

图 1 HPLC 色谱图

A. 对照品; B. 样品; C. 空白样品

Fig1 HPLC chromatograms

A. chemical reference standard; B. sample; C. blank sample

为横坐标,得胡椒碱的回归方程为: $A = 115.111C - 129.327$, $r = 0.9996$ ($n = 6$),结果表明,胡椒碱在 $2.5 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内峰面积与其浓度呈良好线性关系。

2.5 精密性试验 精密吸取胡椒碱对照品溶液 ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$,在上述色谱条件下重复进样 5 次,测得胡椒碱溶液的平均峰面积为 4886.106 ,RSD 为 0.89% ,表明精密性良好。

2.6 重复性试验 取同一批号样品(批号 20050816)5 份,照“2.2.2”项下方法平行操作制备供试品溶液,在上述色谱条件下各进样 $20 \mu\text{L}$,RSD 为 0.64% ,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取重复性试验中第 5 份供试品溶液进行稳定性试验,在上述色谱条件下,分别于 $0, 2, 4, 8, 12 \text{ h}$ 进样测定,结果表明胡椒碱的峰面积在 12 h 内稳定,RSD 为 1.16% ($n = 5$)。

2.8 加样回收率试验 精密取已知含量的胡椒碱对照品(含量为 $26.86 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)适量 3 份,分别精密加入低、中、高 3 种不同浓度的胡椒碱对照品适量,照“2.2.2”项下方法制备,按样品测定方法测定胡椒碱含量,每个浓度测定 3 次,计算回收率及 RSD。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 3$)

Tab 1 Results of recovery test ($n = 3$)

| 样品含量/ mg | 加入量/ mg | 测得量/ mg | 回收率/ $\%$ | RSD/ $\%$ |
|-------------------|------------------|------------------|-----------|-----------|
| 0.537 2 | 0.45 | 0.975 6 | 97.42 | 0.32 |
| 0.537 2 | 0.55 | 1.075 8 | 97.93 | 0.28 |
| 0.537 2 | 0.65 | 1.178 7 | 98.69 | 0.13 |

2.9 样品含量测定 取不同批号样品各 20 片膜,分别照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”色谱条件下测定,每批样品测定 3 次,取平均值,用外标法计算胡椒碱含量。结果批号为 20050206, 20050610, 20050729, 20050816 样品中胡椒碱的含量分别为 $27.01, 27.07, 27.89, 26.86 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,平均含量为 $27.21 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,RSD 为 1.70% 。故暂定每片胡椒碱对照品的胡椒碱含量质控定量限为 0.026 mg 。

3 讨论

3.1 提取方法的选择 本试验对样品的提取方法进行了探索,以 70% 乙醇为溶剂,先后用超声、冷浸和加热回流法提取,结果表明加热回流法提取率最高,且超声法和冷浸法提取样品重复性差,故本试验采用加热回流法提取。

3.2 波长的选择 取胡椒碱对照品溶液(浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),以无水乙醇为空白,在 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 范围内进行扫描,显示胡椒碱对照品在 343 nm 处有最大吸收。所以本试验采用波长 343 nm 进行含量测定。

3.3 流动相的选择 试验中曾反复试用过不同比例的甲醇和水作为流动相进行分离,结果甲醇-水 ($70:30, \text{V/V}$) 能使样品峰与相邻杂质峰达到基线分离,并在流动相中加入 0.1% 三乙胺消除胡椒碱吸收峰拖尾现象。

本结果表明,本法操作简便、准确、重复性好,空白对照无干扰,可用于胡椒碱对照品的质量控制。

参考文献:

- [1] 中国药典.一部[S].2005.168.
- [2] 焦丽萍,于培明,孙合新,等. HPLC 法测定骨刺酊中胡椒碱的含量[J].河南大学学报(医学科学版),2003,22(2):21-23.
- [3] 陶淑娟,王桂燕,毕开顺. HPLC 法测定蒙药那如-3 丸中胡椒碱的含量[J].沈阳药科大学学报,2004,21(1):35-37.

[收稿日期]2005-09-22

高效液相色谱法测定银黄软胶囊中绿原酸和黄芩苷的含量

谢东,高彩虹 (广西壮族自治区食品药品检验所,广西南宁 530021)

[摘要] 目的:建立银黄软胶囊含量测定方法。方法:采用 HPLC 法测定。色谱柱:Kromasil C_{18} 柱,流动相:乙腈- 0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长: 318 nm ,柱温: 35°C 。结果:绿原酸在进样量为 $9.89 \sim 988.80 \text{ ng}$ 范围内呈良好的线性关系 ($r = 0.9999$);平均加样回收率为 102.38% ,RSD 为 1.82% ($n = 6$);黄芩苷在进样量为 $0.04 \sim 3.99 \mu\text{g}$ 范围内呈良好的线性关系 ($r = 0.9995$);平均加样回收率为 97.90% ,RSD 为 1.79% ($n = 6$)。结论:该法操作简便易行、准确可靠,可用于银黄软胶囊的质量控制。

[关键词] 银黄软胶囊;绿原酸;黄芩苷;高效液相色谱法
[中图分类号] R927 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213 (2006)05-0631-02

银黄软胶囊是由金银花、黄芩提取物加工制成的软胶囊剂,是银黄片的改剂型产品,由于金银花提取物中含有与绿原酸结构相似的化合物,采用紫外法无法有效排除其干扰^[1,2]。本实验采用 HPLC 法,以梯度洗脱,可同时测定两者含量,现报道如下。

1 材料

Waters2695 高效液相色谱仪, Waters2487 紫外检测器。黄芩苷、绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所);银黄软胶囊样品(桂林集琦制药股份有限公司,批号 20031101、20031102、20031103);缺金银花提取物的阴性样品、缺黄芩提取物的阴性样品(桂林集琦制药股份有限公司);乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C_{18} 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$),检测波长: 318 nm ;柱温: 35°C ;进样量: $10 \mu\text{L}$;流动相:以乙腈为流动相 A, 0.1% 磷酸为流动相 B,梯度洗脱, $0 \sim 9 \text{ min}$, $12\% \text{ A}$; $10 \sim 22 \text{ min}$, $26\% \text{ A}$; 23 min 以后, $12\% \text{ A}$ 理论塔板数 (n) 为 5000 以上。在以上色谱条件下,绿原酸保留时

[作者简介] 谢东,男,学士,副主任中药师,电话:0771-2611653

间约为 7.8 min, 黄芩苷保留时间约为 20.2 min, 见图 1。

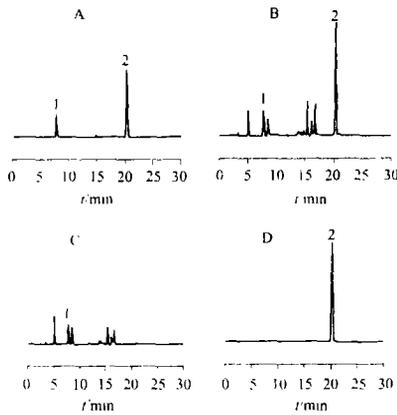


图 1 对照品; 样品及阴性供试品的色谱图
 A. 绿原酸、黄芩苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照(缺黄芩提取物); D. 阴性对照(缺金银花提取物); 1-绿原酸($t_R = 7.8$ min); 2-黄芩苷($t_R = 20.2$ min)

Fig 1 HPLC chromatograms of the reference and sample
 A. reference substances; B. sample; C. negative sample (without the root of large-flowered skullcap); D. negative sample (without Honey-suckle flower); 1-chlorogenic acid ($t_R = 7.8$ min); 2-baicalin ($t_R = 20.2$ min)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取绿原酸 12.36 mg、黄芩苷对照品 49.93 mg, 分别加 50% 甲醇使溶解并稀释至 50 mL, 作为贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品约 40 mg, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 加 50% 甲醇补足减失的重量, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取上述绿原酸和黄芩苷对照品贮备液各 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样 10 μ L 测定。以对照品溶液进样量为纵坐标, 峰面积积分为横坐标, 绘制标准曲线, 结果绿原酸在进样量为 9.89 ~ 988.80 ng 范围内呈良好的线性关系, 线性方程为: $Y = 2.86 \times 10^6 X - 3.59 \times 10^3$, $r = 0.9999$; 黄芩苷在进样量为 0.04 ~ 3.99 μ g 范围内呈良好的线性关系, 线性方程为: $Y = 2.22 \times 10^6 X + 1.41 \times 10^4$, $r = 0.9995$ 。

2.4 精密度试验 对同一供试品溶液(批号 20031101), 连续测定 5 次, 结果其绿原酸平均含量为 5.52 mg/粒, RSD 为 0.34%, 黄芩苷平均含量为 34.33 mg/粒, RSD 为 0.29%, 表明绿原酸和黄芩苷的精密度良好。

2.5 阴性干扰试验 分别取缺金银花提取物的阴性样品和缺黄芩提取物的阴性样品约 40 mg, 精密称定, 同法制备成阴性供试液, 进样, 测定, 结果见图 1。

2.6 重复性试验 对同一批样品(批号 20031101), 分别取 5 份, 同法制备, 依法测定, 结果绿原酸含量平均为 5.47 mg/粒, RSD 为 2.84%, 黄芩苷含量平均为 34.13 mg/粒, RSD 为 1.58%, 表明绿原酸和黄芩苷的重复性良好。

2.7 稳定性考察 取对照品溶液(浓度为含绿原酸 0.02 g ·

L^{-1} , 含黄芩苷 0.08 g L^{-1}), 每隔一定时间测定一次, 共测定 6 次, 结果 24 h 内绿原酸峰面积的 RSD 为 0.50%, 黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.40%, 表明本品稳定性良好。

2.8 加样回收率测定 精密称取本品(批号 20031101, 含绿原酸 5.47 mg/粒, 黄芩苷 34.13 mg/粒) 约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入绿原酸对照品及黄芩苷对照品适量, 以 50% 甲醇定容至刻度, 同“2.2.2”法制备并测定, 结果见表 1。

表 1 回收率实验结果

Tab 1 Recovery of Yinhuang soft capsules

| 待测成分 | 样品中含量/mg | 对照品加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|----------|-----------|--------|--------|---------|-------|
| 绿原酸 | 0.289 | 0.198 | 0.496 | 104.55 | | |
| | 0.282 | 0.198 | 0.486 | 103.03 | | |
| | 0.281 | 0.247 | 0.533 | 102.02 | 102.38 | 1.82 |
| | 0.282 | 0.247 | 0.539 | 104.05 | | |
| | 0.295 | 0.296 | 0.590 | 99.66 | | |
| | 0.285 | 0.296 | 0.584 | 101.01 | | |
| 黄芩苷 | 1.866 | 1.598 | 3.436 | 98.25 | | |
| | 1.744 | 1.598 | 3.362 | 101.25 | | |
| | 1.748 | 1.997 | 3.676 | 96.54 | 97.90 | 1.79 |
| | 1.756 | 1.997 | 3.701 | 97.39 | | |
| | 1.834 | 2.396 | 4.166 | 97.33 | | |
| | 1.822 | 2.396 | 4.138 | 96.66 | | |

2.9 样品测定 取 3 批银黄软胶囊样品, 按“2.2.2”项下操作, 在上述色谱条件, 依法进样测定, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n=3)

Tab 2 Results of determination of contents of chlorogenic acid and baicalin in samples (n=3)

| 批号 | 绿原酸/mg 粒 ⁻¹ | RSD/% | 黄芩苷/mg 粒 ⁻¹ | RSD/% |
|----------|------------------------|-------|------------------------|-------|
| 20031101 | 5.47 | 2.84 | 34.13 | 1.58 |
| 20031102 | 5.41 | 1.91 | 34.82 | 1.30 |
| 20031103 | 5.25 | 1.04 | 32.89 | 2.46 |

3 讨论

取绿原酸和黄芩苷对照品在流动相溶液中进行紫外扫描, 可知绿原酸在 318 nm 处有最大吸收, 而黄芩苷在 276, 318 nm 处均有较强吸收。为便于同时检测, 故采用 318 nm 作为测定波长。从样品色谱图中可看出, 还有 5~6 个色谱峰为未知成分, 且均为金银花提取物所带入, 而这些成分均有紫外吸收, 若用分光光度法测定本品中绿原酸的含量, 这些成分将会影响的测定结果的准确性, 而本法可消除这些影响。

采用 HPLC 法同时测定本品中绿原酸和黄芩苷的含量, 方法简便、快速、准确, 可作为本品的含量控制方法。

参考文献:

[1] 青龙, 顾卫中, 黄晓瑾, 等. 不同厂家银黄口服液黄芩苷、绿原酸含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 1996, 16(7): 315.
 [2] 钱江. HPLC 法测定银黄口服液绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2003, 25(2): 117.

[收稿日期] 2005-09-22

米力农注射液的质量控制

吴开, 郭鹏 (武汉大学药学院, 湖北, 武汉, 430072)

[摘要] 目的: 制定米力农注射液的质量控制方法。方法: 采用高效液相色谱法建立测定米力农的含量。色谱条件:

[作者简介] 吴开, 女, 学士, E-mail: Christina.wk@163.com