

HPLC法测定银叶抗毒颗粒中黄芩苷的含量

李 涛,王天志*

(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

银叶抗毒颗粒由黄芩、金银花、大青叶、鱼腥草、青蒿等 9 味中药组成。黄芩为方中主药之一,黄芩苷是黄芩的主要有效成分之一,是黄芩及其制剂的主要质量控制指标。目前,中药复方制剂中黄芩苷的含量测定方法已有报道,主要有紫外分光光度法^[1]、薄层色谱-紫外分光光度法^[2]、聚酰胺薄膜紫外检测法^[3]、薄层扫描法^[4]、HPLC法^[5]等。本实验建立了用高效液相色谱法测定该制剂中黄芩苷的含量方法,该法准确、灵敏、简便、快速、重现性好,为该制剂的质量控制提供了快速、准确的测定方法。

1 仪器和试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪,SPD-10A 型紫外可见光检测器,CTO-10A 型柱恒温箱,C-R7Ae 数据处理机,保护柱自填国产 YWG C₁₈ (10 mm×4.6 mm, 5 μm),超声清洗器(上海船舶电子设备研究所)。

黄芩苷对照品购自中国药品生物制品检定所,批号 715-9909(供含量测定用);甲醇、磷酸二氢钾为分析纯。银叶抗毒颗粒(自制):批号 000901、000902、000903 共 3 批。

2 方法和结果

2.1 色谱分离条件:色谱柱:Shim-pack ODS 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾(36:64),检测波长:276 nm;柱温:50℃;流速:1 mL/min。在此条件下样品中的黄芩苷与其他相关峰均能达到基线分离。色谱图见图 1。

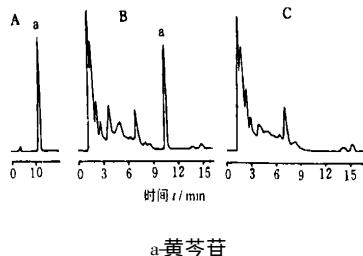


图 1 黄芩苷对照品(A)、银叶抗毒颗粒(B)和缺黄芩阴性样品(C)的 HPLC 图谱

2.2 供试品溶液及对照品溶液制备:取 60℃真空

干燥 6 h 的黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解成黄芩苷对照品溶液 I (0.1 mg/mL);精密移取对照品溶液 I 4 mL 稀释至 10 mL 容量瓶中,得对照品溶液 II (0.04 mg/mL)。精密称取本品粉末约 100 mg,置三角瓶中,加甲醇约 30 mL,超声振荡提取 30 min,滤过,滤液转移至 50 mL 容量瓶中,用约 20 mL 甲醇洗涤沉淀和滤纸,洗液并入滤液,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。仿此法制得缺黄芩的阴性对照液。

2.3 线性关系考察:分别取上述黄芩苷对照品溶液 II 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL,以甲醇稀释定容至 10 mL 的容量瓶中,分别吸取 10 μL,进行分析测定。以对照品峰面积值为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,回归方程: $Y = -50379.65 + 6245224.49X$, $r = 0.9998$ 。黄芩苷在 100~1000 ng 进样量与平均峰面积之间呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验:精密吸取上述对照品溶液 II,重复进样 6 次,每次 10 μL,测得黄芩苷对照品峰面积的 $RSD = 1.47\%$ 。

2.5 稳定性试验:取本品同一供试品溶液 1 份,每 2 h 进样 10 μL,依法测定黄芩苷峰面积值,结果其 $RSD = 1.92\%$ ($n = 12$)。可见,供试品溶液在 22 h 内稳定。

2.6 重现性试验:取同一样品(批号 000902)粉末 5 份,分别按供试液制备方法制备,进样分析,样品中黄芩苷的含量的 $RSD = 1.23\%$ ($n = 5$)。可见,其黄芩苷含量基本一致,表明本法重现性良好。

2.7 加样回收率试验:精密称取黄芩苷对照品 0.031 g,加甲醇溶解定容至 50 mL,备用。另精密称取已知黄芩苷含量的样品(批号 000901,黄芩苷含量 12.9 mg/g)粉末(过 60 目)9 份,每份约 100 mg,分别加入一定量的对照品溶液,按供试液的制备方法处理后,测定黄芩苷的含量,计算回收率,结果平均回收率为 99.47%, $RSD = 0.99\%$ ($n = 9$)。

2.8 样品含量测定:分别称取不同批号样品粉末(过 60 目筛),分别按供试液制备方法制备,分别精

密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μ L,进样分析,计算样品中黄芩苷的含量,结果见表 1

表 1 银叶抗毒颗粒中黄芩苷的含量测定 ($n=3$)

批 号	黄芩苷含量 (mg/g)	RSD (%)
000901	12.9	1.06
000902	12.3	1.67
000903	11.7	1.96

3 讨论

3.1 经比较甲醇-3%醋酸 (37:63)^[5], 0.02 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇 (50:50)^[6]等多组分不同比例流动相的分离效果,并比较在柱温 35 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C时,以不同比例的甲醇-0.02 mol/L磷酸二氢钾作为流动相,发现在 35 $^{\circ}$ C时,要使黄芩苷与杂质的分离度达到 1.5以上,其保留时间较长 (20.62 min),且黄芩苷峰稍有拖尾。当把柱温升高到 50 $^{\circ}$ C时,保留时间合适,且峰形对称而尖锐。结果表明本文所选色谱系

统具有分离效果好,出峰时间短的优点,且分析操作简便,结果准确。

3.2 采用 HPLC法测定银叶抗毒颗粒中黄芩苷的含量,方法简便、准确、快速、灵敏、重现性好,可作为该样品的含量控制方法

参考文献:

- [1] 陆蕴茹,邵爱新,熊风莲.三黄片含量测定方法研究[J].药物分析杂志,1983,3(5): 302-305.
- [2] 王玉,于如霞,杨青华,等.三黄片中有效成分的薄层色谱测定[J].中国药科大学学报,1987,18(1): 26-28.
- [3] 郭贵强,刘令勉,滕小平,等.黄芩苷及其制剂中含量测定法[J].中成药研究,1985(12): 13-14.
- [4] 李学斌,秦伟华.黄芩及双黄连注射剂中黄芩苷含量测定[J].中成药,1992,14(8): 16-17.
- [5] 闵庆旺,张振清,阮金秀,等.鼻炎康片中黄芩苷的 HPLC定量法[J].药物分析杂志,1991,11(6): 358-359.
- [6] 王强,张晓平.中药复方制剂感冒安中黄芩苷、绿原酸的高效液相色谱测定[J].中草药,1989,20(8): 15-16.

HPLC法测定复方双花喷雾泡腾片中绿原酸的含量

汤明辉¹,黎秀盛¹,杨生^{2*}

(1. 中国药科大学 中药制剂教研室,江苏 南京 210009; 2. 麒麟鲲鹏生物药业有限公司,上海 200020)

疱疹病目前临床上主要选用无环鸟苷类药物进行治疗,其作用明确,但止痛效果欠佳,有些患者服用后还出现头痛、恶心、腹泻、疲倦等不良反应

本方根据中医药理论,遵循“外科之证,最重外治”的指导原则,以金银花为主药,佐以冰片等药味,制成复方双花喷雾泡腾片,经体外细胞毒试验和体内对 VZV (水痘-带状疱疹病毒)和 HSV-I, HSV-II (人类疱疹病毒)的抑制试验证实,本品起效迅速,抗疱疹作用强,且对疹后神经痛镇痛效果好。本实验以绿原酸为指标成分,建立 HPLC法测定成品中绿原酸的含量

1 实验材料

1.1 试剂与药品:乙腈(色谱纯, Fisher USA),甲醇(色谱纯,淮阴汉邦科技有限公司),纯净水(乐百氏纯净水公司);冰醋酸(分析纯,南京化学试剂厂);复方双花喷雾泡腾片(本室自制);绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0875-9910)。

1.2 仪器:HP-1100高效液相色谱仪(配有紫外检测器,惠普公司);HT130型柱温箱(淮阴汉邦科技

有限公司);微量进样器(上海安宁微量进样器厂);微量分析天平(上海天平仪器厂)

2 方法与结果

2.1 指标成分选择:金银花为本方主药,其所含成分绿原酸抗菌谱较广,并有抗病毒活性,在体内能被蛋白质灭活。幼龄大鼠口服绿原酸 LD₅₀> 1 g/kg,腹腔注射 LD₅₀> 0.25 g/kg^[1]。因此选择绿原酸为指标成分。

2.2 色谱条件:色谱柱:Shim-pack CLC-ODS柱(6 mm $\times$ 150 mm);流动相:乙腈-1.6%醋酸溶液(9:91);柱温:室温;流速:0.5 mL/min;检测波长:327 nm。该波长下绿原酸在流动相中有最大吸收(图 1)。按绿原酸峰计算,理论塔板数为 7 400。色谱图见图 2。

2.3 线性关系考察:精密称取绿原酸对照品 1 mg,置 10 mL量瓶中,加 50%甲醇使溶解,稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液,依次进样,记录峰面积。以绿原酸峰面积(Y)对绿原酸量(X)进行回归,得回归方程 $Y = -4\,977.82 + 275\,285X$ ($r = 0.999\,9$),其线性范