

HPLC测定鼻渊滴丸中大叶茜草素含量的方法改进

左宏笛, 鲍家科, 茅向军, 王克英 (贵州省药品检验所, 贵阳 550004)

摘要:目的 借助 DAD对鼻渊滴丸中大叶茜草素的 HPLC测定方法加以改进。方法 采用 HPLC法, Diamonsil™ C₁₈为色谱柱, 流动相为甲醇-水-四氢呋喃(84:15:1), 流速:1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 35℃, 借助 DAD选择 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 和 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 双波长检测通道同时测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量, 并进行方法学验证比较。结果 大叶茜草素在 0.163 5~1.471 5 μg 内呈良好的线性关系($r_{394\text{ nm}}=0.999\ 8$; $r_{250\text{ nm}}=0.999\ 4$), 平均回收率分别为 99.83% ($\lambda_{394\text{ nm}}$)和 100.31% ($\lambda_{250\text{ nm}}$), $\text{RSD}_{394\text{ nm}}$ 为 1.16% ($n=9$)和 $\text{RSD}_{250\text{ nm}}$ 为 2.13% ($n=9$)。结论 测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量时选用 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 比 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 有较强的选择性和专属性, 方法准确可靠, 值得推广应用。

关键词 大叶茜草素; 茜草; 鼻渊滴丸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)07-0646-04

Method Improvement in the Content Determination of Mollugin in BiYuan DiWan by HPLC

ZUO Hong-di, BAO Jia-ke, MAO Xiang-jun, WANG Ke-yin (GuiZhou Institute for Drug Control, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A HPLC method for the determination of Mollugin in BiYuan DiWan was improved in virtue of DAD. **METHODS** A Diamonsil™ C₁₈ column was used with methanol-water-tetrahydrofuran(84:15:1) as mobile phase. Content was detected at double wavelength of 394 nm and 250 nm at the same time. **RESULTS** The linear range was 0.163 5~1.471 5 μg ($r_{394\text{ nm}}=0.999\ 8$; $r_{250\text{ nm}}=0.999\ 4$). The average recovery rate were 99.83% ($\lambda_{394\text{ nm}}$) and 100.31% ($\lambda_{250\text{ nm}}$), $\text{RSD}_{394\text{ nm}}=1.16\%$ and $\text{RSD}_{250\text{ nm}}=2.13\%$ ($n=9$). **CONCLUSION** It is an accurate and reliable method for the determination of Mollugin in compound preparation without interfering from other ingredients. The method can be deserved to extend application in the quality control of Mollugin in compound preparation.

KEY WORDS: Mollugin; Radix Et Rhizoma Rubiae; BiYuan DiWan; HPLC

鼻渊滴丸由鼻渊胶囊^[2]仿制而来, 该制剂由茜草、苍耳子、金银花、野菊花、辛夷五味药材组成, 具有清热解毒、通鼻窍之功效, 用于慢性鼻炎及鼻窦炎。中国药典 2005 年版一部^[1]及相关文献^[3-11]均以 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 作为检测波长测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量。但在实际工作中, 我们发现该复方制剂中大多数化学成分在 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 均有吸收, 对 HPLC 色谱的基线平稳性有影响, 不宜将大叶茜草素色谱峰及时地分离并检测。本实验研究选择 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 和 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 双波长检测通道同时测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量, 并通过方法学验证进行比较。研究发现测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量时, 选用 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 比 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 有更强的专属性和准确性, 能缩短对大叶茜草素的分析检测时间, 值得推广应用。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC-DAD (二级管阵列检测器) 及其色谱工作站; TCQ-250 超声波清洗器 (北京医疗设备二厂); XS205 电子天平 (METTLER TOLEDO); 大叶茜草素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 884-200001); 茜草对照药材 (中国药品生物制品检定所, 批号 1049-0301)。鼻渊滴丸 (批号: 050101; 050102; 050103, 规格: 60 mg/粒) 及阴性供试品由贵州

百祥制药有限责任公司生产提供。甲醇和四氢呋喃为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂、试药均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择

HPLC-DAD (二级管阵列检测器) 检测大叶茜草素色谱峰时, 可见大叶茜草素对照品在 $\lambda_{218\text{ nm}}$ 、 $\lambda_{247\text{ nm}}$ 、 $\lambda_{273\text{ nm}}$ 、 $\lambda_{282\text{ nm}}$ 和 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 均有吸收峰 (见图 1); 鼻渊滴丸色谱图中大叶茜草素色谱峰在 $\lambda_{218\text{ nm}}$ 、 $\lambda_{247\text{ nm}}$ 、 $\lambda_{273\text{ nm}}$ 、 $\lambda_{282\text{ nm}}$ 吸收值有波动 (见图 2), 而图 1、图 2 中 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 的吸收峰平缓且吸收值较为稳定, 受分离组分的干扰影响小。由此, 实验中选择 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 和 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 双波长检测通道同时测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量, 并通过方法学验证进行比较。

2.2 色谱分析条件

色谱柱采用 Diamonsil™ C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-四氢呋喃 (84:15:1); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 $\lambda_{394\text{ nm}}$ 和 $\lambda_{250\text{ nm}}$ 双通道检测; 柱温为 35℃; 进样量 10 μL 。理论板数按大叶茜草素峰计算应不低于 4 000。见图 3。

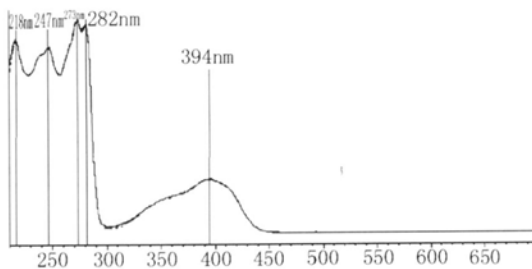


图1 大叶茜草素对照品色谱峰的紫外-可见光图谱

Fig 1 UV-Vis spectrograms of Mollugin chromatographic apex in chemical reference substance chromatograms

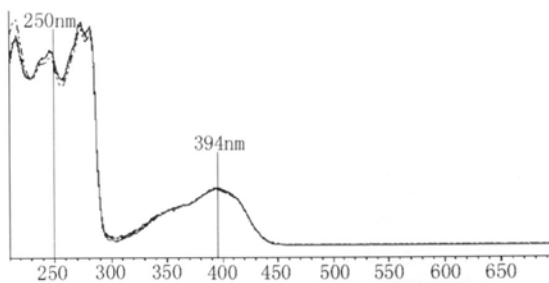


图2 鼻渊滴丸中大叶茜草素色谱峰的紫外-可见光图谱

Fig 2 UV-Vis spectrograms of Mollugin chromatographic apex in BiYuan DiWan chromatograms

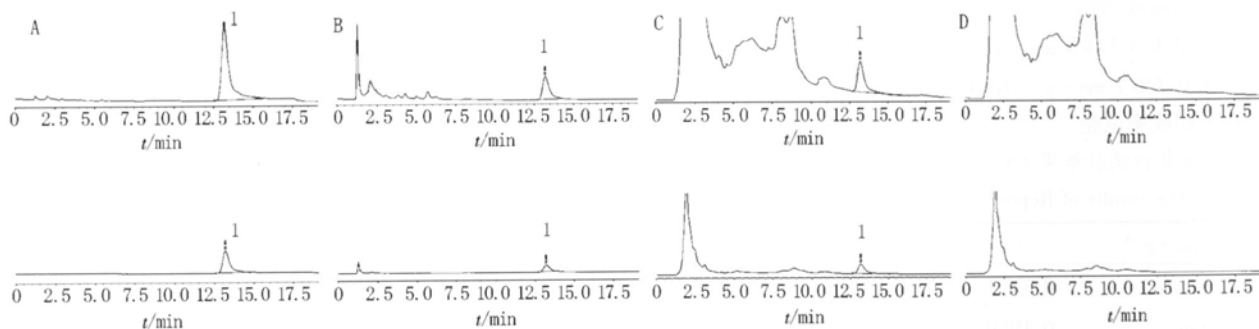


图3 鼻渊滴丸 HPLC 色谱图

A - 对照品; B - 茜草; C - 样品; D - 阴性样品; 1 - 大叶茜草素

Fig 3 HPLC chromatograms of BiYuan DiWan

A - chemical reference substance; B - Radix Et Rhizoma Rubiae; C - sample; D - negative sample without Radix Et Rhizoma Rubiae; 1 - Mollugin

2.3 对照品溶液和对照药材溶液的制备

精密称取大叶茜草素对照品 16.35 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密吸取 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (0.081 75 mg · mL⁻¹)。

取对照药材粉末 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 称定重量, 浸泡过夜, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 续滤液再用滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

2.4 供试品溶液和阴性样品溶液的制备

取本品适量, 研细, 取 6.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 15 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置分层, 上清液经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。阴性样品溶液同法制备。

2.5 标准曲线线的绘制

分别精密吸取大叶茜草素对照品溶液 (0.081 75 mg · mL⁻¹) 各 2.0, 6.0, 10.0, 14.0, 18.0 μL 进样, 按上述色谱条件进行测定 (见表 1), 由峰面积 (Y) 和进样量 (X) 绘制标准曲线, 得回归方程为:

$$Y_{250\text{nm}} = 3\,940.892\,1\,X - 32.427\,0, \quad r_{250\text{nm}} = 0.999\,5$$

$$Y_{394\text{nm}} = 1\,156.346\,0\,X - 41.422\,7, \quad r_{394\text{nm}} = 0.999\,8$$

结果表明大叶茜草素在 0.163 5 ~ 1.471 5 μg 线性关系良好。

表 1 线性关系考察 (n = 5)

Tab 1 The canvass of Linear relation (n = 5)

对照品进样量 (X)	$\lambda_{250\text{nm}}$ 峰面积	$\lambda_{394\text{nm}}$ 峰面积
0.163 5	586.102 48	157.979 00
0.490 5	1 863.341 06	522.751 77
0.817 5	3 272.689 70	890.435 06
1.144 5	4 525.993 65	1 276.609 08
1.471 5	5 698.134 77	1 671.676 03
r	0.999 5	0.999 8

2.6 精密度试验

取鼻渊滴丸供试品溶液, 连续进样 5 次, 测定峰面积积分值 (见表 2), 结果 RSD_{250nm} 为 1.09% 和 RSD_{394nm} 为 0.79%。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液 (25 °C) 分别于 0.4、8、12、18、24 h 进样测定, 测定峰面积积分值 (见表 3), 结果 RSD_{250nm} 为 0.87% 和 RSD_{394nm} 为 0.59%, 表明供试品溶液中大叶茜草素在 24 h 稳定。

2.8 专属性试验

阴性样品在大叶茜草素对照品相同保留时间处无吸收峰 (见图 3)。

2.9 重复性试验

表 2 精密度试验结果 (n = 5)

Tab 2 The results of Precision test (n = 5)

	1	2	3	4	5	平均	RSD
Y_{250nm}	3 217.987 30	3 165.271 17	3 247.564 33	3 182.002 95	3 172.251 97	3 197.015 54	1.09
Y_{394nm}	996.356 02	987.626 11	1 003.270 19	998.291 30	984.315 26	993.971 776	0.79

表 3 稳定性试验结果 (n = 6)

Tab 3 The results of Stability test (n = 6)

	0 h	4 h	8 h	12 h	18 h	24 h	平均	RSD
Y_{250nm}	3 127.265 60	3 107.990 91	3 144.719 25	3 112.006 76	3 098.254 907	3 152.557 18	3 133.299 10	0.87
Y_{394nm}	966.210 76	981.605 58	972.006 94	976.128 06	967.810 03	983.167 92	972.321 55	0.59

精密称取供试品 (050101) 各 5 份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,测定大叶茜草素的含量 (见表 4),结果 λ_{250nm} 平均含量为 $0.334 0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD_{250nm} 为 1.55%; λ_{394nm} 平均含量为 $0.346 2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD_{394nm} 为 1.19%。

2.10 回收率试验

表 4 重复性试验结果 (n = 5)

Tab 4 The results of Repetitive test (n = 5)

含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	1	2	3	4	5	平均	RSD
λ_{250nm}	0.327 1	0.338 8	0.339 5	0.332 1	0.332 6	0.334 0	1.55
λ_{394nm}	0.350 0	0.349 7	0.340 7	0.347 6	0.343 2	0.346 2	1.19

表 5 回收率试验结果 (n = 9)

Tab 5 The results of Recovery test (n = 9)

称样量 /g	λ_{250nm} 相当量 /mg	$\lambda_{32094nm}$ 相当量 /mg	加入对照品 的量 /mg	λ_{250nm} 测得量 /mg	λ_{394nm} 测得量 /mg	λ_{250nm} 回收率 /%	λ_{394nm} 回收率 /%
3.032 5	1.012 9	1.119 8	0.981 0	1.992 7	2.095 8	99.88	99.49
3.096 7	1.034 3	1.143 5	0.981 0	2.042 1	2.107 9	102.72	98.31
3.065 8	1.024 0	1.132 1	0.981 0	2.012 6	2.111 7	100.77	99.86
3.110 9	1.039 1	1.148 7	0.817 5	1.852 8	1.974 3	99.53	100.99
3.042 6	1.016 3	1.123 5	0.817 5	1.861 4	1.950 9	103.38	101.21
3.120 7	1.042 4	1.152 3	0.817 5	1.839 2	1.958 3	97.48	98.59
3.171 8	1.059 4	1.171 2	0.654 0	1.724 2	1.817 4	101.65	98.81
3.140 6	1.049 0	1.159 7	0.654 0	1.683 9	1.822 9	97.08	101.41
3.071 8	1.026 0	1.134 3	0.654 0	1.682 1	1.787 1	100.31	99.82
平均回收率 /%						100.31	99.83
RSD /%						2.13	1.16

2.11 样品测定 按上述色谱条件 (λ_{394nm}) 对批号为 050101;050102;050103 的 3 批样品进行含量测定,结果分别为 0.348,0.344,0.350 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (见表 6)。

表 6 鼻渊滴丸含量测定 (n = 2)

Tab 6 The content determination of BiYuan DiWan (n = 2)

批号	大叶茜草素含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	平均含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
050101	0.345	0.348
050102	0.342	0.344
050103	0.347	0.350

3 讨论

3.1 色谱行为及系统适用性试验

按上述色谱条件测定,鼻渊滴丸在 λ_{250nm} 色谱图中有较

精密称取供试品 (050101) 约 3.0 g ($n = 9$),分别精密加入对照品溶液 ($0.163 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 4,5,6 mL 各 3 份,按“2.4”项下方法制备所需溶液后测定其含量,计算 λ_{250nm} 平均回收率为 100.31%, RSD_{250nm} 为 2.13%, $n = 9$; λ_{394nm} 平均回收率为 99.83%, RSD_{394nm} 为 1.16%, $n = 9$ (见表 5)。

多的吸收峰,造成基线不稳,干扰较大,需调整流动相比比例推迟其出峰时间,才能得到较好的分离度;而同一进样 λ_{394nm} 色谱图中基线平稳,受杂质峰的干扰小,大叶茜草素色谱峰能基线分离,无需调整流动相即可进行积分计算。

鼻渊滴丸色谱图中大叶茜草素色谱峰在 λ_{218nm} 、 λ_{247nm} 、 λ_{273nm} 、 λ_{282nm} 吸收峰尖锐,吸收值有波动 (见图 2)。选择 $\lambda_{247nm} \pm 3 \text{ nm}$ [3-11] 为检测波长对其含量测定时,检测准确性受到一定影响。

选择 λ_{394nm} 波长测定鼻渊滴丸中大叶茜草素的含量时,理论板数和分离度均能满足中国药典 2005 版一部的要求。

3.2 目前,中国药典 [1] 和文献报道 [3-11] 测定复方制剂中大叶茜草素的含量时,均未选用 λ_{394nm} 作为检测波长。本实验

通过方法学验证,证明选用检测波长 $\lambda_{394\text{nm}}$ 比 $\lambda_{250\text{nm}}$ 有较强的专属性和准确性,图谱基线平稳,背景干扰小,能缩短对大叶茜草素的分析检测时间,快速有效地测定大叶茜草素的含量,该方法值得推广应用。

参考文献

- [1] Ch. P(2005) VolI (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 162.
- [2] 福建省药品标准 [S]. 1988: 473-474.
- [3] 程世琼,何筱毅,吕光华. DHPLC 测定消肿止痛膏中大叶茜草素的含量. 华西药学杂志, 2006, 21(4): 382.
- [4] 张振凌,周艳,张本山,等. 茜草饮片炒炭前后大叶茜草素含量比较 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 393.
- [5] 唐宇伟,孙彬贤,黄德杰. 参茜固经颗粒中大叶茜草素含量测定 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 28.
- [6] 许贯虹,朱育凤,何贵翔. 高效液相色谱法测定益肾健脾颗粒中大叶茜草素的含量 [J]. 江苏中医药, 2005, 26(12): 50.
- [7] 李敬伟,李慧超,李敬芝. 高效液相色谱法测定巴特日七味丸中大叶茜草素含量 [J]. 中国药事, 2005, 19(4): 222.
- [8] 王克英,胡奇志. HPLC 法测定复方血藤伤痛液中大叶茜草素的含量 [J]. 中国药事, 2004, 18(11): 676.
- [9] 莫日根高娃,图雅,哈斯高娃. HPLC 法测定明目二十五味丸中大叶茜草素的含量 [J]. 中国药品标准, 2003, 4(6): 342.
- [10] 周桂坤,莫日根高娃,哈斯高娃,等. RP- HPLC 法测定乌兰三味汤散中大叶茜草素的含量 [J]. 中国药事, 2003, 17(10): 624.
- [11] 吴善雨. 反相高效液相色谱法测定鼻渊胶囊中大叶茜草素的含量 [J]. 海峡药学, 2002, 14(5): 59.

收稿日期: 2007-08-21