

# HPLC法测定散风解表颗粒中黄芩苷和腺苷的含量

王桂英<sup>1\*</sup>,戴学文<sup>2</sup>,王姿婧<sup>2</sup>,刘青<sup>2</sup>,房志仲<sup>2#</sup>(1.天津市中医药研究院附属医院药学部,天津 300120;2.天津医科大学药学院药剂学教研室/天津市临床药物关键技术重点实验室,天津 300070)

中图分类号 R283.627;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2951-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.26

**摘要** 目的:建立测定散风解表颗粒中黄芩苷和腺苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为TIANHE<sup>®</sup> Kromasil C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为室温,流速为0.8 ml/min,进样量为20 μl。黄芩苷测定的流动相为甲醇-水(55:45, V/V),加冰乙酸调pH值至3.10,检测波长为277 nm;腺苷测定的流动相为0.04 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-乙腈(94:6, V/V),检测波长为260 nm。结果:黄芩苷的质量浓度在70~190 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999\ 9$ );低、中、高加入量对应的平均回收率分别为101.82%、102.53%、97.40%,RSD分别为0.96%、0.50%、1.44%( $n$ 均为3)。腺苷的质量浓度在5~65 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999\ 8$ );低、中、高加入量对应的平均回收率分别为99.58%、99.36%、101.59%,RSD分别为1.23%、1.20%、1.12%( $n$ 均为3)。结论:该方法简便、准确、可靠,可作为散风解表颗粒的质量控制方法。

**关键词** 散风解表颗粒;黄芩苷;腺苷;含量测定;高效液相色谱法

## Content Determination of Baicalin and Adenosine in Sanfeng Jiebiao Granules by HPLC

WANG Gui-ying<sup>1</sup>, DAI Xue-wen<sup>2</sup>, WANG Zi-jing<sup>2</sup>, LIU Qing<sup>2</sup>, FANG Zhi-zhong<sup>2</sup>(1. Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Tianjin Academy of TCM, Tianjin 300120, China; 2. Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy, Tianjin Medical University/Tianjin Key Laboratory of Clinical Drug Key Technology, Tianjin 300070, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of baicalin and adenosine in Sanfeng jiebiao granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on TIANHE<sup>®</sup> Kromasil C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm) column at flow rate of 0.8 ml/min; the column temperature was room temperature and sample size was 20 μl. The mobile phase of baicalin was methanol-water (55:45, V/V, pH adjusted to 3.10 using glacial acetic acid), and the detection wavelength was set at 277 nm; and the mobile phase of adenosine was 0.04 mol/L monosodium phosphate-acetonitrile(94:6, V/V), and the detection wavelength was set at 260 nm. RESULTS: The linear range of baicalin were 70-190 μg/ml( $r=0.999\ 9$ ); average recoveries were 101.82% (RSD=0.96%,  $n=3$ ), 102.53% (RSD=0.50%,  $n=3$ ) and 97.40% (RSD=1.44%,  $n=3$ ) for low, medium and high concentrations. The linear range of adenosine were 5-65 μg/ml( $r=0.999\ 8$ ); average recoveries were 99.56% (RSD=1.23%,  $n=3$ ), 99.36% (RSD=1.20%,  $n=3$ ) and 101.59% (RSD=1.12%,  $n=3$ ) for low, medium and high concentrations. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and it can be used for the quality control of Sanfeng jiebiao granules.

**KEY WORDS** Sanfeng jiebiao granules; Baicalin; Adenosine; Content determination; HPLC

散风解表颗粒是由金银花、赤芍、黄芩、板蓝根、生地黄、大青叶等多味中药材经提取加工制成的纯中药制剂,为天津医科大学药学院药剂学教研室根据中医经典方剂结合临床应用经验组方研制而成。其主治功能为解表散风、清热解毒,主要用于流行性和病毒性感冒的治疗,中医上多用于透疹、风热感冒、温病发热等证的治疗<sup>[1-3]</sup>。中药及其制剂的内在质量和稳定性是中药现代化研究的关键点之一,是研制开发“安全、有效、稳定、可控”现代中药的根本保证。为了更好地控制散风解表颗粒的质量,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法对该剂中主要成分黄芩苷和腺苷进行了含量测定。

## 1 材料

### 1.1 仪器

\* 主管药师。研究方向:临床药学。E-mail:tj\_wgy@eyou.com  
# 通信作者:教授。研究方向:药物制剂与质量控制。E-mail:fangzhizhong@tjmu.edu.cn

SP8810型HPLC仪(美国Spectra-physics公司);UV2000型检测器(美国Thermo公司);Anastar色谱工作站(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ALC-210.4型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);80-2B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);pHS-25型数显pH计(上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

散风解表颗粒(天津医科大学药学院药剂学教研室自制,批号:20100901、20101101、20101201);黄芩苷、腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110715-201016、110879-200202);甲醇、乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯,水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC法测定黄芩苷的含量<sup>[4-7]</sup>

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:TIANHE<sup>®</sup>

Kromasil C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(55:45, V/V,加冰乙酸调节pH值至3.10);流速:0.8 ml/min;检测波长:277 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。在该色谱条件下,黄芩苷与样品中其他色谱峰可达基线分离,分离度>1.5;理论板数按黄芩苷峰计算应>2 500;拖尾因子为1.05。

2.1.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品10 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制得质量浓度为1 mg/ml的黄芩苷对照品贮备液。精密吸取该贮备液1.3 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容,摇匀,即得质量浓度为130 μg/ml的黄芩苷对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取适量散风解表颗粒,研细,精密称取2 g,置25 ml量瓶中,精密加入甲醇10 ml,密塞,超声提取(功率:100 W,频率:40 kHz)15 min,摇匀,2 000 r/min离心5 min,精密量取上清液5 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容,即得供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按处方工艺制备缺黄芩的阴性样品,再按“2.1.3”项下方法制得阴性对照溶液。

2.1.5 专属性试验 分别取“2.1”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各20 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芩苷的保留时间约9 min,阴性对照对测定结果无干扰。色谱见图1。

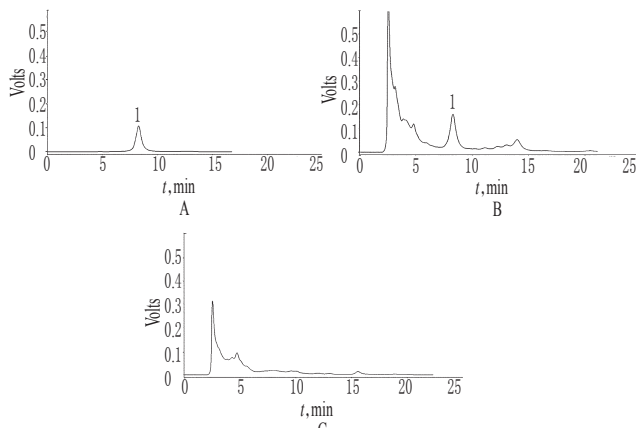


图1 黄芩苷的HPLC图

A.黄芩苷对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms of baicalin

A. baicalin control; B. tests sample; C. negative control; 1. baicalin

2.1.6 线性关系考察 分别精密量取质量浓度为1 mg/ml的黄芩苷对照品贮备液0.7、0.9、1.1、1.3、1.5、1.7、1.9 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释并定容,制备成质量浓度分别为70、90、110、130、150、170、190 μg/ml的系列对照品溶液。分别按上述色谱条件进样20 μl,记录峰面积。以峰面积积分值(A)对黄芩苷质量浓度(c)作线性回归,得黄芩苷的回归方程为 $A = 21\ 732c + 58\ 344$ ( $r = 0.999\ 9, n = 7$ )。结果表明,黄芩苷的质量浓度在70~190 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.7 精密度试验 (1)日内精密度:取黄芩苷对照品溶液(130 μg/ml)适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,进样量20 μl,记录峰面积。结果,RSD=0.82%(n=6),表明本方法日内精密度良好。(2)日间精密度:取黄芩苷对照品溶液(130 μg/ml)适量,按上述色谱条件分别于0、1、2、3、4、5 d进样测定,记录峰面积。结果,RSD=0.89%(n=6),表明本方法日间精密

度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一(批号:20100901)供试品溶液适量,按上述色谱条件分别于制备后0、3、6、9、12、24 h进样20 μl测定,记录峰面积。结果,RSD=1.89%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20100901)适量,共6份,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件各取20 μl进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.78%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品(批号:20100901)适量,共9份,每3份为一组,分别加入低、中、高质量浓度的黄芩苷对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算黄芩苷的加样回收率,结果见表1。

表1 黄芩苷的加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests of baicalin(n=9)

| 称样量,g | 样品含量,μg | 加入量,μg | 测得量,μg  | 回收率,%  | $\bar{x}$ ,% | RSD,% |
|-------|---------|--------|---------|--------|--------------|-------|
| 1.00  | 1491.93 | 1180   | 2678.29 | 100.54 |              |       |
| 1.00  | 1491.93 | 1180   | 2706.22 | 102.91 | 101.82       | 0.96  |
| 1.00  | 1491.93 | 1180   | 2695.49 | 102.00 |              |       |
| 1.00  | 1491.93 | 1480   | 2998.93 | 101.82 |              |       |
| 1.00  | 1491.93 | 1480   | 3016.99 | 103.04 | 102.53       | 0.50  |
| 1.00  | 1491.93 | 1480   | 3012.20 | 102.72 |              |       |
| 1.00  | 1491.93 | 1780   | 3231.52 | 97.73  |              |       |
| 1.00  | 1491.93 | 1780   | 3192.54 | 95.54  | 97.40        | 1.44  |
| 1.00  | 1491.93 | 1780   | 3252.88 | 98.93  |              |       |

2.1.11 样品含量测定 取3批样品,每批3份,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算黄芩苷的含量。结果,3批样品(批号:20100901、20101101、20101201)中每1 g分别含黄芩苷1491.93、1319.36、1400.60 μg,RSD分别为1.83%、1.80%、1.16%(n=3)。

## 2.2 HPLC法测定腺苷的含量<sup>[8-10]</sup>

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 流动相:0.04 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-乙腈(94:6, V/V);检测波长:260 nm;其余条件同“2.1.1”项下。在该色谱条件下,腺苷与样品中其他色谱峰可达基线分离,分离度>1.5;理论板数按腺苷峰计算应>2 500;拖尾因子为1.08。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取腺苷对照品10 mg,置于10 ml量瓶中,用90%甲醇溶解并定容,即得质量浓度为1 mg/ml的腺苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取适量散风解表颗粒,研细,精密称取1.0 g,用50%甲醇10 ml溶解并定容于25 ml量瓶中,超声提取(功率:100 W,频率:40 kHz)15 min,3 000 r/min离心5 min,取上清液5 ml,加甲醇5 ml沉淀,超声提取(功率:100 W,频率:40 kHz)5 min,摇匀,3 000 r/min离心5 min,取上清液8 ml,置于10 ml量瓶中,以流动相稀释并定容,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方工艺制备缺板蓝根和大青叶的阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 分别取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各20 μl,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定,记录峰面积。结果,腺苷的保留时间约15 min,阴性对照对测定结果无干扰。色谱见图2。

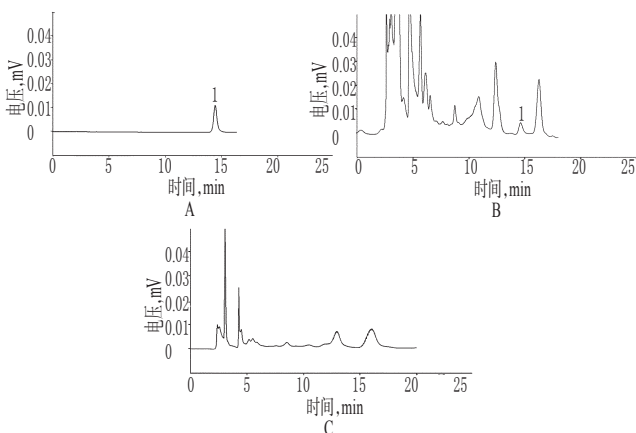


图2 腺苷的HPLC图

A.腺苷对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.腺苷

Fig 2 HPLC chromatograms of adenosine

A. adenosine control; B. test sample; C. negative control; 1. adenosine

2.2.6 线性关系考察 分别精密吸取质量浓度为1 mg/ml的腺苷对照品溶液0.05、0.15、0.25、0.35、0.45、0.55、0.65 ml,置于10 ml量瓶中,用流动相稀释并定容,制备成质量浓度分别为5、15、25、35、45、55、65  $\mu\text{g/ml}$ 的系列对照品溶液。分别按“2.2.1”项下色谱条件进样20  $\mu\text{l}$ 测定,记录峰面积。以峰面积积分值(A)对腺苷质量浓度(c)作线性回归,得腺苷的回归方程为 $A=117\ 623c-65\ 455(r=0.999\ 8, n=7)$ 。结果表明,腺苷的质量浓度在5~65  $\mu\text{g/ml}$ 范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.7 精密度的试验 (1)日内精密度:取腺苷对照品溶液(35  $\mu\text{g/ml}$ )适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,进样量20  $\mu\text{l}$ ,记录峰面积。结果, $RSD=0.69\%(n=6)$ ,表明本方法日内精密度良好。(2)日间精密度:取腺苷对照品溶液(35  $\mu\text{g/ml}$ )适量,按“2.2.1”项下色谱条件分别于0、1、2、3、4、5 d进样测定,记录峰面积。结果, $RSD=1.11\%(n=6)$ ,表明本方法日间精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一(批号:20100901)供试品溶液适量,分别于制备后0、3、6、9、12、24 h进样20  $\mu\text{l}$ ,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果, $RSD=1.12\%(n=6)$ ,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20100901)适量,共6份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.2.1”项下色谱条件各取20  $\mu\text{l}$ 进样测定,记录峰面积。结果, $RSD=1.67\%(n=6)$ ,表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批(批号:20100901)样品适量,共9份,每3份为一组,分别加入低、中、高质量浓度的腺苷对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算腺苷的加样回收率,结果见表2。

2.2.11 样品含量测定 取3批样品,每批3份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算腺苷的含量。结果,3批样品(批号:20100901、20101101、20101201)中每1 g分别含腺苷381.41、374.78、399.04  $\mu\text{g}$ , $RSD$ 分别为1.61%、1.79%、1.54%( $n=3$ )。

### 3 讨论

笔者参考文献报道<sup>[11]</sup>和2010年版《中国药典》(一部)规

表2 腺苷的加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 2 Results of recovery tests of adenosine( $n=9$ )

| 称量,g | 样品含量, $\mu\text{g}$ | 加入量, $\mu\text{g}$ | 测得量, $\mu\text{g}$ | 回收率,%  | $\bar{x}$ ,% | RSD,% |
|------|---------------------|--------------------|--------------------|--------|--------------|-------|
| 1.00 | 385.08              | 320                | 700.98             | 98.72  |              |       |
| 1.00 | 385.08              | 320                | 709.27             | 101.31 | 99.58        | 1.23  |
| 1.00 | 385.08              | 320                | 700.95             | 98.71  |              |       |
| 1.00 | 385.08              | 400                | 777.68             | 98.15  |              |       |
| 1.00 | 385.08              | 400                | 789.00             | 100.98 | 99.36        | 1.20  |
| 1.00 | 385.08              | 400                | 780.92             | 98.96  |              |       |
| 1.00 | 385.08              | 480                | 874.58             | 101.98 |              |       |
| 1.00 | 385.08              | 480                | 878.23             | 102.74 | 101.59       | 1.12  |
| 1.00 | 385.08              | 480                | 865.27             | 100.04 |              |       |

定<sup>[12]</sup>,选择黄芩苷测定的流动相为甲醇-冰乙酸-水(45:0.2:55,  $V/V/V$ )<sup>[11-12]</sup>,pH为3.43,流速为0.6 ml/min,发现黄芩苷的出峰时间为21.707 min,出峰时间较晚,且峰形不对称;后经调整流动相比为甲醇-水(55:45,  $V/V$ ),加冰乙酸调节pH值至3.10),流速为0.8 ml/min,可得黄芩苷的出峰时间为8.376 min,且峰形对称,阴性对照无干扰。

笔者参考文献报道<sup>[11,13]</sup>和2010年版《中国药典》(一部)规定<sup>[12]</sup>,选择腺苷测定的流动相为水-甲醇(90:10,  $V/V$ ),流速为0.8 ml/min,发现腺苷的峰形不对称;后经调节流动相比为0.04 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -乙腈(94:6,  $V/V$ ),可得腺苷的色谱峰峰形对称,且阴性对照无干扰。

综上所述,本方法简便、准确、可靠,可作为散风解表颗粒的质量控制方法。

### 参考文献

- [1] 刘英学,刘中刚,苏兰,等.黄芩化学成分研究[J].中国药物化学杂志,2009,19(1):59.
- [2] 杨忻,孟庆刚.黄芩解热化学成分评述[J].中华中医药学刊,2009,27(6):1 183.
- [3] 彭爱红.板蓝根药理活性成分及临床应用进展[J].中国当代医药,2010,17(12):13.
- [4] 张凤琴,龚伟,曲雷鸣.儿童抗感颗粒的质量研究[J].中华中医药学刊,2010,28(2):421.
- [5] 杨小月.HPLC法测定少阳感冒颗粒中黄芩苷的含量[J].中国药师,2010,13(2):228.
- [6] 魏萍,黄旭腾.止咳颗粒中黄芩苷的含量测定[J].世界中西医结合杂志,2010,5(8):679.
- [7] 聂继红,王萍,孙蕾,等.黄芩中黄芩苷提取工艺的研究[J].中国药房,2005,16(14):1 051.
- [8] 蒋丽蓉,林金瑞.HPLC法测定复方板蓝根颗粒中腺苷的含量[J].海峡药学,2009,21(6):77.
- [9] 丁越,张彤,陶建生.板蓝根药材中有效成分的含量测定研究[J].中成药,2008,30(11):1 697.
- [10] 杨振新,周燕双,廖晓嘉.板蓝根浸膏中腺苷含量测定分析[J].中国现代药物应用,2009,3(3):13.
- [11] 赵玉佳,孟祥丽,鞠宝玲. HPLC测定双黄连口服液黄芩苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(4):90.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:282,681.
- [13] 李霞,陈安家,李春.板蓝根水溶性化学成分的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):64.

(收稿日期:2013-04-09 修回日期:2013-06-17)