

HPLC 法测定复黄片中槐角苷

王誉洁¹, 邱明丰^{1*}, 安红梅², 赵爱华¹, 谢国祥^{1,3}, 贾伟¹

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032;

3. 上海交通大学系统生物医学研究院, 上海 200240)

摘要:目的 建立复黄片中槐角苷的测定方法。方法 复黄片粉用甲醇在 30℃ 时超声处理 30 min, 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.04% 磷酸溶液为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 紫外检测波长为 260 nm, 测定复黄片中槐角苷的量, 并采用外标法计算复黄片中槐角苷。结果 槐角苷在 24.29~60.72 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率为 99.65%, RSD 为 1.27%。结论 本方法简便、快速、准确, 可为评价复黄片质量提供依据。

关键词:复黄片; 槐角苷; 高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0537-02

复黄片是在上海中医药大学附属龙华医院的医院制剂基础上研制的复方中药新药, 由蒲黄、地榆、槐角、大黄 4 味中药组成, 凉血止血、清热通便, 用于治疗血热妄行之便血^[1]。槐角为处方中的臣药, 槐角中含有多种黄酮和异黄酮类化合物, 主要包括槐角苷、槐属双苷、染料木苷、染料木素、芦丁等^[2]。本实验综合文献报道^[2~4]中槐角苷的测定方法, 采用 HPLC 法测定了复黄片中专属性成分槐角苷, 为复黄片质量的评价与控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AL204 型电子天平(Mettler Toledo); Sartorius AR1VM611UF 超纯水器(德国 Sartorius 公司)。

槐角苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111695-200501), 乙腈为色谱纯, 超纯水(实验室自制), 其余试剂均为分析纯。复黄片(上海交通大学药学院自制, 批号为 061106、061107 和 061108)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取经五氧化二磷减压干燥 36 h 的槐角苷对照品适量, 加甲醇制成 0.06 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备:取复黄片(批号 061106)粉约 0.60 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 在 30℃ 时, 超声处理(功率 300 W, 频率 25 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液

2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 缺槐角阴性供试品溶液的制备:取缺槐角的阴性样品粉约 0.60 g, 同供试品溶液的制备方法制备, 即得, 备用。

2.4 色谱条件:Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 260 nm; 流动相: 乙腈(A)-0.04% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱: 0~5 min 为 10%A~20%A, 5~25 min 为 20%A~25%A; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 室温。

2.5 专属性试验:在以上色谱条件下, 槐角苷与相邻峰分离度大于 2.3, 理论塔板数按槐角苷峰计算不低于 8 000, 对照品溶液和供试品溶液主峰的保留时间一致, 保留时间为 18.5 min, 阴性样品无干扰, HPLC 图谱见图 1。

2.6 线性关系考察:精密量取槐角苷对照品溶液 2、2.5、3、4、5 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。分别精密吸取 5 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积积分值。以槐角苷对照品的质量浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y=4.0 \times 10^6 X-27\,422$, $r=0.999$ 。结果表明, 槐角苷在 24.29~60.72 μg/mL 与峰面积积分值的线性关系良好。

2.7 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 5 μL, 分别于配制后 0、1、2、4、6、12 h, 依法测定, 计算, 得槐角苷质量分数的 RSD 为 1.47%, 表明供试品溶

收稿日期: 2007-06-21

基金项目: 上海市重点学科建设项目资助(T0304)

作者简介: 王誉洁(1981—), 女, 重庆市铜梁县人, 上海交通大学硕士研究生, 从事中药新制剂研究。

Tel: (021)34204829 E-mail: wangyujexiang@sina.com

* 通讯作者 邱明丰 Tel: (021)62932292 E-mail: mfqiu@sjtu.edu.cn

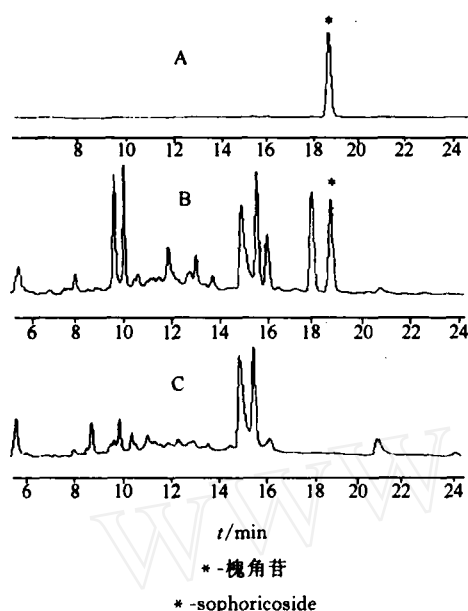


图 1 槐角苷对照品(A)、复黄片(B)和阴性样品(C) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of sophoricoside reference substance (A), Fuhuang Tablets (B), and negative sample (C)

液在 12 h 内基本稳定。

2.8 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,进样 5 μ L,重复进样 6 次,槐角苷峰面积 RSD 为 0.76%。

2.9 重现性试验:取同一批样品,平行制备 6 份供试品溶液,分别进行测定,计算,结果槐角苷的质量分数的 RSD 为 1.92%。

2.10 回收率试验:取批号为 061106 的复黄片样品 9 份,分别取约 0.20 g,精密称定,分别精密加入 0.184 mg/mL 槐角苷对照品溶液 4.6、5.6、6.6 mL,制备供试品溶液,计算加样回收率,结果平均回收率为 99.85%,RSD 为 1.27%。

2.11 样品的测定:取 3 批样品(批号 061106、061107、061108),制备供试品溶液,进样,测定,采用外标法计算样品中槐角苷的质量分数,结果见表 1。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择:选用了甲醇、乙醇、90%甲醇、80%甲醇、70%甲醇为提取溶剂,对样品进行超声提取 30 min,制备供试品溶液,进样测定,结果槐角苷

表 1 复黄片中槐角苷的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of sophoricoside in Fuhuang Tablets ($n=3$)

批号	槐角苷/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)
061106	5.20
061107	4.96
061108	5.54

的质量分数分别为 1.73、1.05、1.31、1.28、1.09 mg/片。结果以甲醇的提取率为最高,提取分离效果较好,故选用甲醇为提取溶剂。

3.2 提取方法选择:取样品 2 g,共 2 份,分别用甲醇超声、加热回流处理,进行测定,结果槐角苷的质量分数分别为 1.75、1.68 mg/片。提取率基本相同,因超声比较方便,且提取液的杂质也比回流处理的少,故样品选用超声处理。

3.3 提取时间选择:取样品 2 g,共 4 份,分别用甲醇超声处理 10、15、30、45 min,制备供试品溶液,进行测定,结果槐角苷的质量分数分别为 1.15、1.27、1.72、1.75 mg/片。槐角苷的提取率以 10 min 为最低,15 min 次之,30 min 和 45 min 的提取率基本相同,故确定超声提取时间为 30 min。

3.4 测定波长的选择:取槐角苷适量,用甲醇溶解后,吸取适量用流动相稀释,在 200~500 nm 波长内扫描,结果在 260 nm 处有一最大吸收峰,与《中国药典》2005 年版一部槐角药材测定项下方法一致,故测定的波长选择了 260 nm。

3.5 在供试品测定时,原考虑采用《中国药典》2005 年版一部槐角药材测定项下方法,但是色谱背景干扰较大,无法进行测定。本实验考察了甲醇、乙腈同几种常用浓度磷酸溶液的配比,最终选定了乙腈-0.04% 的磷酸溶液作流动相,其供试品溶液色谱分离好,背景无干扰。

参考文献:

- [1] 潘一滨,曹永清,陆金根.复黄片治疗痔出血 144 例的随机双中心单盲临床试验[J].中国新药与临床杂志,2005, 64(8): 243-246.
- [2] 中国药典[S].一部.2005.
- [3] 刘晓华,李涛,朱亮.HPLC 测定槐角丸中槐角苷含量[J].中成药,2005, 27(4): 476-478.
- [4] 刘晓华,孙文基,李涛.高效液相色谱法测定槐角中槐角苷的含量[J].药物分析杂志,2004, 24(2): 160-162.