

• 方法学交流 •

HPLC 法梯度洗脱测定复方决明子滴眼中阿魏酸的含量

曹红 靳守东 刘云(总后卫生部药品仪器检验所 北京 100071)

摘要 目的:建立复方决明子滴眼中阿魏酸的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱梯度洗脱法,选用 Kromasil C₁₈(5 μ m, 4.6 $\times$ 250mm)色谱柱,流动相为乙腈(A)—0.1%冰醋酸(B)(20:80),采用梯度洗脱:0min,20%A;12min20%A;13min80%A;16min80%A;20min20%A。运行时间:30min;检测波长 323nm。结果:阿魏酸在 0.01824~0.5472 μ g 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9998$;样品的平均加样回收率为 100.30%,RSD1.83%($n=7$)。结论:本法简便,快速,可用于复方决明子滴眼液的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;复方决明子滴眼液;阿魏酸

Determination of Ferulic acid in Fufang Juemingzi Eye Drops by Gradient High Performance Liquid Chromatography

Cao Hong, Jin Shoudong, Liu Yun(Institute for Drug and Instrument Control of PLA, Beijing 100071)

Abstract Objective: A gradient elution method was developed for determination of ferulic acid in FuFang Juemingzi eye drops by high performance liquid chromatography (HPLC). **Method:** Kromasil C₁₈ was used as the stationary phase, acetonitrile with 0.1% acetic acid was used as mobile phase, and the photodiode array detector was used at 323nm. **Results:** The calibration curve was linear over the range of 0.01824 μ g~0.5472 μ g($r=0.9998$). The mean recovery of the method was 100.30%, RSD 1.83% ($n=7$). **Conclusion:** The results showed that this method was reliable and accurate. The method was applied to separate and determine the ferulic acid in FuFang Juemingzi.

Key words ferulic acid; FuFang Juemingzi eye drops; high performance liquid chromatography; gradient

复方决明子滴眼液是由决明子、当归等十几味中药组成的复方制剂,具有明目退翳之功效,本品在控制和减缓白内障的发生和发展方面效果显著。阿魏酸是处方中当归里所含的主要成分,对阿魏酸的含量测定方法,文献报道有薄层扫描法^[2],高效液相色谱法^[2]等。本试验采用了检测灵敏度高、准确度及精密度好的高效液相色谱法。

1. 仪器与试剂

惠普 HP-1050 四元梯度泵;HP-1050 DAD 检测器;HP-1100 自动进样器;HP-1100 在线脱气机;HP 化学工作站(美国惠普);HP 6L gold 打印机。

试剂:乙腈为色谱纯;甲醇、冰醋酸等其它试剂均为分析纯。

对照品:阿魏酸 ferulic acid(供含量测定用)(中国药品生物制品检定所提供)。

样品:解放军第二零六医院提供。

2. 色谱分析条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(5 μ m, 4.6 $\times$ 250mm)分析

柱;流动相:A. 乙腈,B. 0.1%冰醋酸;流速 1.0ml/min;检测波长 323nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;运行时间:30min;采用梯度法(见表 1)分离测定。

表 1 测定阿魏酸的梯度表

流动相 *	0	12min	13min	16min	20min
A	20%	20%	80%	80%	20%
B	80%	80%	20%	20%	80%

* A. 乙腈,B. 0.1%醋酸。

3. 溶液的制备

3.1 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 20 μ g 的阿魏酸对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备 精密量取本品 15.0ml,置分液漏斗中,加盐酸 2ml,充分振摇,加醋酸乙酯提取 5 次,每次 20ml,合并醋酸乙酯提取液,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,并定容至 10ml,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

4. 方法学考察

4.1 空白试验 按处方量制备缺当归药材的阴性对照溶液,照文中所述含量测定方法操作,结果

空白溶液在与阿魏酸对照品相同保留时间处,未显示明显色谱峰,认为无干扰(见图 1C)。

4.2 样品溶液稳定性试验 将待测样品溶液,在室温下贮存,分别于 0,1,3,5,6,8,12 小时,定期测定含量。结果 7 次含量的 RSD 为 1.41%,结果表明阿魏酸在本项试验的条件下,至少可以稳定 12 小时。

4.3 仪器的精密度试验 精密吸取阿魏酸对照品溶液 10 μ l,重复进样 10 次,测量峰面积,结果峰

面积的 RSD 值为:1.06%。

4.4 线性关系的考察 分别精密吸取阿魏酸对照品溶液(0.01824mg/ml)1、3、6、8、10、15、20、25、30 μ l,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,以阿魏酸进样量(μ g)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为: $Y=5266.2351X+3.7719$ 相关系数 $r=0.9998(n=9)$ 。

结果表明,阿魏酸在 0.01824~0.5472 μ g 范围内呈良好的线性关系。

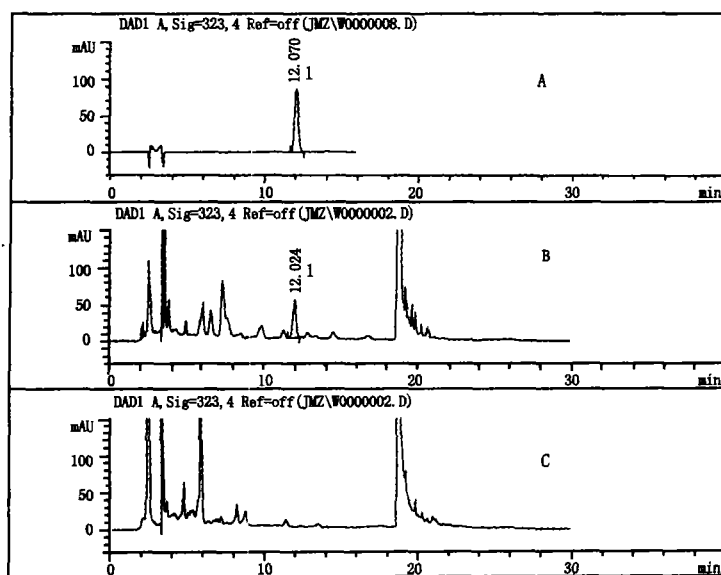


图 1 复方决明子滴眼液 HPLC 色谱图

A. 对照品溶液 B. 样品溶液 C. 阴性空白对照溶液 1 阿魏酸峰

4.5 样品测定方法的重现性试验 取同一批号的复方决明子滴眼液(000823),按供试品溶液制备方法制备,并测定其含量,重复测定 7 次,结果复方决明子滴眼液(000823)的平均含量为:8.615 μ g/ml, RSD=1.21%($n=7$),结果表明:该方法重现性良好。

表 2 复方决明子滴眼液加样回收率试验结果($n=2$)

取样量 (ml)	相当阿魏酸 的量(μ g)	加入阿魏酸 的量(μ g)	测得量 (μ g)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
7.5	64.61	63.84	129.85	102.19		
7.5	64.61	63.84	127.90	99.14		
7.5	64.61	63.84	129.46	101.58		
7.5	64.61	63.84	127.95	99.22	100.30	1.83
7.5	64.61	63.84	129.83	102.16		
7.5	64.61	63.84	126.72	97.29		
7.5	64.61	63.84	128.79	100.53		

4.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的同一批样品(000823)7.5ml,精确加入阿魏酸对照品,按文中供试品溶液的制备方法操作,测定其含量,并计算回收率,测定结果见表 2。

5. 样品测定

5.1 样品测定方法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ l,注入高效液相色谱仪,外标法测定,计算,即得。

5.2 样品测定结果 按样品测定方法测定复方决明子滴眼液,结果见表 3

表 3 复方决明子滴眼液的测定结果($n=2$)

批号	阿魏酸含量(μ g/ml)
000603	9.482
000612	8.601
000621	8.560
000711	9.550
000823	8.615
000916	8.580

6. 讨论

6.1 提取方法、提取溶剂的选择 由于阿魏酸的酚酸性结构,对供试品溶液我们采用先酸水解,后用醋酸乙酯提取的方法。对所用的提取溶剂,曾试验选用乙醚,这样所提取的其它干扰组分较少,但阿魏

酸的含量经计算与醋酸乙酯提取所得的含量相差较大,用醋酸乙酯作溶媒分别提取 5 份样品,与用乙醚作溶媒分别提取 5 份样品,所测定的阿魏酸的含量进行比较,结果所测阿魏酸的含量前者是后者的约 1.9 倍,故文中选择了醋酸乙酯作为提取的溶剂。

6.2 色谱条件的选择 由于复方决明子滴眼液成分复杂,醋酸乙酯提取液中的其它杂质较多,给分离带来一定的难度,在本项试验中,我们采用了梯度洗脱的方法,许多极性较弱的组分在随后的流动相的改变过程中,一起带出,有利于色谱柱的长期使用。采用梯度洗脱,由于仪器很稳定,图谱的重复也非常好。

6.3 测定波长的选择 对阿魏酸对照品溶液在 190~600nm 波长范围内进行光谱扫描,阿魏酸在 217nm、235nm、300nm、323nm 处有最大吸收,以 323nm 为最强,并且,供试品色谱中在阿魏酸出峰

处可以达到基线分离,故选定 323nm 作为测定波长。同时对阿魏酸对照品溶液和样品溶液中阿魏酸峰分别进行光谱扫描,结果表明两者的光谱一致。(见图 2)

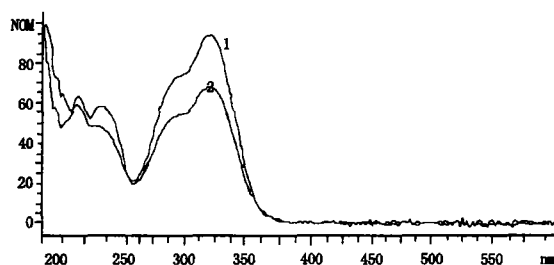


图 2 阿魏酸色谱峰的光谱扫描

1 对照品溶液中阿魏酸峰 2 样品溶液中阿魏酸峰

参考文献

- [1] ChP(中国药典)2000, Vol 1 (一部):101,112,139,114
[2] 王宝琴. 中成药质量标准与标准物质研究. 北京,中国医药科技出版社,1994:113,323,324,382,390,401,439,519

HPLC 法测定复方杜仲口服液中淫羊藿苷的含量

罗曼 陈万里(贵州省药品检验所 贵阳 550004)

摘要 目的:建立 HPLC 法测定复方杜仲口服液中淫羊藿苷的含量。方法: C_{18} 柱,乙腈—水(27:73)为流动相,检测波长 270nm。结果:在本法条件下淫羊藿苷与共存杂质达基线分离,在 $4.7 \sim 23.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内峰面积与浓度成线性关系,方法回收率为 98.84%,RSD% 为 1.06%($n=5$)。结论:方法简便,结果准确,可作为复方杜仲口服液的质量控制方法。

关键词 高效液相色谱法;淫羊藿苷

Determination of the icariin in Compound eucommia bark oral Solution by HPLC

Luo man, Chen wanli (GuiZhou Provincial Institute for Drug Control, GuiYang, 550004)

Abstract **Objective:** To develop a method for the determination of the icariin in Compound eucommia bark oral Solution by HPLC. **Method:** Column: Shimadzu C_{18} , Mobile Phase: acetonitrile-water (27:73), Detection wavelength: 270nm. **Results:** A satisfactory separation among icariin and related impurities was obtained. The calibration curve was liner in the range of $4.7 \sim 23.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for icariin. The mean recovery of icariin was 98.8%, RSD% = 1.06% ($n=5$). **Conclusion:** This method developed is more simple and reliable and could be used for quality control of compound of eucommia bark oral solution.

Key words HPLC; icariin

复方杜仲口服液系由杜仲叶,菟丝子,淫羊藿,绞股蓝等药材经适宜的加工提取制成,具有治疗中老年肝肾亏虚、体弱、高血压、高血脂的功效。但原质量标准[黔 D/WS—785—95]较为简单,本文采用高效液相色谱法对其中主要功效成份淫羊藿所含的淫羊藿苷进行了定量测定,为复方杜仲口服液提供了定量的质量控制方法。

一、仪器与试剂

岛津 LC-10vp 高效液相色谱仪,岛津 SPD-10Avp 紫外检测器,7725i 自动进样器,ANNSTAR 色谱工作站;淫羊藿苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(含量测定用);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

二、实验方法与结果

1. 色谱条件 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶柱(SHIMADZU, VP-ODS, 150×6.0);流动相:乙