

HPLC法测定复黄片中香蒲新苷

王誉洁¹, 刘胤敏¹, 吴红兵¹, 陆金根², 邱明丰^{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)

摘要:目的 建立复黄片中香蒲新苷的测定方法。方法 复黄片粉中加入甲醇超声提取香蒲新苷, 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.04% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1 mL/min, 柱温: 30 ℃, 检测波长为 254 nm, 用外标法计算复黄片中香蒲新苷。结果 香蒲新苷在 0.525~8.40 μg 线性关系良好, 平均回收率为 100.24%, RSD 为 1.12%。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; 香蒲新苷; 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(2010)11-1813-02

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, 由蒲黄炭、地榆炭、槐角、大黄组成, 具有凉血止血、清热通便等功效, 用于治疗血热妄行之便血^[1]。为确保复黄片的质量标准的规范, 建立一种针对有效成分简便、快速、准确的定量方法, 对该产品的质控显得十分必要。蒲黄为处方中的君药, 含有多黄酮类化合物, 主要包括异鼠李素、槲皮素、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、香蒲新苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷等^[2]。本实验综合文献报道中^[3-4] 香蒲新苷的测定方法, 采用 HPLC 法测定了复黄片中专属性成分香蒲新苷, 为复黄片质量的评价与控制提供了依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AL204 型电子天平(Mettler Toledo); Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); Sartorius AR1106M11UF 超纯水器(德国 Sartorius 公司)。

香蒲新苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111573-200402), 乙腈(Merck, 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, 批号为 061106、061107、061108, 0.33 g/片), 缺蒲黄的复黄片阴性样品(上海交通大学药学院, 批号为 060923-3, 0.33 g/片)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 精密称取香蒲新苷对照品适量, 加甲醇溶解, 制成 0.42 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液母液。

2.2 复黄片供试品溶液的制备: 取复黄片粉约 0.80 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 30 ℃水浴超声 30 min, 放冷后补足甲醇至 25 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 蒲黄阴性供试液的制备: 取缺蒲黄的复黄片阴性样品粉约 0.80 g, 同复黄片供试品溶液制备方法制备, 备用。

2.4 色谱条件: Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 254 nm; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.04% 磷酸溶液, 梯度洗脱: 0~10 min 为 10% A-20% A, 10~30 min 为 20% A-25% A, 30~40 min 为 25% A; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 ℃。

2.5 专属性试验: 在以上色谱条件下, 香蒲新苷与相邻峰分离度均大于 1.7, 理论塔板数按香蒲新苷峰计算不低于 8000, 对照品溶液及供试品溶液主峰的保留时间一致, 为 20.1 min, 蒲黄阴性样品无干扰, 见图 1。

2.6 线性关系考察: 精密量取香蒲新苷对照品溶液母液 2.5 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 为对照品溶液(I)。精密吸取对照品溶液(I) 2.5 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 为对照品溶液(II)。分别精密吸取对照品溶液(I)、(II) 各 5 μL, 对照品母液 5、10、20 μL 分别注入液相色谱仪, 记录峰面积积分值。以香蒲新苷对照品的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=448.037X+20.276$, $r=0.9999$ 。结果表明, 香蒲新苷在 0.525~8.40 μg 线性良好。

①收稿日期: 2010-02-22

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, 硕士研究生, 从事中药新制剂研究。

Tel/Fax: (021) 34204052 E-mail: wangyujiexiang@sina.com

* 通讯作者 邱明丰 Tel/Fax: (021) 34204052 E-mail: mfqiu@sytu.edu.cn

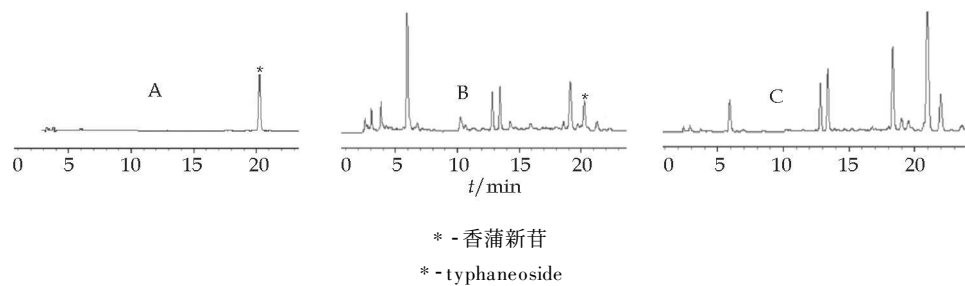


图 1 香蒲新苷对照品(A)、复黄片(B)和阴性样品(C)HPLC图谱

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

2.7 稳定性试验: 同一供试品溶液(批号 061106)于室温条件放置, 于 0、1、2、4、6、12 h 分别精密吸取 10 μL 进样, 测定, 香蒲新苷质量分数得 RSD 为 0.91%, 表明供试品溶液在 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(批号 061106), 进样 5 μL, 重复进样 6 次, 香蒲新苷峰面积 RSD 为 0.64%。

2.9 重现性试验: 取同一批样品(批号 061106), 制备供试品溶液, 平行制备 6 份溶液, 分别进行测定, 香蒲新苷质量分数 RSD 为 0.72%。

2.10 回收率试验: 取批号为 061106 的复黄片样品 9 份, 精密称定, 按样品中香蒲新苷质量的 80%、100%、120% 分别精密加入香蒲新苷对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率, 结果回收率为 100.24%, RSD 为 1.12%。

2.11 样品测定: 取 3 批中试样品(批号 061106、061107、061108), 制备供试液, 进样测定, 用外标法计算样品中香蒲新苷, 结果见表 1。

表 1 复黄片中香蒲新苷的测定

Table 1 Determination of typhaneoside in Fuhuang Tablets

批号	香蒲新苷/(mg·片 ⁻¹)
061106	1.21
061107	1.25
061108	1.23

3 讨论

预实验时, 对甲醇-水、甲醇-0.04% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.04% 磷酸等流动相系统及其配比的等度和梯度洗脱方式进行了色谱条件优化, 结果表明乙

腈-0.04% 磷酸溶液系统最佳, 各个色谱峰的峰形和分离度都较好, 因此选定该系统为复黄片中香蒲新苷色谱分析条件的流动相。

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, 分别对样品进行超声提取 30 min, 取等量续滤液进样测定, 得香蒲新苷的质量分数分别为 1.20、1.15、1.18、1.15、1.13 mg/片。以甲醇的提取率为最高, 提取分离效果较好, 最终选择甲醇为提取溶剂。

提取方法选择: 比较了甲醇超声提取和加热回流处理两种方法的效果, 结果香蒲新苷的质量分数分别为 1.20、1.17 mg/片, 提取率基本相同, 但因超声法比较方便, 提取液中的杂质也比回流处理法的少, 故样品选用超声处理。

提取时间选择: 采用甲醇超声提取, 考察了超声 10、15、30、45 min 等处理时间对提取率的影响, 结果测得香蒲新苷的质量分数分别为 1.13、1.16、1.21、1.20 mg/片。可见香蒲新苷的提取率随超声时间增多而增加, 至 30、45 min 时基本不再增加, 故选定超声时间为 30 min。

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] 苑可武, 徐文豪. 蒲黄的化学及药理研究概况[J]. 中草药, 1996, 27(11): 693-696

[3] 傅大熙, 程小卫, 王 玮, 等. 蒲黄总黄酮提取物中香蒲新苷及异鼠李素 3-O-新橙皮糖苷的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(6): 360-361

[4] 马红飞, 刘 斌, 周军挺. 蒲黄的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2006, 37(3): 433-435