

双黄连含片中黄芩甙、绿原酸及连翘甙的含量测定

郭锐锋¹, 万绍晖², 王 荔²

(1 河南省开封市药品检验所, 开封 475002; 2 开封医学高等专科学校, 开封 475003)

关键词: 双黄连含片; 黄芩甙; 连翘甙; HPLC; 薄层扫描

中图分类号: R284.1 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2000)04-0014-03

双黄连含片是由双黄连颗粒剂改进研制而成。其服用方便, 效果好、具有辛凉解表, 清热解毒之功效, 主要用于流感风热引起的发热, 咳嗽及咽痛等。但是目前国家药品标准^[1] 收录的两种双黄连口服制剂仅规定了黄芩甙的含量测定项, 对双黄连粉针剂也仅规定了黄芩甙和绿原酸的含量测定, 而缺少双黄连制剂中的主药连翘的有效成分的含量测定项目。为更好地控制双黄连制剂中所有主要有效成分含量, 笔者在现有的质量标准的基础上, 采用 HPLC 法(流动相、检测波长、理论板数与药典不同), 分别测定双黄连含片中的黄芩甙及绿原酸的含量, 并建立了用薄层扫描法测定双黄连含片中的连翘甙含量, 结果可靠, 重现性好, 对完善中药制剂的质量标准有实际意义。

1 仪器、试药和试剂

Beckman 高效液相色谱仪, TLCSCAN-NER II; Nanomat II 点样仪, Compa 计算机(配 CATS) 软件, 定量点样毛细管(瑞士 CAMAG), CQ-500J 型超声波仪。

黄芩甙对照品、绿原酸对照品及连翘甙对照品(中国药品生物制品检定所), DOS 柱(5×245mm); 粒度 5 μ m(大连化物所), 硅胶 G(青岛海洋化工厂), 双黄连含片(0.5g/片, 自制), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇-水-冰醋

酸(50:50:1)为流动相, 流速 0.9ml/min, 检测波长 277nm, 理论板数按黄芩甙峰计算, 应不低于 2500。

2.1.1 线性关系试验

精密称取黄芩甙对照品, 用甲醇溶解, 制成 0.035mg/ml 的溶液, 分别进样 5、10、15、20、25 μ l, 峰面积依次为 4.00217、7.90551、12.08833、16.11126 及 20.00315, 回归方程 $Y = 22.9758x - 0.04023$, $r = 0.9998$ 。黄芩甙在 0.175 ~ 0.875 μ g 线性关系良好。

2.1.3 精密度及稳定性试验

按样品测定方法, 对同一供试品溶液重复测定 5 次, 得黄芩甙的峰面积均值为 8.59925, $RSD = 0.8\%$ 。再分别于 0.5、1、3、6 及 10h 测定, 结果表明在测定条件下, 于 10h 内测定结果稳定, RSD 为 1.2%。

2.1.4 空白试验

取不含黄芩甙的空白片, 按样品测定法测定, 结果在黄芩甙吸收峰位置处无干扰。

2.1.5 重现性试验

按样品测定方法对同一样品测定 5 次, 结果黄芩甙平均含量为 79.30(mg/g) $RSD = 1.7\%$ 。

2.1.6 回收率试验

取样品细粉约 0.1g, 精密称定, 置 25ml 量瓶中, 精密加入一定量黄芩甙对照品, 加 50% 甲醇 18ml, 自样品测定中“超声提取”起, 依法测定, 计算加样回收率结果见表 1。

2.1.7 样品测定

取本品 10 片, 精密称定, 研细, 取细粉约 0.5g, 精密称定, 置 100ml 锥型瓶中, 精密加入 50% 甲醇 100.0ml, 超声提取 10min, 滤过。精密吸取续滤液 2ml, 置

表1 黄芩甙回收率测定结果

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.1025	7.298	7.39	14.858	102.3	
0.1131	8.053	7.57	15.721	101.3	
0.1096	7.804	7.49	15.324	100.4	100.03
0.1017	7.241	3.53	10.718	98.5	
0.1151	8.195	3.39	11.575	99.7	$RSD\% = 1.6$
0.1145	8.152	3.82	11.896	98.0	

10ml量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另精密称取在60℃真空干燥4h的黄芩甙对照品适量,用50%甲醇制成每ml含0.1mg的溶液,作为对照品溶液。分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各5 μ l,注入液相色谱仪依法测定,结果5批样品分别含黄芩甙(mg/片/0.5g)为35.6、36.3、35.9、36.1和35.8。

2.2 绿原酸含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填料,甲醇-水-冰醋酸(24:75:1)为流动相,流量为0.9ml/min,检测波长为329nm,理论板数按绿原酸峰计算应不低于5000。

2.2.2 线性关系试验 精密称取绿原酸对照品5.20mg,置10ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。分别取不同量的溶液制成梯度溶液,进样5 μ l,则进样量(μ g)与相应的峰面积分别为0.130、0.260、0.390、0.520、0.650和4.4505、8.6109、13.4445、17.9808、22.2325。求得回归方程为 $Y = 34.5646x - 0.1363$; $r = 0.9994$ 。绿原酸在0.130~0.650 μ g范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度与稳定性试验 按样品测定方式对同一供试品溶液重复测定5次,得绿原酸的平均峰面积为6.65290。 $RSD = 1.2\%$ 。再分别于0.5、1、3、6及10h测定,结果表明在测定条件下,于10h内测定结果稳定, RSD 为0.87%。

2.2.4 空白试验 取不含金银花的空白片,按样品测定法测定,结果在含绿原酸对照品

吸收峰位置处无干扰。

2.2.5 重现性试验 按样品测定法,对同一批样品依法测定6次,绿原酸平均含量为8.500mg/g, $RSD = 1.3\%$ 。

2.2.6 回收率试验 取本品10片,精密称定、研细、取细粉约0.25g,精密称定,置100ml量瓶中,精密加入一定量的绿原酸对照品,自样品测定中“加水80ml”起依法测定,计算回收率,结果见表2。

表2 绿原酸回收率测定结果

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.2517	1.938	2.06	3.987	99.5	
0.2622	2.019	2.01	4.041	100.6	100.0
0.2584	1.990	1.77	3.776	100.9	
0.2496	1.922	0.95	2.853	98.0	$RSD\% = 1.3$
0.2589	1.994	1.05	3.056	101.1	

2.2.7 样品测定 取本品10片,研细,取细粉约0.5g,精密称定,置100ml锥形瓶中,加水100ml,超声处理10min,滤过。取续滤液作为样品溶液。另取绿原酸对照品适量,加水制成每1ml含50 μ g的溶液,作为对照溶液。分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各5 μ l,注入高效液相色谱仪依法测定。结果5批不同批号的样品含绿原酸分别为3.75、3.81、3.90、4.08和4.15mg/片。

2.3 连翘甙的含量测定

2.3.1 测定条件的选择 分别取本品5片及与样品同样条件制备的不含连翘甙的空白片5片,分别研细,各精密称取细粉约0.5g,按样品测定法制成供试品溶液及空白溶液。另取连翘甙对照品适量,加甲醇制成0.3mg/ml溶液作为对照溶液。分别吸取供试品和空白溶液各10 μ l,对照品溶液2 μ l和5 μ l,分别交叉点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇(10:2)为展开剂展开,取出晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃烘6~10min,至斑点显色清晰,于薄层扫描仪在400~600nm范围内对连翘甙对照品斑点和

供试品相应的斑点分别扫描,结果二者均在530nm处有最大吸收,空白样品的斑点在相应位置无吸收,故选择530nm为测定波长。

2.3.2 线性关系试验 精密称取连翘甙对照品,加甲醇制成每1ml含0.31mg的溶液,分别精密吸取1、2、3、4、5 μ l,点于同一硅胶G薄层板上,依法展开、显色及扫描,所得峰面积分别为163.3、249.4、321.5、413.2及490.4,得回归方程为 $Y=263.90x+82.3$; $r=0.9995$,表明连翘甙在0.31~0.155 μ g范围内点样量与斑点峰面积线性关系良好。

2.3.3 稳定性试验 分别精密吸取供试溶液10 μ l;对照溶液2 μ l与5 μ l,点于同一硅胶G薄板上,依法展开。分别在0、34、48、70、100及125min时测定,结果表明在实验条件下,于125min内方法稳定, RSD 为1.7%。

2.3.4 精密度试验 在同一块薄层板上点同一样品溶液5个点,依法展开测定,测定的平均峰面积为560.08, $RSD=2.7\%$ 。将同一样品(10 μ l)分别点于5块薄层板上,依法展开测定,测得连翘甙平均含量为1.278(μ g), $RSD=3.1\%$ 。

2.3.5 重现性试验 对同一批样品,按样品测定法重复测定5次,测得连翘甙平均含量为1.244(μ g), $RSD=3.3\%$ 。

2.3.6 回收率试验 精密取已测得连翘甙含量的同一批样品5份,分别精密加入连翘甙对照品适量,依法操作测定,计算回收率,结果见表3。

表3 连翘甙回收率测定结果

加样前含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
2.23	1.05	3.239	96.1	96.9
2.29	1.05	3.319	98.0	
2.26	1.05	3.262	95.4	
1.10	2.10	3.122	96.3	$RSD\%=2.18$
1.07	2.10	3.146	98.9	

2.3.7 样品测定 取样品10片,精密称定,

研细。取细粉约1g,精密称定,置50ml具塞锥形瓶中,精密加甲醇25.0ml,称重,超声处理20min,放冷,用甲醇补足重量,滤过。取续滤液作为样品溶液。另取连翘甙对照品,加甲醇制成每1ml含0.3mg的溶液为对照溶液。精密量取样品溶液10 μ l、对照品溶液2 μ l与5 μ l:分别交叉点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇(10:2)为展开剂展开,取出凉干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C干燥6~8min至斑点显色清晰取出,置薄层扫描仪上于530nm处分别测量样品与对照品的吸收度积分值,计算5批不同批号样品的连翘甙含量分别为1.15、1.13、0.95、1.48和1.20(mg/片/0.5g)。

3 讨论

3.1 本文对双黄连含片中各味药材的主要有效成分建立了含量测定方法且结果可靠,对完善双黄连制剂的质量标准有一定意义。

3.2 在进行连翘甙的含量测定时,对比了回流提取和超声提取两种方法,结果超声提取所得样品溶液色谱杂质斑点较少,扫描背景较浅。用回流提取所得样品溶液的色谱杂质斑点多,连翘甙斑点附近有干扰;可能是在加热提取过程中使连翘甙分解或其它杂质被提出而增多^[2]。

3.3 在进行连翘甙含量测定时曾试用HPLC法^[3],但用于本制剂时色谱峰峰形及分离情况均不理想,故采用薄层扫描法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(1995年版). 1998年增补本[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998. 6~10.
- [2] 王中秋, 王军宪, 李教社, 等. 连翘的化学成分研究[J]. 西北药学杂志, 1996, 11(1): 14~16.
- [3] 郭淑敏, 胡丽君, 张丽敏, 等. 高效液相色谱法测定注射用双黄连中连翘甙的含量[J]. 中国中医药科技, 1997, 4(2): 93~95.