高效液相色谱法测定牛黄上清片中连翘苷含量

谭志艺，刘永路

（广东省云浮市药品检验所，广东 云浮 527300）

摘要：目的 建立测定牛黄上清片中连翘苷含量的高效液相色谱（HPLC）法。方法 色谱柱为 Diamonsil（钻石）C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈 – 水（25∶75），检测波长为 230 nm，流速为 1.0 mL/min，柱温为 30 ℃。结果 连翘苷进样量在 0.08 ~ 1.00 μg 范围内与峰面积线性关系良好（r = 0.999 9），平均加样回收率为 99.66%，RSD = 0.78%（n = 6）。结论 HPLC 法简便、灵敏、准确、重复性好，可用于牛黄上清片的质量控制。

关键词：黄连上清片；连翘苷；高效液相色谱法；含量

中图分类号：R284.1；R286.0 文献标识码：A 文章编号：1006 – 4931（2010）18 – 0036 – 01

牛黄上清片由人工牛黄、大黄、连翘、黄芩、当归等 19 味中药制成，具有清热泻火、散风止痛的功效，可用于治疗头痛眩晕、目赤耳鸣、口舌生疮、咽喉肿痛、大便燥结等[1]。该药原标准中无连翘苷含量测定项，为有效控制其质量，笔者采用高效液相色谱（HPLC）法测定方中连翘中连翘苷的含量，结果满意。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）。连翘苷对照品（中国药品生物制品检定所，批号为 110821 – 2007117）；样品 1（鹤壁市中药有限公司，批号为 1004012）；样品 2（鹤壁市中药有限公司，批号为 1004021）；样品 3（河南省百泉制药有限公司，批号为 090312）；乙腈（色谱纯），水（超纯水），其他试剂（分析纯）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件[2]

色谱柱：Diamonsil（钻石）C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈 – 水（25∶75）；检测波长：230 nm；流速：1.0 mL/min；柱温：30 ℃。理论板数按连翘苷峰计算达 3 500 以上。

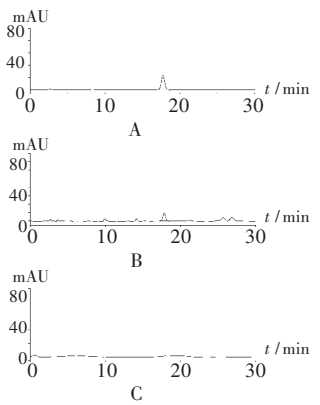
2.2 溶液制备

精密称取连翘苷对照品适量，置量瓶中，用甲醇溶解并制成 40 μg/mL 的溶液即得对照品溶液。取牛黄上清片 20 片，除去糖衣，称定总质量，研细，混匀，精密称取 1.4 g，置具塞锥形瓶中，称定质量，精密加入甲醇 25 mL，密塞，超声处理 30 min，取出，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，滤液蒸干，残渣加水 20 mL 使溶解，用三氯甲烷振摇提取 3 次，每次 20 mL，合并三氯甲烷液，回收至干，残渣用 50% 甲醇溶解，转移至 5 mL 量瓶中，加 50% 甲醇至刻度，滤过即得供试品溶液。按处方比例及工艺制备不含连翘的样品适量，按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验：精密吸取对照品、供试品及阴性对照品溶液各 10 μL，分别进样测定。结果阴性对照品溶液色谱图中在连翘苷峰相应的保留时间附近无干扰峰检出（图 1）。

线性关系考察：精密吸取质量浓度为 40 μg/mL 的对照品溶液 1，2，5，8，15，25 μL，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。以峰面积 Y 为纵坐标、连翘苷对照品进样量 X 为横坐标绘制标准曲线，回归方程为 Y = 71.307 X + 0.133 8，r = 0.999 9（n = 6）。结果表明，连翘苷进样量在 0.08 ~ 1.00 μg 范围内与峰面积有良好的线性关系。



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白溶液

图 1 高效液相色谱图

精密度试验：精密吸取对照品溶液 10 μL，重复进样 6 次，记录色谱图。结果峰面积的 RSD = 0.23%（n = 6），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：精密吸取同一供试品溶液 10 μL，分别在 0，1，2，4，8，18，24 h 时测定峰面积。结果的 RSD 为 0.7%（n = 7），表明待测溶液至少在 24 h 内稳定。

重现性试验：取同一批号的样品 6 份，依法测定。结果的 RSD 为 0.54%（n = 6），说明方法的重现性良好。

加样回收试验：精密称取已知含量的样品 6 份，分别精密加入连翘苷对照品适量，依法测定其含量，求出加样回收率。结果见表 1。

表 1 连翘苷加样回收试验结果（n = 6）

样品含量（μg）	加入量（μg）	测得量（μg）	回收率（%）	$\bar{X}$（%）	RSD（%）
0.303 2	0.150 5	0.452 5	99.20	99.66	0.78
0.303 2	0.151 3	0.454 1	99.73		
0.303 2	0.225 7	0.526 6	98.98		
0.303 2	0.226 4	0.531 9	101.01		
0.303 2	0.306 8	0.610 1	100.03		
0.303 2	0.310 8	0.611 0	99.03		

2.4 样品含量测定

精密吸取对照品及供试品各 10 μL，分别注入高效液相色谱仪，记录峰面积，按外标法计算含量。结果样品 1、样品 2、样品 3 的连翘苷含量分别为 10.35，10.08，25.56 μg/片。

3 讨论

笔者考察了甲醇、70% 乙醇溶液、50% 甲醇溶液 3 种提取溶剂，230 nm 和 277 nm 两种检测波长，乙腈 – 水（25∶75）、乙腈 – 水 – 冰醋酸（25∶75∶0.1）两种流动相。结果以甲醇溶液为提取溶剂、230 nm 为检测波长、乙腈 – 水（25∶75）为流动相的效果较好，在此条件下色谱分离和线性关系良好，重现性及回收率结果均符合要求。

参考文献：

[1] WS_3 – B – 1509 – 93，卫生部药品标准 · 中药成方制剂（第八册）[S].

[2] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：化学工业出版社，2005：589.

（收稿日期：2009 – 10 – 23）

中国科技论文统计源期刊《中国药业》欢迎医药卫生界广大读者踊跃投稿！