果表明:葛根素在0.121 ~ 1.942 μg 范围内与葛

根素峰面积呈良好的线性关系;黄芩苷在0.230 ~ 3.686 μg 范围内与黄芩苷的峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取混合对照品储备液1 ml 于5 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度(葛根素和黄芩苷的浓度分别为24.28、46.08 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$),进样20 μl ,连续进样6次,按上述色谱条件测定,记录峰面积,葛根素和黄芩苷的峰面积RSD 均为0.22% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批(批号:131201)小儿双解止泻颗粒样品6份,按照“2.1.2”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行测定,进样20 μl ,记录峰面积。葛根素和黄芩苷的平均含量分别为4.66、39.84 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为1.18%、1.93% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:131201),在配制后第0、2、4、8、12、24 h 进样测定,进样20 μl ,记录峰面积,葛根素和黄芩苷峰面积的RSD 分别为0.9%和1.2% ($n=6$)。表明供试品溶液在24 h 内稳定。

2.7 加样回收试验

精密称取已知含量的小儿双解止泻颗粒6份,每份约0.05 g,置具塞锥形瓶中,分别精密加入葛根素对照品储备液I 607 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 400 μl 和黄芩苷对照品储备液II 576 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 3.5 ml,精密加流动相46.1 ml,按“2.1.2”项下方法制备样品溶液,按上述色谱条件进行测定,计算加样回收率,葛根素和黄芩苷的加样回收率分别为98.10%、98.20%,RSD 分别为1.34%、1.11% ($n=6$)。

2.8 含量测定

取3个不同批次的样品,按“2.1.2”项下依法制备样品溶液,按上述色谱条件分别进样20 μl ,测定峰面积并计算含量,结果见表2。

表2 葛根素和黄芩苷含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

药品批号	葛根素	黄芩苷
131201	4.66	39.84
131002	4.15	38.14
131003	4.27	40.14

3 讨论

3.1 色谱柱和溶剂的选择

使用大连依利特色谱柱(填料:Hypersil BDS, C_{18} , 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 柱号:E2315273,批号:11053)和安捷伦色谱柱^[3](Zorbax SB- C_{18} 柱, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)葛根素峰都出现前延峰。由于用甲醇作溶剂葛根素在流动相中析出。溶剂改为流动相之后,峰形完全改善。

3.2 流动相的选择

流动相的比例不同,极性不同,被测物质在固定相和流动相中的溶解度不同,即 k 值不同,试验中通过调整流动相及梯度洗脱,使葛根素与黄芩苷的分离和峰形较好。

3.3 吸收波长的选择

参照《中国药典》2010年版,葛根素在250 nm 波长处有

顶空气相色谱法测定丹酚酸 B 中有机溶剂残留量

郑飞 华国栋 (北京中医药大学东方医院药学部 北京 100078)

摘要 目的: 建立丹酚酸 B 原料药中 3 种残留溶剂的测定方法。方法: 采用顶空毛细管气相色谱法测定, 色谱柱为 HP-5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 0.6 μm), 进样口温度为 180℃, 进样量为 0.1 ml, 分流比为 1:10; 柱温为 40℃ 保持 6 min, 15℃ · min⁻¹ 升温至 180℃, 保持 5 min; 检测器为 FID, 温度: 250℃; 载气: N₂, 流速: 1.7 ml · min⁻¹。二甲亚砜(DMSO) 为溶剂。结果: 各残留溶剂均可达到基线分离。各残留溶剂乙醇、丙酮和乙酸乙酯分别在 12.650 ~ 1.012 × 10³ μg · ml⁻¹ (r = 0.999 3)、12.750 ~ 1.020 × 10³ μg · ml⁻¹ (r = 0.999 7)、12.550 ~ 1.004 × 10³ μg · ml⁻¹ (r = 0.999 7) 范围内线性关系良好。乙醇、丙酮、乙酸乙酯的平均回收率分别为 96.89% (RSD = 3.81%, n = 9)、99.56% (RSD = 4.05%, n = 9)、97.21% (RSD = 4.95%, n = 9)。结论: 该法操作简便, 重复性好, 结果准确可靠, 可以用于丹酚酸 B 原料药中残留溶剂的测定。

关键词 丹酚酸 B; 有机溶剂残留; 顶空气相色谱法

中图分类号: TQ460.7⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2015)05-0865-03

Determination of Residual Organic Solvents in Salvianolic Acid B by Headspace GC

Zheng Fei, Hua Guodong (Department of Pharmacy, Dongfang Hospital of Beijing University of TCM, Beijing 100078, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method to determine the residual solvents in salvianolic acid B. **Methods:** The headspace GC was carried out on an HP-5 capillary column(30 m × 0.32 mm 0.6 μm). The inlet temperature was 180℃. The injection volume was 0.1 ml and the separation ratio was 1:10. The column temperature was programmed: the initial temperature was 40℃, maintained for 6 min, raised to 180℃ with a rate of 15℃ · min⁻¹, and maintained for another 5 min. The detector was FID with the temperature of 250℃. The carrier gas was N₂ with the flow rate of 1.7 ml · min⁻¹. DMSO was used as the solvent for salvianolic acid B. **Results:** All solvents could be separated completely. The linear range of ethanol, acetone and ethyl acetate was 12.650-1.012 × 10³ μg · ml⁻¹ (r = 0.999 3), 12.750-1.012 × 10³ μg · ml⁻¹ (r = 0.999 7) and 12.550-1.004 × 10³ μg · ml⁻¹ (r = 0.999 7), respectively. The average recovery of ethanol, acetone and ethyl acetate was 96.89% (RSD = 3.81%, n = 9), 99.56% (RSD = 4.05%, n = 9) and 97.21% (RSD = 4.95%, n = 9), respectively. **Conclusion:** The method is simple, reproducible and accurate enough for the determination of residual solvents in salvianolic acid B.

KEY WORDS Salvianolic acid B; Residual organic solvent; Headspace GC

丹酚酸 B 是唇形科植物丹参中的主要成分, 具有对心肌缺血-再灌注损伤的保护、对心脏微血管内皮细胞的延迟保护、对动脉粥样硬化及血栓防治功效、对脑缺血损伤的保护和抗衰老、抗肿瘤等多种药理活性^[1]。在制备丹酚酸 B 过程中主要使用了柱层析的方法, 并使用了多种有机溶剂, 包括乙醇、丙酮、乙酸乙酯。丹酚酸 B 具有较高的临床应用价值, 但是在使用时需要控制其有机溶剂残留量。本文参考有关文献^[2], 建立了顶空进样气相色谱法测定丹酚酸 B 中残留的乙醇、丙酮、乙酸乙酯, 现报道如下。

1 仪器与试剂

GC-2014 气相色谱仪, 配有 FID 检测器, 顶空进样器, 日本岛津公司; Mettler Toledo XS5 分析天平。丹酚酸 B (原料药, 纯度大于 98%, 批号: 20130819、20131025、20131216, 由北京康悦药业有限公司提供); 甲醇、乙醇、丙酮均为色谱纯, 乙酸乙酯、二甲亚砜为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

HP-5 弹性石英毛细管气相色谱柱 (30 m × 0.32 mm,

通讯作者: 华国栋 Tel: 13683135764 E-mail: dfyylcyx@126.com

最大吸收, 黄芩苷在 280 nm 波长处有最大吸收, 两者吸收峰差距较大。分别选用 250、260、265、277、280 nm 作为检测波长, 对供试品溶液进样分析, 250 nm 下黄芩苷峰面积响应值偏低, 277 nm、280 nm 下葛根素峰面积响应值偏低, 综合考虑, 265 nm 下葛根素与黄芩苷的峰面积响应值相对较大, 故选择检测波长为 265 nm。

3.4 小结

由于小儿双解止泻颗粒目前以内蒙古惠丰药业有限公司生产为主, 为保质保量使药物更好更有效的应用于小儿秋

季腹泻上, 建议对小儿双解止泻颗粒中葛根素和黄芩苷同时进行质量控制。

参 考 文 献

- 1 黄泰康. 常用中药成分与药理手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 1570
- 2 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准 [S]. YBZ13492005-2009Z,
- 3 黄樱华, 黄月纯, 王祝彬. 葛根骨康宁颗粒中葛根素的含量测定研究 [J]. 中国药师, 2012, 15(2): 186-188
(2014-11-05 收稿 2015-01-10 修回)