

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,但止疼效果欠佳,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 $LD_{50}>1\text{ g/kg}$, 腹腔注射 $LD_{50}>0.25\text{ g/kg}$ ^[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

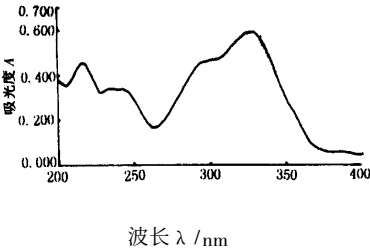


图 1 绿原酸紫外光谱扫描图谱

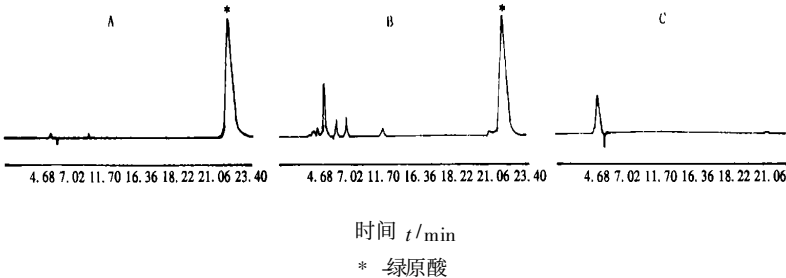


图 2 绿原酸对照品 (A)、样品 (B)和空白模拟样品 (C)的 HPLC图谱

次,每次 10 μ L,依法测定,峰面积的 $RSD=1.44\%$ ($n=7$),表明方法精密度较好。

2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液,在 15 h 内,每隔一定时间进样,依法测定,峰面积的 $RSD=1.39\%$ ($n=6$),结果表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

2.7 重现性试验:精密称取同一批号样品 5 份,依法制备供试品溶液,并测定样品中绿原酸含量。结果样品中绿原酸含量的 $RSD=1.49\%$ 。

2.8 回收率测定:精密称取已测定绿原酸含量的同批样品 5 份(批号 20010516),每份 100 mg,分别精密加入对照品溶液 5 mL(浓度为 0.403 mg/mL),用 50% 甲醇定容于 100 mL 容量瓶中,摇匀,依次进样 10 μ L,测定峰面积,计算回收率。结果其平均回收率为 99.12%, $RSD=1.97\%$ ($n=5$)。

2.9 样品含量测定:取复方双花喷雾泡腾片(每片约 200 mg),精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇使崩解,并用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,精密吸取续滤液 10 μ L 进样,分析,按外标法计算绿原酸的含量。结果见表 1。

3 讨论

3.1 用 HPLC 法测定样品含量时,开始选用乙腈-

围为 0.104~1.562 μ g。
2.4 干扰因素考察:按复方双花喷雾泡腾片配方,制备不含金银花的空白模拟样品,按 2.9 项下方法配制阴性对照品溶液,进样 10 μ L,进行 HPLC 分析。从色谱图可以看出,在绿原酸主峰附近没有吸收峰出现,说明所含辅料和其他药材对绿原酸测定没有干扰。见图 2。
2.5 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 7

表 1 复方双花喷雾泡腾片中绿原酸的含量测定 ($n=3$)

批 号	绿原酸含量 (mg/g)
20010508	3.86
20010512	3.99
20010516	3.82

1.6% HAC 溶液 (12:88) 为流动相,绿原酸保留时间在 12 min 左右,但样品主峰左侧有一小肩峰。改为乙腈-1.6% HAC 溶液 (9:91),其保留时间在 23 min 左右,主峰与其左侧的邻峰基线宽度分别为 $W_1=0.4$, $W_2=1.16$,两者分离度 $R=1.56$,达到基线分离,符合要求^[2]。

3.2 制备供试品溶液时,样品未经提取与纯化等前处理。这是因为样品为泡腾片,在 50% 甲醇溶液中能迅速崩解成小颗粒,并快速溶解在其中形成均匀的溶液,使用时只需用微孔滤膜滤过即可。方法专一性研究表明,在本色谱条件下,泡腾剂、稀释剂等外加辅料以及其他组分,对绿原酸的含量测定没有干扰。

致谢:感谢本校中药资源学教研室黄文哲副教授在含量测定时给予的帮助。

参考文献:

[1] 孙文基,绳金房.天然活性成分简明手册[M].北京:中国医药科技出版社,1998.
[2] 中国药典[S].2000年版.一部.