

HPLC 法测定化痰平喘片中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素 和汉黄芩素含量

孙 瑶^{1,2}, 刘洪卓^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 吉林省药品检验研究院, 吉林 长春 130000)

摘要: **目的** 建立测定化痰平喘片中黄芩含量的方法。**方法** 采用 HPLC 法, ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 280 nm。**结果** 在建立的色谱条件下对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 4 种成分进行测定, 各组间分离度良好, 各自范围内线性关系良好, 回收率分别为 96.86%、99.59%、100.01%、98.24%, 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素日内 RSD 分别为 0.81%、0.78%、0.43%、1.17%。**结论** 该方法操作简便、准确, 可用于化痰平喘片中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 4 种成分含量测定。

关键词: 化痰平喘片; 黄芩苷; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R94 **文献标志码:** A

化痰平喘片是由南沙参、百部、地龙、浮海石、暴马子皮和黄芩六味中药及化学药盐酸异丙嗪组成的复方制剂^[1]。其中南沙参、百部、地龙、浮海石、暴马子皮为水煎煮入药, 盐酸异丙嗪为直接加入, 黄芩为粉碎入药^[2]。本方法建立了黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 4 种成分的含量测定方法, 该方法操作简单, 重现性好, 阴性无干扰, 方法可行, 能够有效控制化痰平喘片中黄芩的质量。

1 仪器与材料

20AT 型高效液相色谱仪 (PDA 检测器, 日本 Shimadzu 公司), KQ-700DV 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

黄芩苷对照品 (批号: 110715-202223, 含量质量分数: 97.2%, 中国食品药品检定研究院), 汉黄芩苷对照品 (批号: 112002-201702, 含量质量分数: 98.5%, 中国食品药品检定研究院), 黄芩素对照品 (批号: 111595-201808, 含量质量分数: 97.9%, 中国食品药品检定研究院), 汉黄芩素对照品 (批号: J15GB154492, 含量质量分数: 98.0%, 上海源叶生物科技有限公司)。超纯水为自制, 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相 A, 以体积分数 0.1% 磷酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (洗脱程序见表 1); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 280 nm。理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 3,000。

收稿日期: 2025-02-22

作者简介: 孙瑶 (1991-), 女 (汉族), 吉林长春人, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事中药药剂的质量评价和标准研究, E-mail 946824798@qq.com; ***通信作者:** 刘洪卓 (1979-), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药剂学研究, E-mail liuhongzhuo@sypu.edu.cn。

Table 1 Method of gradient elution

表 1 梯度洗脱方法

| t/min | ϕ (Mobilephase A)/% | ϕ (Mobilephase B)/% |
|-------|--------------------------|--------------------------|
| 0 | 16 | 84 |
| 7 | 16 | 84 |
| 15 | 20 | 80 |
| 30 | 35 | 65 |
| 50 | 40 | 60 |
| 65 | 40 | 60 |

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量,加甲醇制成储备液,取储备液加甲醇制成每 1 mL 含黄芩苷 70 μ g、汉黄芩苷 25 μ g、黄芩素 16 μ g、汉黄芩素 5 μ g 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取重量差异项下的本品内容物,研细,取约 0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入体积分数 70%乙醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理 30 min(功率 280 W,频率 40 kHz),放冷,再称定重量,用体积分数 70%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加体积分数 70%乙醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 测定方法

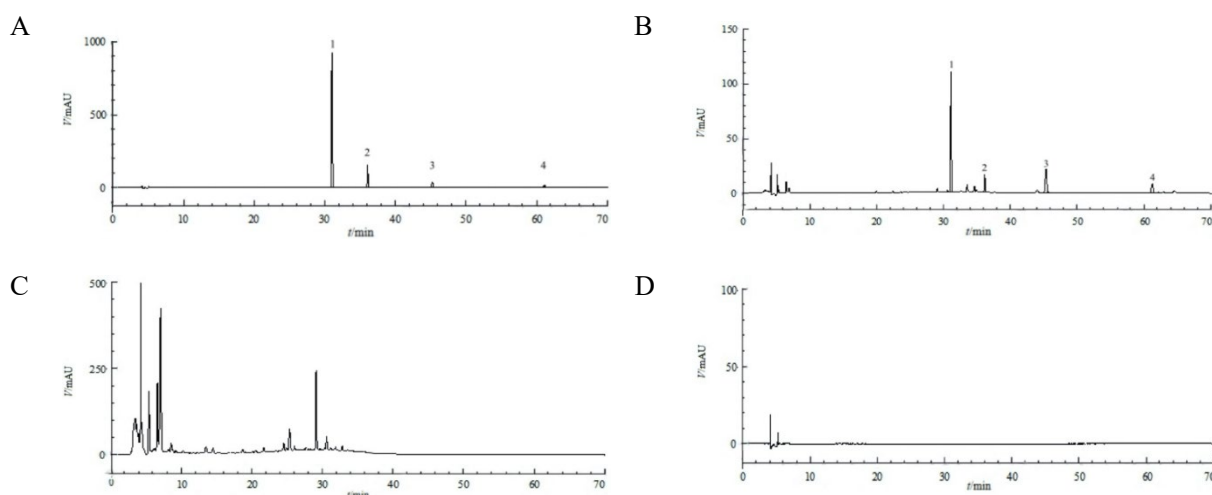
分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,测定,即得。

3 方法学考察

3.1 空白试验

按处方比例取不含黄芩的药味,同法制成阴性对照溶液。取体积分数 70%乙醇作为空白溶剂溶液。

分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液和空白溶剂溶液,注入液相色谱仪进行测定。实验结果显示,阴性对照溶液和空白溶剂溶液在与对照品溶液相应的保留时间处,无色谱峰出现,表明方中其他各味药材不干扰黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的测定。各溶液的高效液相色谱图见图 1。



1—baicalin; 2—wogonoside; 3—baicalein; 4—wogonin controls.

Figure 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample solution (B), the negative control sample (C), and blank solvent (D)

图 1 对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、阴性对照溶液(C)和空白溶剂(D)的高效液相色谱图

3.2 线性考察

精密吸取含黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的对照品混合溶液, 定量, 进样, 以对照品溶液质量浓度 (x) 为横坐标, 峰面积积分值 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程。黄芩苷: $y = 4,384x - 1,764$, $r = 0.999,9$; 汉黄芩苷: $y = 4,622x - 3,819$, $r = 0.999,9$; 黄芩素: $y = 6,000x - 1,878$, $r = 0.999,8$; 汉黄芩素: $y = 6,000x - 1,878$, $r = 0.999,9$ 。

结果表明, 黄芩苷进样量在 $8.165 \sim 163.296 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, 汉黄芩苷进样量在 $3.960 \sim 79.194 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, 黄芩素进样量在 $0.225 \sim 22.531 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, 汉黄芩素进样量在 $0.085 \sim 8.499 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。

3.3 精密度试验

对同一批供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续测定 6 次。结果表明, 仪器的精密度良好, 精密度试验结果见表 2。

Table 2 Results of precision measurement

表 2 精密度测定结果

| Analyte | Peak area | | | | | | Average peak area | RSD/% |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| Baicalin | 16,925 | 16,899 | 16,441 | 16,404 | 16,664 | 16,660 | 16,666 | 0.79 |
| Wogonoside | 31,983 | 31,959 | 31,051 | 30,933 | 31,457 | 31,446 | 31,471 | 1.39 |
| Baicalein | 15,191 | 15,184 | 14,879 | 14,866 | 15,122 | 14,970 | 15,035 | 0.99 |
| Wogonin | 81,483 | 80,928 | 77,690 | 79,450 | 80,727 | 80,893 | 80,195 | 1.75 |

3.4 稳定性试验

对同一批供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 每隔一定时间测定一次, 共考察 36 h, 测定 6 次。结果表明, 供试品溶液至少在 36 h 内稳定。稳定性试验结果见表 3。

Table 3 Results of stability test

表 3 稳定性试验结果

| Analyte | Peak area | | | | | | Average peak area | RSD/% |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------|
| | 0 h | 9 h | 20 h | 25 h | 28 h | 36 h | | |
| Baicalin | 1,637,786 | 1,639,969 | 1,661,041 | 1,645,060 | 1,644,077 | 1,670,585 | 1,649,753 | 0.79 |
| Wogonoside | 309,230 | 309,230 | 309,230 | 309,230 | 309,230 | 309,230 | 311,317 | 0.70 |
| Baicalein | 145,081 | 143,778 | 148,565 | 147,194 | 148,789 | 151,717 | 147,521 | 1.93 |
| Wogonin | 77,690 | 78,179 | 79,641 | 79,720 | 79,375 | 80,980 | 79,264 | 1.49 |

3.5 重复性试验

取同一批供试品 6 份, 按“2.3”项下方法操作, 独立测定 6 次, 测定样品中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量。结果表明, 采用高效液相色谱法测定黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量, 该方法重复性良好。重复性试验结果见表 4。

Table 4 Results of repeatability test

表4 重复性试验结果

| No. | Sample size/g | Quantity contained/(mg/tablet) | | | |
|------------------------|---------------|--------------------------------|------------|-----------|---------|
| | | Baicalin | Wogonoside | Baicalein | Wogonin |
| 1 | 0.401,9 | 46.09 | 8.69 | 3.47 | 1.21 |
| 2 | 0.402,8 | 45.62 | 8.6 | 3.44 | 1.22 |
| 3 | 0.402,8 | 45.52 | 8.58 | 3.47 | 1.22 |
| 4 | 0.402,0 | 45.29 | 8.53 | 3.47 | 1.21 |
| 5 | 0.401,6 | 45.71 | 8.61 | 3.49 | 1.23 |
| 6 | 0.402,8 | 45.59 | 8.59 | 3.45 | 1.26 |
| Content average/(mg/g) | | 45.64 | 8.6 | 3.47 | 1.23 |
| RSD/% | | 0.58 | 0.58 | 0.44 | 1.32 |

3.6 回收率试验

精密称取已知含量的供试品 0.2 g (黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量分别为 45.64、8.40、3.466 和 1.225 mg/g) 共 6 份, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入混合对照品溶液 25 mL (黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素质量浓度分别为 0.344,6、0.063,0、0.022,7 和 0.008,57 mg·mL⁻¹), 按供试品溶液制备方法操作, 依法测定, 计算回收率。加样回收率计算结果见表 5。

Table 5 Calculation results and sample recovery rates of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin

表5 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素加样回收率计算结果

| Analyte | Sample size/g | Known quantity/mg | Amount of control added/mg | Measured quantity/mg | Recovery/% | Average recovery/% | RSD/% |
|------------|---------------|-------------------|----------------------------|----------------------|------------|--------------------|-------|
| Baicalin | 0.21 | 9.47 | 8.61 | 17.78 | 96.57 | 96.86 | 0.81 |
| | 0.21 | 9.44 | 8.61 | 17.74 | 96.40 | | |
| | 0.21 | 9.42 | 8.61 | 17.78 | 97.15 | | |
| | 0.21 | 9.52 | 8.61 | 17.81 | 96.32 | | |
| | 0.20 | 9.32 | 8.61 | 17.62 | 96.39 | | |
| | 0.20 | 9.28 | 8.61 | 17.75 | 98.32 | | |
| Wogonoside | 0.21 | 1.78 | 1.58 | 3.31 | 99.60 | 99.59 | 0.78 |
| | 0.21 | 1.78 | 1.58 | 3.30 | 99.16 | | |
| | 0.21 | 1.77 | 1.58 | 3.30 | 99.38 | | |
| | 0.21 | 1.79 | 1.58 | 3.31 | 98.87 | | |
| | 0.20 | 1.76 | 1.58 | 3.28 | 99.44 | | |
| | 0.20 | 1.75 | 1.58 | 3.30 | 101.07 | | |
| Baicalein | 0.21 | 0.72 | 0.57 | 1.28 | 99.76 | 100.01 | 0.43 |
| | 0.21 | 0.72 | 0.57 | 1.29 | 100.20 | | |
| | 0.21 | 0.72 | 0.57 | 1.28 | 100.33 | | |
| | 0.21 | 0.72 | 0.57 | 1.29 | 99.29 | | |
| | 0.20 | 0.71 | 0.57 | 1.28 | 100.45 | | |
| | 0.20 | 0.70 | 0.57 | 1.27 | 100.01 | | |
| Wogonin | 0.21 | 0.25 | 0.21 | 0.46 | 97.47 | 98.24 | 1.17 |
| | 0.21 | 0.25 | 0.21 | 0.46 | 97.07 | | |
| | 0.21 | 0.25 | 0.21 | 0.46 | 98.55 | | |
| | 0.21 | 0.26 | 0.21 | 0.46 | 97.54 | | |
| | 0.20 | 0.25 | 0.21 | 0.46 | 98.63 | | |
| | 0.20 | 0.25 | 0.21 | 0.46 | 100.19 | | |

4 结果

对各企业样品进行了企业内样品批间的比较, 结果见表 6。结果表明, 9 家企业批间 RSD 介于 2.3%~38.4%; 除 L 企业批间差异较大外, 其余企业批间差异均较小。

Table 6 Total content of samples from nine enterprises and RSD

表 6 9 家企业样品含量总和批间 RSD

| No. | Manufacture | Batch | Result/(mg/tablet) | Average/(mg/tablet) | RSD/% |
|-----|-------------|-------|--------------------|---------------------|-------|
| 1 | W | 29 | 21.25 – 23.69 | 22.31 | 3.1 |
| 2 | Y | 34 | 17.35 – 21.83 | 19.07 | 5.9 |
| 3 | Z | 33 | 13.80 – 20.65 | 15.50 | 9.6 |
| 4 | L | 28 | 0.33 – 1.05 | 0.62 | 38.4 |
| 5 | H | 17 | 15.94 – 19.25 | 18.23 | 5.4 |
| 6 | D | 8 | 19.49 – 23.39 | 21.84 | 7.3 |
| 7 | A | 4 | 13.74 – 16.36 | 15.03 | 9.4 |
| 8 | X | 3 | 13.97 – 14.63 | 14.28 | 2.3 |
| 9 | F | 1 | 17.78 | 17.78 | 0.0 |

5 讨论

5.1 检测波长的选择

《中华人民共和国药典》2020 年版一部^[3]黄芩项下黄芩苷含量测定的检测波长为 280 nm; 经岛津 LC-20AT 型光谱仪测定, 在 200~400 nm 范围内进行扫描。4 种成分均在 280 nm 附近有最大吸收, 确定该方法的检测波长为 280 nm。

5.2 提取溶剂的选择

提取溶剂考察了甲醇、体积分数 70% 乙醇两种溶剂, 按拟定的含量测定方法分别制备供试品溶液。如表 7 所示, 以体积分数 70% 乙醇为提取溶剂的提取效果更好, 故选择体积分数 70% 乙醇为提取溶剂。

Table 7 Determination results of different extraction solvents (mg/tablet)

表 7 不同提取溶剂测定结果 (mg/片)

| Fluid | Methanol | | | | 70% Ethanol | | | |
|--------------------|----------|------------|-----------|---------|-------------|------------|-----------|---------|
| | Baicalin | Wogonoside | Baicalein | Wogonin | Baicalin | Wogonoside | Baicalein | Wogonin |
| Quantity contained | 15.12 | 2.56 | 0.96 | 0.26 | 17.96 | 3.32 | 1.15 | 0.42 |

5.3 提取方法的选择

对超声和回流两种提取方法进行了考察。用体积分数 70% 乙醇为溶剂, 分别采用超声及回流方式对样品提取 30 min。如表 8 所示, 两种提取方法的提取效果无明显差异, 故采用更简单方便的超声提取方法。

Table 8 Results of different extraction methods (mg/tablet)

表 8 不同提取方法测定结果 (mg/片)

| Method | Ultrasonic extraction | | | | Reflux extraction | | | |
|---------|-----------------------|------------|-----------|---------|-------------------|------------|-----------|---------|
| | Baicalin | Wogonoside | Baicalein | Wogonin | Baicalin | Wogonoside | Baicalein | Wogonin |
| Content | 17.48 | 3.33 | 1.18 | 0.45 | 17.27 | 3.40 | 1.16 | 0.43 |

5.4 提取时间的选择

对提取时间进行考察,分别超声提取 20、30、40 min。如表 9 所示,30 和 40 min 超声提取效果无明显差异,故采用超声提取 30 min。

Table 9 Measurement results of different extraction time (mg/tablet)

表 9 不同提取时间测定结果 (mg/片)

| Time | Baicalin | Wogonoside | Baicalein | Wogonin |
|-------------------|----------|------------|-----------|---------|
| Ultrasound 20 min | 16.57 | 3.02 | 1.12 | 0.36 |
| Ultrasound 30 min | 17.97 | 3.38 | 1.20 | 0.44 |
| Ultrasound 40 min | 18.02 | 3.41 | 1.18 | 0.43 |

6 结论

本研究建立了 HPLC 法测定化痰平喘片中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量的方法。色谱条件采用 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈-体积分数 0.1% 磷酸为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.8 mL·min⁻¹,检测波长为 280 nm。方法学验证结果显示,4 种成分线性关系良好($r \geq 0.999,8$),回收率为 96.86%~100.01%,RSD < 1.32%,稳定性、精密度和重复性均符合要求。优化提取条件,以体积分数 70% 乙醇超声 30 min。实际样品测定结果表明,该方法简便、准确,适用于化痰平喘片的质量控制。

参考文献:

- [1] 刘志刚,刘志武,欧伟.化痰平喘片定性定量研究[J].中南药学,2010,8(3):199-201.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂(第四册)[M].北京:中华人民共和国卫生部药典委员会,1991:37.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020:1.

Determination of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin contents in Huatan Pingchuan tablets by HPLC method

SUN Yao^{1,2}, LIU Hongzhuo^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Jilin Provincial Institute for Drug Control, Changchun 130000, China)

Abstract: Objective To establish a method for determining the content of baicalin in Huatan Pingchuan

tablets. **Methods** The HPLC method was used in a chromatographic column with ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature of 30 °C, and the detection wavelength of 280 nm. **Results** Under the established chromatographic conditions, the four components of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin were determined. The separation between the components was good, and the linear relationship within their respective ranges was good. The recovery rates were 96.86%, 99.59%, 100.01% and 98.24%, the RSD values of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin were 0.81%, 0.78%, 0.43% and 1.17%, respectively. **Conclusion** The method is simple, stable, and has good reproducibility, and can be used for the determination of the contents of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin in Huatan Pingchuan tablets.

Key words: Huatan Pingchuan tablets; baicalin; content determination; high-performance liquid chromatography