

HPLC 测定双黄连注射液中木犀草苷

樊磊磊^{1*}, 刘乃强¹, 王雪芹¹, 李振国¹, 邢向伟²

(1. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2. 河南中医学院, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 建立双黄连注射液中木犀草苷的 RP-HPLC 含量测定方法。方法: 采用聚酰胺柱纯化富集木犀草苷, 通过 Waters C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 35 °C。结果: 木犀草苷进样量在 34.3 ~ 343.0 ng 线性关系良好 ($r = 0.9997$); 方法回收率为 99.2%, RSD 3.3% ($n = 6$)。结论: 方法灵敏、简便、准确, 可用于双黄连注射液中木犀草苷的含量测定。

[关键词] 双黄连注射液; 木犀草苷; 反向高效液相; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0082-03

HPLC Determination of Luteoloside in Shuanghuanglian Injection

FAN Lei-lei^{1*}, LIU Nai-qiang¹, WANG Xue-qin¹, LI Zhen-guo¹, XING Xiang-wei²

(1. Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;

2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method to determine the content of luteoloside in Shuanghuanglian Injection. **Method:** Purification and enrichment of luteoloside were performed through polyamide column. The Waters C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid (B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 350 nm, and the column temperature was set at 35 °C. **Result:** The linear range of luteoloside was 34.3-343.0 ng ($r = 0.9997$), and the average recovery was 99.2% with RSD of 3.3% ($n = 6$).

[收稿日期] 20110504(010)

[基金项目] 河南省科技厅重点科技公关项目(102102310017)

[通讯作者] * 樊磊磊, 主管药师, 硕士, 从事药品质量标准及化学物质的非法添加检测研究, Tel:13523446978, E-mail:fan2lei@qq.com

在等度洗脱条件下, 当有机溶剂比例较高时, 流动相洗脱能力强, 色谱图信息多, 但色谱峰分离度较差; 当有机溶剂比例较低时, 洗脱能力弱, 色谱峰分离度得到改善, 但色谱图信息比较少, 洗脱时间延长。因此, 本试验采用梯度洗脱, 在经反复试验后, 比较了乙腈-水, 乙腈-缓冲盐等不同流动相体系, 最终确定了比较理想的色谱条件。

[参考文献]

- [1] 陈小新, 原素, 蒋东旭, 等. HPLC 法同时测定妇炎康灌肠剂中小檗碱和丹酚酸 B 的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 393.
- [2] 周玉新. 中药指纹图谱技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 31.

- [3] 周建良, 齐炼文, 李萍. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J]. 色谱, 2008, 26(2): 153.
- [4] 艾立, 罗国安, 王义明. 腰痛宁胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(10): 1409.
- [5] 王文燕, 赵强, 张铁军, 等. 牛黄降压丸的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 56.
- [6] 马瑛, 刘芳, 柴世伟. 化癥通脉汤的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 398.
- [7] 王祥红, 谢培山, 田润涛, 等. 复方中成药保济丸的 HPLC-DAD 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1748.

[责任编辑 蔡仲德]

Conclusion: This method is sensitive, simple, accurate, and suitable for the determination of the content of luteoloside in Shuanghuanglian Injection.

[**Key words**] Shuanghuanglian Injection; luteoloside; RP-HPLC; assay

双黄连注射液由金银花、连翘、黄芩制成的中药注射液,具有清热解毒,清宣风热之功效,主要用于外感风热引起的发热、咳嗽、咽痛、上呼吸道感染、肺炎等疾病。金银花中黄酮类成分木犀草苷(木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷)具有很强的抗呼吸道合胞体病毒及抗副流感3型病毒的活性^[1]。赵春荷、关建丽曾对双黄连注射液中木犀草苷含量测定进行过考察^[2],本文所建立的方法与其区别,主要在于通过聚酰胺柱分离纯化富集木犀草苷,可减少样品中其他成分的干扰影响,使检测结果更稳定、可靠。

1 仪器与试剂

戴安 Ultimate 3000 高效液相色谱仪(紫外检测器,四元泵,自动进样器),瑞士 Precisa XR205SM-DR 电子分析天平。

双黄连注射液为市售药品,规格为每支装 20 mL;木犀草苷对照品(购自中国药品生物制品检定所,含量测定用,批号 111720-200604);聚酰胺,柱层析用(浙江台州路桥四甲生化塑料厂);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液 取五氧化二磷减压干燥 12 h 后的木犀草苷对照品适量,精密称定,70%乙醇溶解,制成 34.3 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.2 供试品溶液 精密量取双黄连注射液 25 mL,加水 25 mL 稀释后上聚酰胺柱(玻璃柱,自行装填,规格长 30 cm,内径 1.1 cm),依次用水、10%乙醇、20%乙醇各 200 mL 洗涤除杂后,再用 35%乙醇 200 mL 洗涤,收集洗脱液,水浴蒸干,用甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,即得。

2.3 阴性样品溶液 取不含金银花的处方比例药材,按照双黄连注射液生产工艺,制得阴性样品,按双黄连注射液供试品溶液的制备方法操作,即得。

2.4 色谱条件及系统适用性试验 采用 Waters C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,柱温 35 °C,以乙腈为流动相 A,以 0.1% 磷酸为流动相 B,梯度洗脱(0 ~ 30 min, 13% ~ 16% A; 30 ~ 38 min, 16% ~ 33% A; 38 ~ 40 min, 33% A; 40 ~ 41 min, 33% ~ 13% A; 41 ~ 60 min, 13% A, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长

350 nm, 进样量 10 μL。以木犀草苷色谱峰计理论塔板数应不低于 3 000。

对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液分别用上述色谱条件进行分析,结果供试品溶液色谱图中木犀草苷主峰与其他色谱峰分离良好,在阴性样品溶液色谱图中与标准品主峰相应的保留时间处未出现色谱峰,说明本法具有很强的专属性。结果见图 1。

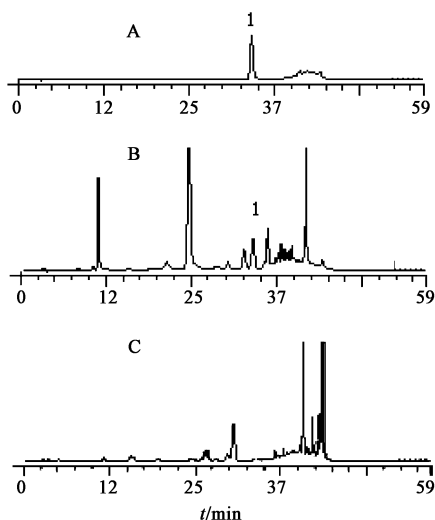
通过 Waters ACQUITY UPLC 液相串联 Quattro Premier 质谱仪定性鉴别双黄连注射液供试品溶液中木犀草苷(见图 2),结果显示其母离子[M-1]的 *m/z* 446.9,与木犀草苷相对分子量 448 一致,子离子 *m/z* 285.1 为木犀草苷脱去葡萄糖后的苷元木犀草素(相对分子量 286.23)的碎片离子,这证明检测到的成分是木犀草苷。仪器条件:Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-0.01 mol·L⁻¹醋酸铵溶液(0.1% 甲酸)(25:75),流速 0.2 mL·min⁻¹。离子化方式:电喷雾 ESI(-),毛细管电压 3.50 kV,离子源温度 110 °C,脱溶剂气温度 320 °C,脱溶剂气流速 400 L·h⁻¹,锥孔气流速 50 L·h⁻¹,*m/z* 50 ~ 500。检测方式:全扫描及 MRM 监测。

2.5 线性关系考察 取对照品溶液,分别进样 1, 2, 3, 5, 10 μL,按上述色谱条件进行测定,以木犀草苷进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程为 $A = 43.31C - 0.576$ ($r = 0.9997$)。结果表明木犀草苷进样量在 34.3 ~ 343.0 ng 线性关系良好。

2.6 精密度试验 取同一份供试品溶液,连续 6 次进样,木犀草苷峰面积的 RSD 为 1.8% ($n = 6$),表明进样精密度良好。

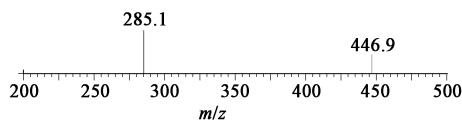
2.7 重复性试验 取同一批次双黄连注射液样品 5 份,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,进样测定木犀草苷的含量。结果平均质量浓度为 9.75 mg·L⁻¹,RSD 为 2.5% ($n = 5$),表明此方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验 取一份供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 20, 24 h 进样测定,结果木犀草苷峰面积的



1. 木犀草苷

图 1 木犀草苷标准品(A)、双黄连注射液样品(B)、阴性样品(C) HPLC



m/z 446.9 ([M-1], 木犀草苷母离子), m/z 285.1 (木犀草苷的苷元碎片离子)

图 2 双黄连注射液中木犀草苷质谱图

RSD 为 1.9%, 表明供试品溶液中木犀草苷在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 精密量取已知木犀草苷含量($9.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的双黄连注射液的样品 12.5 mL, 共 6 份, 每份精密加入木犀草苷对照品溶液($34.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3.5 mL, 再各加 9.0 mL 纯水混匀后, 按 2.2 项下方法制备所需溶液, 在上述色谱条件下进行测定, 计算回收率。结果木犀草苷的平均回收率为 99.2%, RSD 为 3.3% ($n=6$)。

2.10 样品测定 取 3 批双黄连注射液, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 样品中的木犀草苷质量浓度平均为 $9.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 前处理方法的选择 分别试用不同填料(如 D101 树脂、中性氧化铝、聚酰胺等)装柱、预处理除去杂质, 结果聚酰胺柱除杂效果最好。分别使用不同种类, 不同体积的洗脱溶剂进行洗脱除杂, 结果本文选定的条件最优。

3.2 检测波长的选择 取木犀草苷对照品的流动相溶液, 用可见-紫外分光光度计在 200 ~ 400 nm 波长进行扫描, 结果木犀草苷对照品溶液在 350 nm 波长处有最大吸收, 故选择 350 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择 参考有关文献[2-8], 分别采用不同的流动相系统(乙腈-0.5% 醋酸、乙腈-0.05% 醋酸、乙腈-0.5% 磷酸和乙腈-0.05% 磷酸)和不同的梯度洗脱程序, 结果以正文选定的流动相进行梯度洗脱, 分离效果较好, 分离度符合要求。

[参考文献]

- [1] 马双成, 刘燕, 毕培曦, 等. 金银花药材中抗呼吸道病毒感染的黄酮类成分的定量研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 426.
- [2] 赵春荷, 关建丽. 双黄连注射液中木犀草苷含量测定的考察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2008, 6: 599.
- [3] 马玲云, 姚令文, 马双成, 等. HPLC 测定金银花药材中木犀草苷含量的优化[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1496.
- [4] 宋平顺, 卫玉玲, 陶耀武, 等. 不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷含量的 HPLC 法测定[J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 25(5): 31.
- [5] 张伟敏, 张盛林, 钟耕. 木犀草素的研究概况[J]. 中国食品添加剂, 2005, 2: 11.
- [6] 蒋道英, 刘献洋, 侯佳伟, 等. HPLC 测定茵桅黄注射液中木犀草苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(3): 453.
- [7] 胥秀英, 郑一敏, 傅善权, 等. 高效液相色谱法测定金银花中木犀草素的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 221.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2005: 152.

[责任编辑 蔡仲德]