

HPLC法测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质的含量^Δ

沈 蒙*,段天璇#,林宏英,孙毅坤,于继平(北京中医药大学,北京 100102)

中图分类号 R283;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3694-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.15

摘要 目的:建立测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质含量的方法。方法:以高效液相色谱法测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的含量,并以不加校正因子的主成分自身对照法计算总杂质的含量。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为274 nm。结果:黄芩苷、千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的质量浓度分别在50.00~300.00、0.21~6.57、0.16~0.80 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 9、0.999 3、0.999 3);平均加样回收率分别为99.16%、100.69%、99.18%,RSD分别为1.2%、2.4%、4.6%(n 均为9)。黄芩苷与有关物质分离良好,千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷与汉黄芩苷的检出限分别为0.43、0.64 ng。结论:该方法专属性强,结果准确、可靠,可用于注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;注射用黄芩苷原料;有关物质;含量测定

Content Determination of Baicalin and Its Related Substances in Baicalin for Injection by HPLC

SHEN Meng, DUAN Tian-xuan, LIN Hong-ying, SUN Yi-kun, YU Ji-ping (Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of baicalin and related substances in Baicalin for injection. METHODS: The contents of baicalin and related substance, such as oroxylin A 7-O-glucuronide, wogonoside, were determined by HPLC. The contents of the total impurities were computed by main constituent self-control method without calibration factor. The separation was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 274 nm. RESULTS: The linear ranges of baicalin, oroxylin A 7-O-glucuronide and wogonoside were 50.00-300.00 μg/ml($r=0.999 9$), 0.21-6.57 μg/ml($r=0.999 3$) and 0.16-0.80 μg/ml($r=0.999 3$). Average recovery rates were 99.16% (RSD=1.2%, $n=9$), 100.69% (RSD=2.4%, $n=9$) and 99.18% (RSD=4.6%, $n=9$). Baicalin was separated from related substance well. The detection limits of oroxylin A 7-O-glucuronide and wogonoside were 0.43, 0.64 ng. CONCLUSIONS: The method is specific, accurate and reliable, and it can be used for the content determination of baicalin and related substance in baicalin for injection.

KEY WORDS HPLC; Baicalin for injection; Related substance; Content determination

面积醋制后增加。

3 讨论

本试验采用的是10批不同产地的京大戟和醋京大戟样品,可得两种样品中分别有11个共有峰,并且京大戟和醋京大戟之间有8个共有峰;京大戟炮制前后色谱图基本一致,说明京大戟和醋京大戟中群体成分较一致,醋制对京大戟化学成分有一定的影响,但影响不大。

本试验以京大戟所含成分大戟二烯醇作为参照物,建立了京大戟和醋京大戟HPLC指纹图谱检测标准。该方法操作简便、重复性好,为有效地控制京大戟和醋京大戟的内在质量提供了科学依据,并且可比较京大戟醋制前后化学成分的变化,为京大戟醋制解毒机制研究奠定了基础。

京大戟醋制后极性相对较大的成分含量有所降低,极性

相对较小的成分如三萜类的大戟二烯醇峰面积增加,说明京大戟醋制过程中,在酸性和加热条件下,大戟二烯醇立体结构发生了变化,极性改变,易于溶出。文献报道大戟二烯醇为京大戟的药效成分^[4],醋制后大戟二烯醇的含量增加,推断与京大戟醋制后毒性药效作用的变化相关。

参考文献

- [1] 张乐林.京大戟炮制原理初步研究[D].济南:山东中医药大学,2011.
- [2] 苏本正,周倩,孙立立.甘草饮片乙酸乙酯提取部位HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(2):203.
- [3] 傅勇,肖武,李达,等.远志与厚朴不同配比水煎液的HPLC指纹图谱比较研究[J].中国药房,2012,23(43):4 072.
- [4] Akihisa T, Kithsiri WEM, Tokuda H, et al. Eupha- 7, 9 (11), 24-trien-3β-ol. ("AntiquolC") and other triterpenes from euphorbia antiquorum latex and their inhibitory effects on epstein-barr virus activation[J]. J Nat Prod, 2002, 65(2), 158.

(收稿日期:2012-10-16 修回日期:2013-01-18)

^Δ 基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项课题(No. 2010ZX09102)

* 硕士研究生。研究方向:中药分析。E-mail:shme44@sohu.com

通信作者:副教授,硕士研究生导师,硕士。研究方向:中药分析。电话:010-84738618。E-mail:duantx@sina.com

黄芩苷是从唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根中提取分离出来的一种黄酮类化合物。药理研究表明,黄芩苷具有多方面的生物活性,如:抑菌、利尿、解痉、抗炎、抗变态及较强的抗癌作用。黄芩苷是《中国药典》规定的黄芩及多种中药制剂的主要质量控制指标成分,也是清开灵、双黄连、茵栀黄等中药注射剂的重要原料药之一^[1]。在国家药品标准《化学药品地方标准上升国家标准》中规定了药品中黄芩苷的质量分数:注射用不得少于90.0%;口服用不得少于83.0%^[2],说明其中还存在近10%~17%的有关物质,这也体现出中药提取物作为原料药和化学原料药的不同之处。关于中药制剂有关物质的研究报道较少,为规范黄芩苷原料药的生产与使用,提高其相关制剂的安全性和有效性,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质,以外标法计算其主要成分黄芩苷与杂质中千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的质量分数,以不加校正因子的主成分自身对照法^[3]计算总杂质的质量分数。

1 材料

1.1 仪器

AE240S型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);LC-20A型HPLC仪,含LC-20AT型泵、DGU-20A5型脱气机、SIL-20A型自动进样器、SPD-20A型检测器、CTO-10ASvp型柱温箱、LC Solution色谱工作站(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

注射用黄芩苷原料(山东鲁抗医药股份有限公司,批号:B2-12-04-01、B2-12-04-02、B2-12-04-03、B2-12-04-04、B2-12-04-05);黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201016);汉黄芩苷对照品(上海融禾医药科技有限公司,纯度>98%);千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷对照品(上海永恒生物科技有限公司,纯度>98%);甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果^[4]

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱(0~20 min,43%→46% A; >20~40 min,46%→80% A; >40~45 min,80%→100% A; >45~50 min,100%→43% A; >50~60 min,43% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:274 nm;柱温:30℃;进样量:10 μl。

2.2 破坏性试验

取注射用黄芩苷原料样品适量,加50%甲醇溶解并稀释,制成质量浓度约为100 μg/ml的溶液,作为破坏前样品溶液。取该溶液2 ml,分别加入1 mol/L盐酸20 μl、0.05 mol/L NaOH 10 μl、30%过氧化氢20 μl,摇匀,避光放置2 h,滤过,待用。再取破坏前样品溶液2 ml,分别于4 500 lx的强光下照射24 h、60℃烘箱中加热24 h,滤过,待用。取破坏前样品溶液、黄芩苷对照品溶液及各加速条件破坏后的样品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。结果显示,样品在各种破坏条件下发生不同程度的降解。其中,高温破

坏最为严重,产生的杂质峰最多。另外,在上述色谱条件下,主峰与杂质峰均获得了良好分离,表明本方法专属性良好。

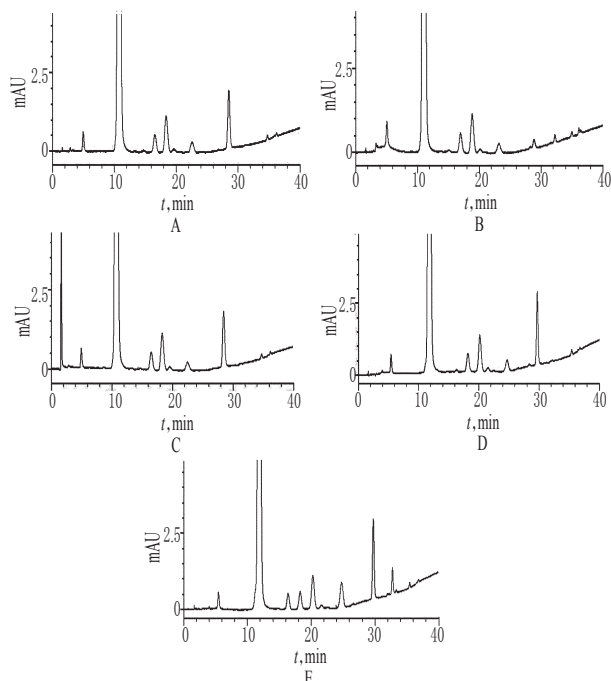


图1 各加速破坏样品的HPLC图

A. 酸破坏;B. 碱破坏;C. 氧化破坏;D. 光破坏;E. 热破坏

Fig 1 HPLC chromatograms of various destroyed samples

A. destroyed by acid; B. destroyed by alkali; C. destroyed by oxidation; D. destroyed by high light; E. destroyed by heat

2.3 杂质峰鉴别

取注射用黄芩苷原料样品与黄芩苷、千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷对照品各适量,用75%甲醇溶解并稀释,制备成质量浓度约为100 μg/ml的溶液,分别作为样品溶液和各对照品溶液。取各溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样10 μl,记录色谱图(图2)。

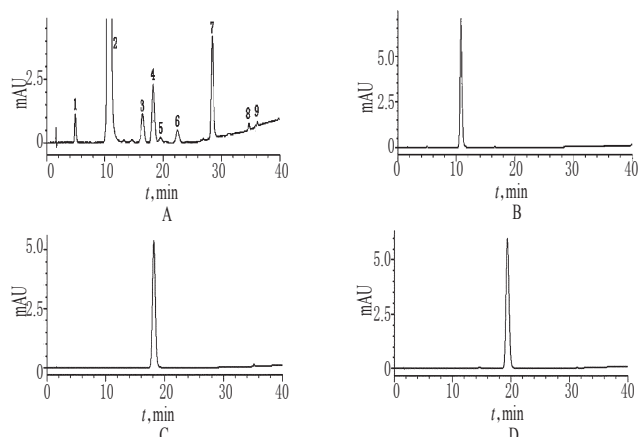


图2 黄芩苷原料样品与各对照品的HPLC图

A. 黄芩苷原料;B. 黄芩苷对照品;C. 千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷对照品;D. 汉黄芩苷对照品

Fig 2 HPLC chromatograms of baicalin sample and substance control

A. baicalin sample; B. baicalin control; C. oroxylin A 7-O-glucuronide control; D. wogonoside control

由图2可知,注射用黄芩苷原料样品中主要色谱峰(图2A中的2号色谱峰)与黄芩苷对照品(图2B)的保留时间基本相同,杂质峰(图2A中的4、5号色谱峰)的保留时间分别与千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷(图2C)、汉黄芩苷(图2D)对照品的保留时间基本相同,说明注射用黄芩苷原料样品色谱图中2号峰为黄芩苷;4号峰为千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷;5号峰为汉黄芩苷;1、3、6、7、8、9号峰为其他待定化合物。在用不加校正因子的主成分自身对照法计算样品中有关物质时,将1、3、4、5、6、7、8、9号峰均计入杂质峰峰面积总和。

2.4 溶液的制备

2.4.1 供试品溶液的制备 称取注射用黄芩苷原料样品约5.0 mg,用50%甲醇溶解并定容至50 ml量瓶中,作为供试品溶液。

2.4.2 对照品溶液的制备 (1)黄芩苷对照品溶液:准确称取黄芩苷对照品适量,加70%甲醇溶解并稀释,制成质量浓度约为100 μg/ml的黄芩苷对照品溶液。(2)有关物质混合对照品溶液:准确称取千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷对照品和汉黄芩苷对照品各适量,加70%甲醇溶解并稀释,制成质量浓度分别约为100 μg/ml的有关物质混合对照品溶液。

2.4.3 1%对照溶液的制备 精密量取“2.4.1”项下供试品溶液0.5 ml,置50 ml量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为1%对照溶液。

2.5 有关物质测定方法

取供试品溶液和对照品溶液各20 μl,按上述色谱条件注入HPLC仪,记录色谱图至主成分保留时间的4倍,以供试品溶液色谱图中各杂质峰峰面积、所有杂质峰峰面积总和分别与1%对照溶液中黄芩苷色谱峰的峰面积比较,计算有关物质的质量分数。

2.6 检测限与定量限测定

将千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷与汉黄芩苷的混合对照品溶液逐级稀释后按上述色谱条件进样测定,将3:1信噪比作检测限,10:1信噪比作定量限。结果可得,千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷的检测限为0.43 ng,定量限为1.68 ng;汉黄芩苷的检测限为0.64 ng,定量限为1.60 ng。

2.7 线性关系考察

2.7.1 黄芩苷的线性关系考察 分别取黄芩苷对照品溶液5、10、15、20、25、30 μl,按上述色谱条件注入HPLC仪测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)对质量浓度(x, μg/ml)进行线性回归,得回归方程为 $y=34\ 241x-42\ 184$ ($r=0.999\ 9, n=6$)。结果表明,黄芩苷的质量浓度在50.00~300.00 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.7.2 千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷的线性关系考察 取混合对照品溶液适量,用50%甲醇稀释成质量浓度分别为0.21、1.27、2.33、3.39、4.45、5.51、6.57 μg/ml的系列溶液,按上述色谱条件各进样10 μl,记录峰面积。以峰面积积分值(y)对质量浓度(x, μg/ml)进行线性回归,得回归方程为 $y=36\ 082x-3\ 390.2$ ($r=0.999\ 3, n=7$)。结果表明,千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷的

质量浓度在0.21~6.57 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.7.3 汉黄芩苷的线性关系考察 取混合对照品溶液适量,用50%甲醇稀释成质量浓度分别为0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 μg/ml的系列溶液,按上述色谱条件各进样10 μl,记录峰面积。以峰面积积分值(y)对质量浓度(x, μg/ml)进行线性回归,得回归方程为 $y=42\ 799x-1\ 049.5$ ($r=0.999\ 3, n=5$)。结果表明,汉黄芩苷的质量浓度在0.16~0.80 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.8 精密度的试验

2.8.1 黄芩苷的精密度的试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,RSD=1.3%($n=6$),表明仪器精密度的良好。

2.8.2 千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的精密度的试验 取混合对照品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的RSD分别为2.1%、2.7%(n 均为6),表明仪器精密度的良好。

2.9 重复性的试验

取同一批样品6份,每份约5.0 mg,精密称定,分别按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件分别进样测定,记录峰面积。结果显示,黄芩苷、千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的RSD分别为0.8%、1.4%、2.8%(n 均为6),表明本方法重复性的良好。

2.10 稳定性的试验

取同一份供试品溶液适量,按上述色谱条件分别于0、2、6、8、10 h进样测定,记录峰面积。结果显示,黄芩苷、千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷的RSD分别为0.5%、2.1%、4.3%(n 均为5),表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.11 加样回收率的试验

2.11.1 黄芩苷的加样回收率的试验 取同一批次样品5.0 mg,精密称定,用50%甲醇溶解并制备成质量浓度约100 μg/ml的溶液。取该溶液10 ml,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各适量,按“2.4.1”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,计算加样回收率,结果见表1。

表1 黄芩苷的加样回收率的试验结果($n=9$)

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

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率	$\bar{x}/\%$	RSD/%
920	501	1408	97.41		
920	501	1418	99.40		
920	501	1415	98.80		
920	1002	1923	100.10		
920	1002	1916	99.40	99.16	1.2
920	1002	1897	97.50		
920	1503	2404	98.74		
920	1503	2429	100.40		
920	1503	2434	100.73		

2.11.2 千层纸素A-7-O-葡萄糖醛酸苷与汉黄芩苷的加样回收率的试验 取同一批次样品5.0 mg,精密称定,用50%甲醇溶解并

制备成黄芩苷质量浓度约100 μg/ml的溶液。取该溶液25 ml,共9份,每3份为一组,分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液各适量,按“2.4.1”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,计算回收率,结果分别见表2和表3。

表2 千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷的加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests of oroxylin A 7-O-glucuronide(n=9)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率	$\bar{x}/\%$	RSD/%
54.90	29.10	85.10	103.78		
54.90	29.10	84.45	101.55		
54.90	29.10	85.35	104.64		
54.90	58.25	113.70	100.94		
54.90	58.25	113.67	100.90	100.69	2.4
54.90	58.25	112.60	99.10		
54.90	87.35	139.94	97.36		
54.90	87.35	141.85	99.54		
54.90	87.35	140.85	98.40		

表3 汉黄芩苷的回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests of wogonoside(n=9)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率	$\bar{x}/\%$	RSD/%
12.80	4.004	16.58	94.41		
12.80	4.004	16.54	93.41		
12.80	4.004	16.73	98.15		
12.80	8.008	21.09	103.52		
12.80	8.008	20.44	95.40	99.18	4.6
12.80	8.008	20.71	98.78		
12.80	12.010	25.61	106.66		
12.80	12.010	24.63	98.50		
12.80	12.010	25.27	103.83		

2.12 样品含量测定

取5批注射用黄芩苷原料样品,按“2.4”项下方法分别制备供试品溶液及1%对照溶液,照“2.5”项下方法操作,测定样品中黄芩苷及其有关物质的质量分数,每批平行操作3次,取平均值,结果见表4。

表4 样品中黄芩苷及其有关物质的含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of baicalin and related substances in samples(n=3)

批号	黄芩苷, %	千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷, %	汉黄芩苷, %	供试品溶液杂质峰面积总和与1%对照溶液主成分峰面积比值
B2-12-04-01	92.59	2.29	0.552	8.49
B2-12-04-02	93.72	2.18	0.501	9.03
B2-12-04-03	92.40	2.16	0.480	8.81
B2-12-04-04	89.21	2.07	0.451	8.70
B2-12-04-05	92.03	2.22	0.519	8.75

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取黄芩苷、千层纸素A-7-O葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷对照品及注射用黄芩苷原料样品各适量,用流动相制备对应的溶液。取4种溶液于200~800 nm波长范围内进行紫外扫描。结果显示,各对照品溶液均在274 nm波长处有较大吸收,而注射用黄芩苷原料样品溶液在274 nm以外波长处并无更多杂质峰出现,故检测波长选定为274 nm。另外,用二极管阵列检测器检测各溶液,得到的吸收光谱也证实了黄芩苷及其各杂质成分在274 nm波长处均有最大吸收或较强吸收。

3.2 流动相的选择

参照相关文献^[9],本试验选用甲醇-0.1%磷酸水溶液作流动相梯度洗脱,结果显示各成分保留时间适宜,主要成分峰形良好,黄芩苷峰及其有关物质各色谱峰的分离度均满足要求。

3.3 其他

在加速破坏试验中,分别取1 mol/L和0.5 mol/L的NaOH 10 μl加至2 ml注射用黄芩苷原料样品溶液中,黄芩苷立刻分解或变性,主成分色谱峰消失,失去了加速破坏试验的意义。故选择较温和的加碱破坏试验条件,即取0.05 mol/L的NaOH加至样品溶液中。

样品中汉黄芩苷的质量分数很低,致使本试验中汉黄芩苷重复性、精密度、稳定性及加样回收率试验的RSD>2%,但仍符合微量试验对方法学的要求。

与化学原料药相比,注射用黄芩苷原料中同源杂质种类多、含量高,针对这种情况,笔者对其中的部分杂质建立了定量分析法,对提高中药原料及其注射剂的质量标准有一定意义。本试验只对注射用黄芩苷原料有关物质中的A-7-O葡萄糖醛酸苷和汉黄芩苷进行了指认和含量测定,有关物质中的其他杂质将进一步进行研究分析。

综上,本方法专属性强,灵敏度高,结果准确、可靠,可用于注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质的含量测定。

参考文献

- [1] 聂鑫,罗佳波,吕本强,等.高效液相色谱法定量分析黄芩苷粗品中4种黄酮类成分[J].中国医院药学杂志,2007,27(2):191.
- [2] 国家药典委员会.国家药品标准《化学药品地方标准上升国家标准》:第十册[S].2002:239.
- [3] 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:附录38.
- [4] 黄丽霞,贾晓斌,陈彦,等.HPLC法测定不同产地夏枯草中熊果酸的含量[J].中国药房,2008,19(12):910.
- [5] 王丹,蒋亚杰,梁艳,等.黄芩不同规格与化学成分及内在质量相关性的研究[J].中国中药杂志,2012,37(4):426.

(收稿日期:2012-12-07 修回日期:2013-03-18)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅