

抗敏胶囊主要成分的 HPLC 法分析

屠颖, 赵陆华*, 相秉仁, 赵振宇

(中国药科大学分析中心, 南京 210009)

摘要 目的 采用高效液相色谱法分析抗敏胶囊中主要成分(黄芩苷和淫羊藿苷)。方法 测定黄芩苷, 以 Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm)为色谱柱; 0.05 mol/L 磷酸水溶液-乙腈(70:30)为流动相; 流速1 ml/min; 检测波长277 nm; 测定淫羊藿苷, 以 Spherisorb C₁₈(250 mm×4.6 mm)为色谱柱; 乙腈-水-冰醋酸(22:78:0.1)为流动相; 流速1 ml/min; 检测波长270 nm。结果 黄芩苷的平均回收率为99.2%, 淫羊藿苷的平均回收率为100.4%, 符合分析要求, 重复性试验的 RSD 分别为: 黄芩苷0.84%, 淫羊藿苷1.6%。结论 重复性试验结果良好。另外还对样品的提取条件和测定条件进行了优选, 为评价含黄芩苷和淫羊藿苷类药材及其制剂的质量提供了一个灵敏、准确和快速的测定方法。

关键词 黄芩苷; 淫羊藿苷; 高效液相色谱法

中图分类号: TQ460.72, R976

文献标识码: A

文章编号: 1000-5048(2002)05-0404-04

抗敏胶囊由黄芩、淫羊藿、黄芪等十余味中药采用新技术提取、精制而成, 临床上治疗过敏性鼻炎, 其作用显著, 且疗效持久。黄芩为方中君药。据文献报道测定黄芩和含黄芩的复方制剂中黄芩苷含量的方法主要有: 分光光度法^[1]、薄层扫描法^[2]、脉冲极谱法^[3]、高效液相色谱法^[4]; 淫羊藿为方中臣药, 测定淫羊藿和含淫羊藿的复方制剂中淫羊藿苷含量的方法主要有: 二阶导数光谱法^[5]、薄层扫描法^[6]、高效液相色谱法^[7]等。鉴于本品药味较多, 成分复杂, 选择 HPLC 法测定黄芩苷与淫羊藿苷的含量, 经过色谱条件的优化, 该色谱方法结果准确, 重现性好, 可作为本品质量控制的方法。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, 日本岛津 SPT-10A 检测器, 日本岛津 C-R6A 记录仪。

乙腈为色谱纯, 磷酸、冰醋酸、三乙胺、无水乙醇等均为分析纯, 水为二次重蒸水, 黄芩苷和淫羊藿苷对照品由中国药品生物制品检定所提供; 抗敏胶囊由澳大利亚 G&W AUST Pty. Ltd. 提供(批号: 990303)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm), 5 μm; 流动相: 黄芩苷: 0.05 mol/L 磷酸水溶液-乙腈(70:30), 三乙胺调节 pH 至3.0; 淫羊藿苷: 乙腈-水-冰醋酸(22:78:0.1); 检测波长: 黄芩苷: 277 nm; 淫羊藿苷: 270 nm; 流速1 ml/min; 进样量: 20 μl。

2.2 供试品和对照品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取黄芩苷、淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 分别用甲醇配制成浓度为43.82 μg/ml 和15.08 μg/ml 的黄芩苷和淫羊藿苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品10粒, 倾出内容物, 混匀, 精密称取0.5 g, 置100 ml 量瓶中, 加水30 ml, 使完全溶解后, 再分3次加入无水乙醇70 ml, 超声30 min, 放冷, 用70%乙醇定容至刻度, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 备用。

2.3 测定方法

精密吸取上述供试品溶液与对照品溶液各20 μl, 分别注入高效液相色谱仪, 量取色谱峰面积, 以外标法计算样品含量。

2.4 线性试验

精密称取黄芩苷对照品适量, 配置为浓度

0.4980 mg/ml 的贮备液,分别取上述溶液1,2,4,6,8 ml 分置5个50 ml 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,混匀,分别进样20 μ l。

精密称取淫羊藿苷对照品适量,配置为浓度0.1012mg/ml 的贮备液,分别取上述溶液0.5,1.0,1.5,2.5,4.0 ml 分置5个10 ml 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,混匀,分别进样20 μ l。

以色谱峰峰面积(A)对成分浓度(C)作回归统计,结果如下:

黄芩苷的回归方程为: $A = 3.4624 \times 10^3 C - 12.413$, 相关系数: $r = 0.9998$ 。黄芩苷在9.96~79.68 μ g/ml 范围内呈线性关系。

淫羊藿苷的回归方程为: $A = 3.7967 \times 10^3 C - 1.9130 \times 10^3$, 相关系数: $r = 0.9999$ 。淫羊藿苷在5.06~40.48 μ g/ml 范围内呈线性关系。

2.5 稳定性考察和进样精密度试验

取供试品溶液分别在0、2、4、6、8 h 进样,测得黄芩苷浓度的 RSD 为0.77%;淫羊藿苷浓度的 RSD 为1.0%,表明样品溶液在8 h 内稳定。

按“2.2.2”项下操作,制备一份样品溶液,取20 μ l 注入色谱仪,连续进样6次。测得黄芩苷和淫羊藿苷的峰面积 RSD 分别为1.1%和1.8%,表明进样精密度良好。

2.6 重复性试验

取6份样品,按“2.2.2”项下操作,分别测定黄芩苷和淫羊藿苷的含量,黄芩苷和淫羊藿苷的 RSD 分别为0.84%和1.6%,表明重复性较好。

2.7 回收率试验

采用加样回收率测定方法,取已知含量的样品0.25 g,按高、中、低浓度分别添加一定量的对照品溶液,按“2.2.2”项下操作,制备成加样回收率供试液,并依法测定,结果见表1。

2.8 干扰性试验

2.8.1 阴性对照液 分别取缺黄芩和缺淫羊藿的缺味药材,按处方配比、工艺分别制成黄芩苷和淫羊藿苷的阴性对照溶液,色谱图分别见图1~2。结果表明,杂质对黄芩苷和淫羊藿苷的测定均无干扰。

2.8.2 峰纯度检查 按“2.2.2”项下操作,制成供试品溶液一份,对黄芩苷和淫羊藿苷峰分别采用二极管阵列检测器(DAD)进行峰纯度检查。结果显

示,黄芩苷与淫羊藿苷色谱峰中三个时间点(峰顶点与两拐点)的紫外吸收曲线的匹配度均为1000(1000为最高匹配度),该结果表明,黄芩苷和淫羊藿苷峰均为纯的色谱峰。

Tab 1. The recovery test

Sample	NO. (n=9)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Average recovery (%)	RSD (%)
Baicalin	1	1.341	1.356	101.1	99.2	2.0
	2	1.341	1.349	100.6		
	3	1.341	1.285	95.79		
	4	2.146	2.114	98.53		
	5	2.146	2.139	99.69		
	6	2.146	2.161	100.7		
	7	3.040	3.077	101.2		
	8	3.040	2.953	97.15		
	9	3.040	2.973	97.81		
Icariin	1	0.4453	0.4520	101.5	100.4	1.9
	2	0.4453	0.4281	96.14		
	3	0.4453	0.4454	100.0		
	4	0.7489	0.7456	99.56		
	5	0.7489	0.7571	101.1		
	6	0.7489	0.7450	99.48		
	7	1.052	1.076	102.2		
	8	1.052	1.072	101.9		
	9	1.052	1.068	101.5		

2.9 3批样品测定结果

3批抗敏胶囊样品测定结果见表2,对照品及供试品色谱图见图1~2。

Tab 2. Result of sample test

Sample	Batch No.	Content (mg/capsule)
Baicalin	990303	3.984
	990310	4.008
	990317	3.986
Icariin	990303	1.255
	990310	1.249
	990317	1.250

3 提取条件的优化

3.1 超声提取时间考察

按“2.2.2”项下操作,分别考察超声提取30 min、60 min、90 min 对药品测定结果的影响,结果见表3。结果表明,70%乙醇超声提取30 min,已基本提取完全。

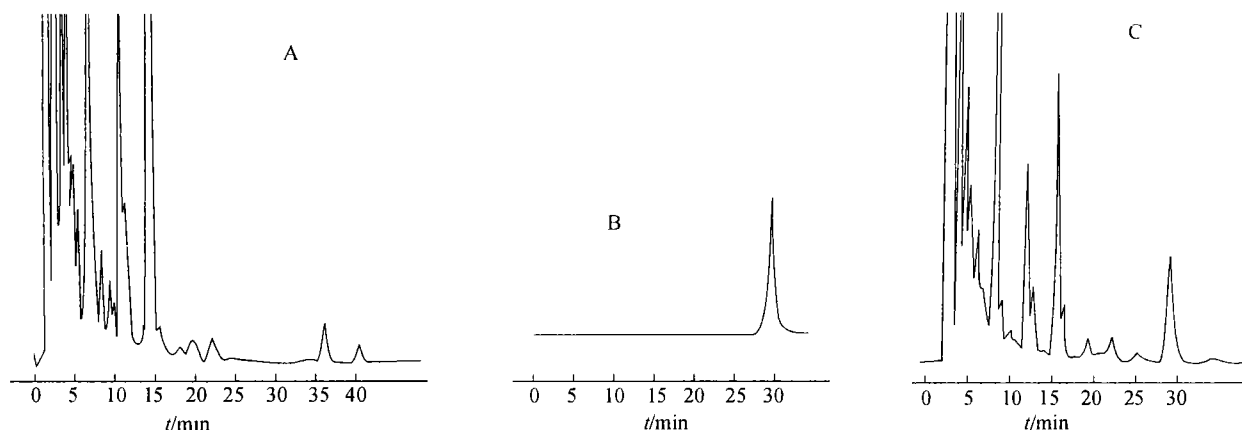


Fig 1. Chromatograms of baicalin

A. blank; B. standard; C. sample

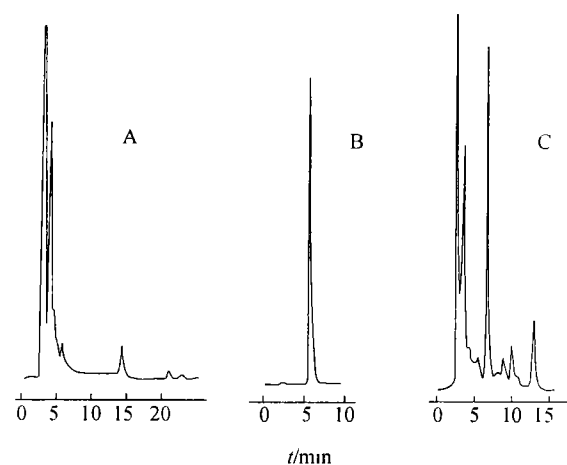


Fig 2. Chromatograms of icariin

A. blank; B. standard; C. sample

3.2 提取溶媒的考察

按“2.2.2”项下操作,分别考察50%甲醇、70%甲醇和70%乙醇超声提取后对测定结果的影响,结果见表3。结果表明,50%甲醇提取后,黄芩苷测定结果不稳定。70%甲醇和70%乙醇提取后的测定结果基本一致,考虑到乙醇较为安全、无毒,因此选择70%乙醇为提取溶媒。

3.3 提取方法的考察

按“2.2.2”项下操作,考察70%乙醇超声提取30 min与回流提取30 min对测定结果的影响,结果见表3。结果显示,超声提取与回流提取后的测定结果基本一致,因此选用超声提取30 min,其操作更为简便。

3.4 与其他提取方法的比较

方法(1)取本品加蒸馏水15 ml,使完全溶解,再用醋酸乙酯提5次(每次20 ml),水浴上蒸干,残

渣用甲醇溶解并转移至量瓶中,用10% NaCl(0.1 mol/L HCl 调节 pH 至4.0)稀释至刻度,于0℃以下冷冻30 min。

Tab 3. Result of extraction test

Content of contrast		Baicalin (mg/capsule)	Icariin (mg/capsule)
Time for Ultrasonic 30 min		3.987	1.252
Vibration	60 min	3.990	1.248
	90 min	3.995	1.265
Extraction Solution	methanol(50%)	3.792	1.258
	methanol(70%)	3.870	1.266
	ethanol(70%)	3.896	1.265
Extraction Method	Ultrasonic Vibration	3.981	1.259
	Circumfluence	3.906	1.257

方法(2)取本品加蒸馏水15 ml,使完全溶解,于4℃冷藏约40 min,过滤,用CHCl₃洗涤2次(每次8 ml),再用正丁醇萃取4次(每次20 ml),合并正丁醇层,水浴蒸干,用甲醇溶解并定容至刻度。

方法(3)取本品10粒,倾出内容物,混匀,精密称取0.5 g,置100 ml量瓶中,加水30 ml,使完全溶解后,再分3次加入无水乙醇70 ml,超声30 min,放冷,用70%乙醇定容至刻度,滤过。

结果显示,采用方法(1)、(2)提取后,大杂峰明显减小,但小杂峰增多,且回收率低于90%,而方法(3)操作简便,且回收率较好,因此本试验选择方法(3)为提取方法。

4 讨论

由于本品由十余味药组成,成分复杂,测定时杂质干扰较大,经过大量试验,发现无法找到一合

