

HPLC法同时测定清火栀麦片中 3种有效成分的含量

蓝晓玉, 林华

(广西柳州食品药品检验所, 柳州 545001)

摘要 目的: 建立清火栀麦片中栀子苷和穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的 HPLC 测定方法。方法: 采用 CLC- ODS C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-乙腈-水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 238 nm (0~10 min 栀子苷), 224 nm (10.1~25 min 穿心莲内酯), 250 nm (25.1~30 min 脱水穿心莲内酯)。结果: 栀子苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯进样量分别在 0.20~1.22 μg, 0.06~0.35 μg, 0.17~1.03 μg 范围内有良好的线性关系 ($r=0.9999$)。平均回收率 ($n=6$) 分别为 98.2%, 97.8%, 97.9%; RSD 分别为 0.74%, 1.1%, 1.0%。结论: 该方法简便、快捷、准确, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 清火栀麦片; 栀子苷; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0228-03

HPLC determination of three effective components in Qinghuo Zhimai tablets

LAN Xiaoyu, LIN Hua

(Guangxi Liuzhou Institute for Drug Control, Liuzhou 545001, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of geniposide, andrographolide and dehydroandrographolide in Qinghuo Zhimai tablets. **Methods** CLC- ODS C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column was adopted; The mobile phase consisted of methanol- acetonitrile- water with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; The detection wavelength was 238 nm (0-10 min) for geniposide, 224 nm (10.1-25 min) for andrographolide, and 250 nm (25.1-30 min) for dehydroandrographolide. **Results** The linear ranges of geniposide, andrographolide and dehydroandrographolide were 0.20-1.22 μg, 0.06-0.35 μg and 0.17-1.03 μg respectively. The average recoveries ($n=6$) of geniposide, andrographolide and dehydroandrographolide were 98.2% (RSD=0.74%), 97.8% (RSD=1.1%), and 97.9% (RSD=1.0%), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid and can be used for the determination of three effective components in Qinghuo Zhimai tablets.

Key words Qinghuo Zhimai tablets; geniposide; andrographolide; dehydroandrographolide; HPLC

清火栀麦片收载于中国药典 2010 年版一部, 是由穿心莲、栀子、麦冬 3 味中药组成的成方制剂, 具有清热解毒、凉血消肿的功能。制剂中的主要活性成分栀子苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的含量测定方法, 已有文献报道^[1-4], 用 HPLC 法分别进行含量测定, 中国药典 2010 年版亦采用 HPLC 法进行分别测定^[5], 但对 3 种活性成分进行同时测定尚无文献报道。本文建立的 HPLC 法, 采用流动相梯度洗脱, 各测定成分波长的转换按出峰时间顺序进行程序设定, 达到了同时测定 3 种活性成分的目的。该方法灵敏度高, 专属性强, 操作简便, 重现性好, 可为

修订该制剂质量标准提供参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC2010A 高效液相色谱仪, 紫外可见波长检测器, LCsolution 色谱工作站; 岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计; 梅特勒 XS205 电子分析天平。

对照品栀子苷 (批号 110749-200512)、穿心莲内酯 (批号 0797-9803)、脱水穿心莲内酯 (批号 0854-9902) 均购自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用; 清火栀麦片 (广西日田药业有限责任公司; 批号为 080703, 091009, 100110); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 超纯水。

2 色谱条件

色谱柱: CLC-ODS C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m) 色谱柱; 流动相: 甲醇-乙腈-水, 梯度洗脱 [0 ~ 6 min 20: 10: 70; 6.01 ~ 30 min 20: 10: 70 → 60: 20: 20], 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 238 nm (0 ~ 10 min 栀子苷), 224 nm (10.1 ~ 25 min 穿心莲内酯), 250 nm (25.1 ~ 30 min 脱水穿心莲内酯); 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μ L。

3 溶液的制备

3.1 对照品储备液 精密称取栀子苷对照品 12.75 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得栀子苷对照品储备液; 精密称取穿心莲内酯对照品 14.50 mg 于 250 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得穿心莲内酯对照品储备液; 精密称取脱水穿心莲内酯对照品 10.72 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得脱水穿心莲内酯对照品储备液。

3.2 对照品混合溶液 分别精密量取栀子苷对照品储备液 2 mL, 穿心莲内酯对照品储备液 5 mL, 脱水穿心莲内酯对照品储备液 2 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含栀子苷 40.8 μ g 含穿心莲内酯 11.6 μ g 含脱水穿心莲内酯 34.3 μ g 的混合溶液, 即得。

3.3 供试品溶液 取本品 20 片, 除去糖衣, 研细, 精密称取约 0.3 g 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.4 阴性对照溶液 按清火栀麦片处方的比例, 制备不含栀子和穿心莲的阴性样品, 研细, 称取适量, 按“3.3”项下方法操作, 即得。

4 方法学试验

4.1 可行性试验 分别取对照品混合溶液、阴性对照溶液、供试品溶液各 20 μ L, 按上述色谱条件, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 阴性样品色谱在与样品中栀子苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯相应的保留时间处无色谱峰出现, 见图 1-A、B、C。

4.2 线性试验 分别精密吸取对照品混合溶液 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 μ L, 按上述色谱条件, 注入高效液相色谱仪中, 测定其峰面积, 并以峰面积 (Y) 对进样量 (X, μ L) 进行回归, 得栀子苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的回归方程分别为:

$$Y = 5.147 \times 10^4 X - 9.590 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.039 \times 10^4 X - 52.40 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 4.632 \times 10^4 X - 804.7 \quad r = 0.9999$$

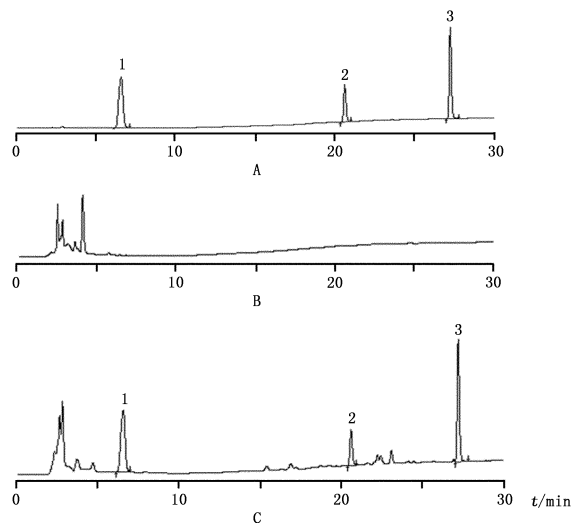


图 1 对照品 (A)、阴性样品 (B)、样品 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), negative sample without Gardeniae Fructus and Andrographis Herba (B) and sample (C)

1. 栀子苷 (geniposide) 2. 穿心莲内酯 (andrographolide) 3. 脱水穿心莲内酯 (dehydroandrographolide)

试验结果表明, 栀子苷进样量在 0.20 ~ 1.22 μ g 穿心莲内酯进样量在 0.06 ~ 0.35 μ g 及脱水穿心莲内酯进样量在 0.17 ~ 1.03 μ g 范围内均有良好的线性关系。

4.3 精密度试验 精密吸取对照品混合溶液 20.0 μ L, 按上述色谱条件, 连续进样 5 次, 结果栀子苷峰面积平均值为 1050787, RSD 为 0.5%; 穿心莲内酯峰面积平均值为 410824, RSD 为 0.4%; 脱水穿心莲内酯峰面积平均值为 933235, RSD 为 0.7%。本试验结果表明精密度良好。

4.4 重复性试验 取批号为 100110 的样品 5 份, 按“3.3”项下的方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 结果栀子苷含量均值为 2.08 mg · 片⁻¹, RSD 为 0.83%; 穿心莲内酯含量均值为 0.44 mg · 片⁻¹, RSD 为 1.3%; 脱水穿心莲内酯含量均值为 1.81 mg · 片⁻¹, RSD 为 1.0%。

4.5 稳定性试验 取上述同一供试品溶液 1 份, 分别于 0, 4, 8, 14, 24 h 按上述色谱条件进样 1 次, 结果栀子苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.9%, 0.7%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.6 加样回收试验 取批号为 100110 的样品粉末约 0.15 g 共 6 份, 分别加入栀子苷对照品储备液 2 mL, 穿心莲内酯对照品储备液 3.5 mL, 脱水穿心莲内酯对照品储备液 2 mL, 按“3.3”项下的方法制备

供试液,分别取样 20.0 μL 注入色谱仪,计算回收率。结果平均回收率 ($n = 6$) 分别为 98.2%, 97.8%, 97.9%; RSD 分别为 0.74%, 1.1% 及 1.0%。表明该方法回收率良好。

5 样品含量测定

按“3.2”和“3.3”项下方法制得对照品混合溶液和供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,记录色谱图,用外标法以峰面积计算样品中各测定成分的含量,并与原标准方法^[5]进行比较,结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 (mg·片⁻¹, $n = 3$)

Tab 1 Determination results of samples (mg per tablet $n = 3$)

方法 (method)	批号 (Lot No)	栀子苷 (geniposide)	穿心莲内酯 (andrographolide)	脱水穿心莲内酯 (dehydroandrographolide)
本法 (the method)	080703	2.04	0.43	1.73
	091009	2.03	0.32	0.94
	100110	2.08	0.44	1.81
原法 (national method)	080703	2.11	0.42	1.71
	091009	2.05	0.31	0.92
	100110	2.07	0.43	1.82

6 讨论

6.1 供试品溶液的制备方法直接采用中国药典 2010年版中的制备方法^[5]。曾试验以提取溶剂、提取方法、提取时间三因素用正交法进行条件筛选,未取得预期效果,有待进一步研究。

6.2 在实验中对流动相的组成和比例进行了多种比较,采用甲醇-水 (55:45)、乙腈-水 (10:90)作为流动相时,测定成分峰与杂质峰分离效果不好,峰拖尾严重;用甲醇-乙腈-水 [0~8 min, 20:10:70, 8.01~40 min, 20:20:60→60:20:20]时,在检测时间内,脱水穿心莲内酯未出峰;用甲醇-乙腈-水 [0~15 min, 20:10:70, 15.01~40 min, 20:10:70→60:20:20]时,样品中脱水穿心莲内酯峰与其相邻的杂质峰分离效果不好;根据分离情况,本实验选择

了甲醇-乙腈-水 [0~6 min, 20:10:70, 6.01~30 min, 20:10:70→60:20:20]作为流动相,结果栀子苷、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯 3种测定成分分离效果良好,且其他峰对测定无干扰。

6.3 分别取栀子苷对照品储备液、穿心莲内酯对照品储备液和脱水穿心莲内酯对照品储备液在 200~400 nm 波长范围内扫描,栀子苷在 238 nm,穿心莲内酯在 224 nm 和脱水穿心莲内酯在 250 nm 的波长处有最大吸收,根据样品中各成分出峰的时间将波长转换设定为:238 nm (0~10 min, 栀子苷), 224 nm (10.1~25 min, 穿心莲内酯), 250 nm (25.1~30 min, 脱水穿心莲内酯),达到同时测定的目的。

6.4 本法和原法的测定结果经 t 检验,在统计学上无显著性差异,建立的方法能同时测定该制剂中 3种活性成分,方法简便、快捷,节约时间,重现性好,克服原法耗时的缺点,可为进一步修订该制剂质量标准提供参考。

参考文献

1 SUMing-wu (苏明武), LIXue-qing (李雪晴), LIZhi-hao (李志浩), et al Determination of dehydroandrographolide in Qinghuozhima capsules by HPLC (清火栀麦胶囊中脱水穿心莲内酯的含量测定). China Pharm (中国药师), 2006, 9(6): 518

2 FAN LÜ-lin (范吕林), YANG Qing (杨青), LIU Shu-hua (刘淑华). Determination of geniposide in Qinghuozhima capsules by HPLC (高效液相色谱法测定清火栀麦胶囊中栀子苷的含量). China Pharm (中国药业), 2001, 10(8): 11

3 ZHOU Guo-er (周国儿), LI BN (李彬). Determination of dehydroandrographolide in Qinghuozhima capsules by HPLC (HPLC 法测定清火栀麦胶囊中脱水穿心莲内酯). Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 37(8): 1186

4 GUO Min (郭敏). HPLC determination of dehydroandrographolide and geniposide in Qinghuozhima capsules (HPLC 法同时测定清火栀麦胶囊中脱水穿心莲内酯和栀子苷的含量). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28(11): 1921

5 ChP (中国药典). 2010 Vol II (一部): 1113

(本文于 2010 年 4 月 29 日收到)