

高效液相色谱法测定 牛黄化毒片中连翘苷含量*

孟凡英,张丽芳,侯婷,王佳,卢珑

摘要 [目的] 建立以高效液相色谱法测定牛黄化毒片中的连翘苷含量的方法。[方法] 色谱为 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水(23:77), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为室温。[结果] 连翘苷检测浓度在 0.194 6~2.919 0 μ g 范围内与峰面积值线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 99.90% [相对标准偏差 (RSD)=1.69%]。[结论] 该方法可用于牛黄化毒片的质量检测。

关键词 高效液相色谱法; 牛黄化毒片; 连翘苷; 含量

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1673-9043(2011)02-0113-02

牛黄化毒片收载于《卫生部药品标准中药成方制剂第二十册》, 执行药品标准为 WS3-B-3567-98。是由制天南星、连翘、金银花、白芷、甘草、乳香、没药、人工牛黄 8 味药材组成。有解毒消肿, 散结止痛的功效, 可以用于疮疡、乳痈、红肿疼痛的病痛的治疗。现执行的质量标准仅规定了性状及绿原酸的薄层色谱鉴别和检查项。为有效地控制药品质量, 本文增加了连翘中连翘苷的含量测定方法。修订后的标准可用于牛黄化毒片的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (包括在线脱气机、四元泵、自动进样系统、DAD 检测器、Chem Stations 色谱工作站)。

1.2 试药 连翘苷对照品 (批号为 110826-200712, 供含量测定用, 含量以 99.9% 计) 均由中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯, 水为去离子水。牛黄化毒片样品由 (天津市同仁堂股份有限公司提供批号为 584004、783001、788002、885001)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性实验 色谱柱: Dikma C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (23:77); 检测波长为 230 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温。进

样量 10 μ L, 灵敏度 0.02 AUFS。分别取样品测定项下溶液 10 μ L, 各重复进样 5 次, 记录色谱图, 量出连翘苷的保留时间和半峰高宽, 计算理论塔板数, 结果其理论塔板数均大于 2 000。连翘苷保留时间为 25 min, 拖尾因子亦符合药典规定。连翘苷的液相色谱图见图 1。阴性对照图谱显示阴性的色谱峰。

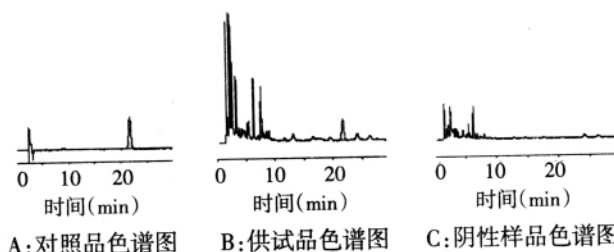


图1 连翘苷的 HPLC 图谱

2.2 对照品溶液的制备 精密称取连翘苷对照品 5 mg, 置 250 mL 棕色量瓶中用 50% 甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 制成 1 mL 中约含 20 μ g 对照品溶液。

2.3 供试品溶液及阴性对照品溶液的制备 取本品 20 片, 除去包衣, 研细, 精密称取 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 15 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 精密移取 2 mL, 上中性氧化铝柱 (100~120 目, 1 g, 内径 1 cm), 用 50 mL 70% 乙醇洗脱, 蒸至约 15 mL, 置 25 mL 容量瓶中用 70% 乙醇定容。0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。同法, 取不含连翘的样品制备成阴性对照品溶液。

2.4 线性考察 精密吸取连翘苷对照品溶液

* 基金项目: 天津市科技创新专项资金项目 (08FDZDSH01400)。

作者单位: 300193 天津中医药大学 (孟凡英, 卢珑)

300132 天津市同仁堂股份有限公司 (张丽芳, 王佳)

300384 协和干细胞基因工程有限公司 (侯婷)

作者简介: 孟凡英 (1982-) 女, 助理工程师。

(468.5 g/L)1、2、3、6、9、12、15 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 分别配置成 0.194 6、0.389 2、0.583 8、1.167 6、1.751 4、2.335 2、2.919 0 g/mL 的溶液, 按“2.1 色谱条件”项下进样 10 μ L。进样后, 记录峰面积, 以浓度 X 与峰面积 $\hat{Y}$ 进行线性回归, 得回归方程为 $\hat{Y}=204\ 298.131\ 5X-3\ 055.712\ 4(r=0.999\ 9)$ 。结果表明连翘苷在 0.194 6~2.919 0 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度实验 取批号为 889002 的样品 1 份, 按“2.3 供试品溶液的制备”项下方法操作, 按“2.1 色谱条件”分析, 精密吸取供试品溶液 10 μ L, 连续进样 6 次, 测定样品中连翘苷峰面积值, 平均峰面积值为 78.634 522 的峰面积(RSD)=0.22%($n=6$)。结果表明 精密度符合要求。

2.6 稳定性实验 取批号为 889002 的样品 1 份, 按“2.3 供试品溶液的制备”项下方法操作, 按“2.1 色谱条件”分析, 分别精密吸取供试品溶液 10 μ L, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 测定连翘苷的含量 RSD=0.87%, 结果表明, 供试品溶液在 24 h 内测定稳定。

2.7 重现性实验 取批号为 889002 的样品 6 份, 按“2.3 供试品溶液的制备”项下方法操作, 按“2.1 色谱条件”分析, 测定连翘苷的含量, 结果测得样品平均含量为 0.082 34 mg/片, RSD=0.67%, 结果表明, 重现性符合要求。

2.8 加样回收率实验 取批号为 889002 的样品 6 份, 各 1.0 g, 精密称定, 精密加入每 1 mL 含连翘苷对照品 0.018 29 mg 的甲醇溶液 15 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 精密移取 2 mL 上中性氧化铝柱(100~120 目, 1 g, 内径 1 cm), 用 50 mL 70%乙醇

洗脱, 蒸至约 15 mL, 置 25 mL 容量瓶中用 70%乙醇定容。0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得, 作为供回收率测定用的供试品溶液, 按“2.1 色谱条件”分析, 计算回收率。结果平均回收率为 101.13%, RSD=0.76%。

2.9 样品含量测定 取不同批次的样品, 按“2.3 供试品溶液的制备”项下方法进行处理, 按“2.1 中色谱条件”测得各自连翘苷的含量, 结果见表 1。

表 1 牛黄化毒片连翘苷含量测定结果

序号	批号	连翘苷含量(mg/片)		平均值
1	783001	0.075 63	0.074 85	0.075 24
2	885002	0.090 44	0.090 13	0.090 28
3	992001	0.082 54	0.083 01	0.082 77
4	996003	0.104 98	0.105 23	0.105 10
5	A81001	0.099 15	0.098 99	0.099 70

3 讨论

通过对对照品溶液在波长 200~400 nm 处进行紫外光谱扫描显示, 连翘苷在 230 nm 处有最大吸收。流动相的选择参考相关文献^[1], 采用不含有缓冲盐的流动相, 以保证色谱柱的使用质量, 故最终将流动相定为乙腈-水(23:77)。取同一批号(889002)2 份, 精密称定, 色谱柱分别为 phenomenex Luna C₁₈ 250mm×4.6mm 5 μ m Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 4.6mm×250 mm 5 μ m Dikma Diamonsil C₁₈(2)250mm×4.6 mm, 5 μ m, 结果平均总量为 0.082 07 mg/片, RSD=1.75%。使用不同色谱柱对含量测定无影响。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 109-111.

(收稿日期 2010-11-26)

Determination of forsythin content in Niu Huang Huadu tablets by HPLC

MENG Fan-ying¹, ZHANG Li-fang², HOU Ting³, et al

(1. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Tongrentang Co Ltd, Tianjin 300132, China;

3. Xiehe Stem Cell Jine Co Ltd., Tianjin 300384, China)

Abstract: [Objective] To establish HPLC method for determination of forsythin content in Niu Huang Huadu tablets. [Methods] The determination was performed on C₁₈ column, the mobile phase consisted of acetonitrile-water (23:77) with flow rate at 1.0 mL/min and detection wavelength at 230 nm under room temperature. [Results] Forsythin had good linear relation in the range of 0.194 6~2.919 0 μ g ($r=0.999\ 9$), the average recovery was 99.90% (RSD=1.69%). [Conclusion] The method can be used to control the quality of Niu Huang Huadu tablets.

Key words: HPLC; Niu Huang Huadu tablets; forsythin; content