

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.04.008

高效液相色谱法测定妇炎灵洗剂中连翘苷含量*

陈路¹, 翟炎妹², 闫炳雄¹, 吴无畏¹, 宋志军¹, 缪剑华^{1△}

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西南宁 530023; 2. 桂林医学院, 广西桂林 541004)

摘要:目的 建立测定妇炎灵洗剂中连翘苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Agilent XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(21:79, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 277 nm。结果 连翘苷进样量在 0.472 0~4.720 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好;连翘苷平均回收率为 99.47%, RSD 为 1.67% (n=9)。结论 该方法快速, 灵敏, 操作简便, 可作为妇炎灵洗剂含量的控制依据, 可供妇炎灵洗剂质量控制标准和相关研究参考。

关键词:妇炎灵洗剂;连翘苷;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R284.1;R271.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)04-0023-03

Content Determination of Forsythin in Fuyanling Lotion by HPLC

Chen Lu¹, Zhai Yanmei², Yan Bingxiong¹, Wu Wuwei¹, Song Zhijun¹, Miao Jianhua^{1△}

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi, China 530023; 2. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China 541004)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the content determination of forsythin in Fuyanling Lotion. **Methods** The Agilent XDB C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was acetonitrile-water (21:79, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 277 nm. **Results** The forsythin showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.472 0~4.720 0 μg, the average recovery was 99.47% and RSD was 1.67% (n=9). **Conclusion** This method is quick, sensitive and easy to operate, it can be used for the content control, reference in quality standard and related research of Fuyanling Lotion.

Key words: Fuyanling Lotion; forsythin; HPLC; content determination

现代临床医学认为,对于妇科炎症的治疗,应多应用抗生素。但各类抗生素应用存在极大局限性,且耐药菌株逐年增多,出现不良反应的概率越来越大,已无法满足人们的需求^[1-2]。目前,中药治疗妇科病不仅能取得较好的疗效,且无明显不良反应,安全性极高^[3]。通过近 10 年的应用发展,中成药洗液已成为医院重要的妇科炎症外用制剂^[4]。妇炎灵洗剂是 20 世纪 90 年代,广西妇幼保健院在收集壮族民间验方和整理临床用药经

验的基础上创制出来的中药外用洗剂,由山银花、连翘、黄芩、黄柏、白花蛇舌草、大血藤、三棱、莪术、丹参、赤芍等药材经科学组方,具有清热解毒、通络活血之功效,主要用于盆腔炎、附件炎、子宫颈炎、霉菌、滴虫、真菌性阴道炎、外阴瘙痒,以及男女溃疡性化脓性生殖器炎症等。目前,该制剂已在临床应用 23 120 多例,对妇科疾病的防治工作起到了巨大作用,但目前该洗剂尚未建立质量控制标准。为此,笔者建立了测定连翘苷含量的高效液

*基金项目:广西卫生和计划生育委员会中药壮瑶药制剂提升工程项目[GZZJ16-09]。

第一作者:陈路,男,助理研究员,研究方向为中药和中药相关产品开发,(电子信箱)chenlulu982@hotmail.com。

△通信作者:缪剑华,男,博士研究生,研究员,主要研究方向为中药产品开发,(电子信箱)mjh1962@vip.163.com。

加工后受其他药材染色的影响,色较暗,与投料用的盐杜仲在特征上虽有一定差异,但很难观察。此外,杜仲药材所具有的石细胞显微特征,在制剂中并不具唯一性。因此,不对杜仲进行显微鉴别。

参考文献:

- [1] 林向前. 杜仲片提取工艺研究[J]. 中国药业, 2013, 22(13): 32-33.
- [2] 邵红燕, 张和明, 刘志海. 骨质增生贴质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2563-2564.
- [3] 王丽聪, 李松. 苦参配方颗粒质量控制研究[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 471-473.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 3-4, 57-59.

- [5] 杨艳, 郝丽晓, 李利芬, 等. 对中药材市场丹参质量的考察[J]. 科技情报开发与经济, 2004, 14(2): 125-126.
- [6] 夏荃. 祛斑胶囊质量控制方法的研究[J]. 陕西中医学院学报, 2006, 29(2): 64-65.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 105.
- [8] 杨培, 李建, 徐蓓, 等. 黔产山银花栽培品种的鉴定与含量测定[J]. 中国药业, 2007, 16(16): 20-21.
- [9] 刘会前, 李成网. 十四味连黄烧伤软膏的制备与质量控制[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(16): 1401-1403.
- [10] 李虹. 肾石通颗粒质量标准的研究[J]. 中国药品标准, 2010, 11(3): 176-179.

(收稿日期:2017-11-28)

相色谱(HPLC)法,现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Varian 210 型高效液相色谱仪(美国瓦里安公司); CP224S 型十万分之一天平(Sartorius 公司); UV-1240 型紫外可见光光度计(Shimadzu 公司)。

1.2 试剂

连翘苷对照品(批号为 110821-201615,供含量测定用,中国食品药品检定研究院);妇炎灵洗剂(广西妇幼保健院自制);甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为 20160719);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent XDB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(21:79);检测波长:277 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:称取连翘苷 94.40 mg,精密称定,置 200 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,即得对照品贮备液(质量浓度为 0.472 0 g/L);再精密量取以上对照品贮备液 5 mL 置 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液(质量浓度为 0.236 0 g/L),微孔滤膜滤过,即得。

供试品溶液:精密量取妇炎灵洗液 10 mL,水浴蒸干,加 50% 甲醇溶解,置 25 mL 容量瓶中,并定容至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

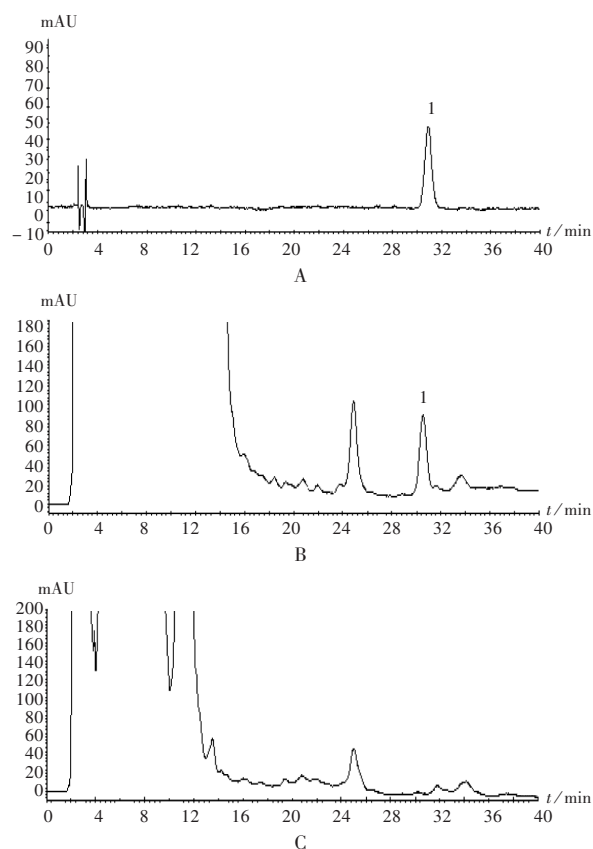
阴性对照品溶液:精密量取不含连翘的阴性样品 10 mL,蒸干,加 50% 甲醇溶解,置 25 mL 容量瓶中,并定容至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取 2.2 项下 3 种溶液各 10 mL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果显示,连翘苷色谱峰分离效果良好,且阴性对照品溶液在相同保留时间处未见干扰,系统适用性良好,专属性强,详见图 1。

线性关系考察:分别精密量取连翘苷对照品贮备液(0.472 0 g/L)1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL,置 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,依法测定。以峰面积(Y)为纵坐标、进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程 $Y = 10.088X - 0.9099$, $R^2 = 0.9997$ ($n = 10$)。结果表明,连翘苷进样量在 0.472 0 ~ 4.720 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:吸取同一连翘苷对照品溶液(0.2360 g/L),



1. 连翘苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 妇炎灵洗剂高效液相色谱图

连续重复进样 6 次,依法测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.75% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批样品(批号为 170201),依法制备供试品溶液,分别于 0,1,2,4,8,12 h 时注入液相色谱仪,依法测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.66% ($n = 6$),表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

重复性试验:精密量取妇炎灵洗剂样品(批号为 170201)10 mL,共 6 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果连翘苷的平均含量为 0.586 8 g/L, RSD 为 1.44% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知连翘苷含量的样品 5 mL(含连翘苷 0.586 8 g/L),分别精密加入上述对照品贮备液 3,6,9 mL,低、中、高质量浓度各 3 份,制备测定,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

分别取不同批号的妇炎灵洗剂 10 批,依法制备供试品溶液,并进样测定,计算连翘苷含量。结果批号为 170201, 170202, 170203, 170204, 170206, 170223, 170226, 170228, 170301, 170302 的样品中连翘苷含量分别为 0.586 8, 0.426 9, 0.361 0, 0.339 0, 0.354 2, 0.357 7, 0.428 3, 0.376 6, 0.426 9, 0.426 9 g/L。

表1 妇炎灵洗液的加样回收试验结果($n=9$)

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
2.982	1.416	4.387 2	99.24		
2.982	1.416	4.360 2	97.33		
2.982	1.416	4.382 8	98.93		
2.982	2.832	5.800 8	99.53		
2.982	2.832	5.880 0	102.33	99.47	1.67
2.982	2.832	5.855 1	101.45		
2.982	4.248	7.146 2	98.03		
2.982	4.248	7.246 2	100.38		
2.982	4.248	7.146 6	98.04		

3 讨论

3.1 质量评价指标选择

参考文献[5-8],对妇炎灵洗剂中6味中药(山银花、连翘、黄芩、黄柏、丹参、赤芍)进行分析,以建立最佳质量评价指标。处方中的山银花、黄芩、黄柏、丹参、赤芍中的主要成分为绿原酸、黄芩苷、小檗碱、丹参酮Ⅱ_A、芍药苷,在分析时有阴性干扰,且不易排除,故暂不作为本处方的质量评价指标。连翘中连翘苷因无阴性干扰,同时在处方中为君药,能清热解毒,既善解在里之热毒,又能散气血凝聚、去脓腐,并能疏风止痒^[9-10]。现代研究表明,连翘苷具有明显的抗菌、抗炎和解热作用,且化学性质稳定^[11-13]。因此,以连翘苷作为妇炎灵洗剂的质量评价指标。

3.2 样品处理方法选择

样品的制备方法,摸索了80%醇沉蒸干后甲醇溶解,乙酸乙酯萃蒸干后甲醇溶解^[14],过固相萃取柱蒸干后甲醇溶解,过中性氧化铝柱蒸干后甲醇溶解,直接甲醇溶解,80%醇沉蒸干后50%甲醇溶解,用固相萃取柱过滤蒸干后50%甲醇溶解,过中性氧化铝柱蒸干后50%甲醇溶解^[15],蒸干后50%甲醇溶解等处理方法。研究表明,以蒸干后50%甲醇制备的样品,溶解度大,既易行又无阴性干扰。

3.3 流动相选择

参考文献[16],曾选用乙腈-水(25:78)作流动相,结果连翘苷与样品中其他峰的分度小且峰形不好,还采用不同比例的乙腈-水系统,比较样品的出峰时间、理论板数、分离度和峰形(对称性),故最终选择了本方法的流动相比比例[乙腈-水(21:79)],其保留时间虽长,但分离度高,柱效高,理论板数按连翘苷计算应不低于10 000。采用本方法的流动相测定妇炎灵洗剂中连翘苷的含量,回收率高,线性关系良好,且测定条件易于操作。

3.4 色谱柱选择

曾采用Kromasil 100-5 C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),

Agilent XDB C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)测定样品溶液。以Kromasil为色谱柱测得样品溶液的分度度虽较好,但保留时间较长,因而不被采用;而Diamonsil色谱柱测得样品溶液的峰形差,而不作选择;Agilent XDB C₁₈色谱柱测得样品溶液中的连翘苷的保留时间虽长,但与前后杂质峰的分度度均大于1.5,且峰形和分度度均良好,符合《中国药典》规定。

3.5 检测波长的选择

称取连翘苷对照品0.22 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,稀释5倍后,在190~600 nm波长处测定吸光度。结果连翘苷在277 nm波长处有一平滑、明显的吸收峰,故选择277 nm为测定波长。

参考文献:

- [1] 刘克玲,张德英,王临虹,等. 中国部分城市已婚妇女妇科常见病流行病学调查[J]. 中国妇幼保健,2001,16(5):298-300.
- [2] 韦秋华. 广西区4738例妇女病普查结果分析[J]. 卫生软科学,2008,22(6):502-503.
- [3] 张丽伟. 妇科消炎片治疗妇科炎症的疗效观察[J]. 临床医药文献杂志,2015,2(21):4381-4382.
- [4] 颜芬,陈静. 妇科外用门诊住院使用情况分析[J]. 安徽医药,2005,9(9):703.
- [5] 黄鸣清,谢友良,王德杭,等. HPLC同时测定妇炎康片中芍药苷、丹酚酸B、小檗碱[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,22(17):68-71.
- [6] 潘勇,刘丰贤,邹辉. HPLC法测定中风通络丸中丹参酮Ⅱ_A和丹酚酸B的含量[J]. 湖南师范大学学报,2014,11(2):91-93.
- [7] 景巧敏,杨墨. HPLC测定复方黄柏液中连翘苷的含量[J]. 食品与药品,2009,11(11):37-39.
- [8] 李锦炎,吴洪文. HPLC同时测定山银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J]. 北方药学,2013,10(8):10-11.
- [9] 邹琼宇,邓文龙,蒋舜媛,等. 连翘果实中的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(1):57-60.
- [10] 吴艳芳,王新胜,袁永亮,等. 连翘化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(15):2052-2054.
- [11] 胡竟一,雷玲,余悦. 连翘的抗炎解热作用研究[J]. 中药药理与临床,2007,23(3):51.
- [12] 简永耀,靳龙文. 连翘的化学成分及药理研究[J]. 淮海医药,2009,27(4):349-350.
- [13] 史洋,王小平,白吉庆,等. 连翘抗菌、抗病毒的药理作用研究[J]. 中国现代中药,2013,15(11):950-952.
- [14] 姚文冰. HPLC法测定痰热清注射液中的黄芩苷和连翘苷的含量[J]. 中国药师,2011,14(10):1479-1480.
- [15] 万莉,王益平,潘小华. HPLC测定复方银桔糖浆中连翘苷的含量[J]. 中成药,2008,30(1):151-152.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:170-171.

(收稿日期:2017-09-05)