

量,计算回收率。结果见表 1,结果表明方法的回收率良好。

表 1 甘氨酸和蛋氨酸回收率试验 ($n = 3$)

Tab 1 Recovery of Glycine and Methionine ($n = 3$)					
成份	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	聊 (%)	RSD (%)
甘氨酸	20.53	20.52	99.95	100.53	1.08
	20.74	21.12	101.83		
	20.62	20.67	100.24		
	25.36	25.55	100.75		
	24.86	24.40	98.15		
	25.52	25.59	100.27		
	33.12	33.61	101.48		
	33.26	33.64	101.14		
	33.35	33.67	100.96		
	20.51	20.52	100.05		
蛋氨酸	22.43	22.85	101.87	100.66	1.13
	23.16	23.56	101.73		
	27.58	27.47	99.60		
	25.99	25.62	98.58		
	27.16	27.47	101.14		
	30.42	30.96	101.78		
	30.61	30.93	101.05		
	30.96	31.00	100.13		

2.12 样品含量测定 分别取 3 批复方甘草酸苷胶囊 (批号: 080501~03), 按 2.1(1) 方法制备供试品溶液, 分别精密量取供照品溶液和对照品溶液各 200 μ L, 按 2.3 项下衍生化方法操作, 精密量取衍生后的供试品溶液和对照品溶液各 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算。

结果 3 批样品 (批号: 80501~03) 中甘氨酸的含量分别为 100.2%、98.3%、99.9%; 蛋氨酸的含

量分别为 96.8%、96.9%、96.6%。

3 讨论

氨基酸的衍生化方法有多种, 如氯甲酸 9 茚基甲酯衍生化^[1,2]、二硝基氟 (或氯) 苯衍生法^[3]、Waters AccQ-Tag^[4] 氨基酸分析方法等, 其中二硝基氟 (或氯) 苯衍生和 Waters AccQ-Tag 氨基酸衍生过程中受温度和反应时间影响较大, 需要严格控制; 而且二硝基氟 (或氯) 苯属于剧毒类药品, 购买和储存受到较大限制, Waters AccQ-Tag 试剂价格昂贵, 因此, 在保证结果准确可靠的前提下选择氯甲酸 9 茚基甲酯衍生化, 只需在室温下即可反应, 操作简便, 而且试剂价格便宜, 适合企业长期大量的使用。

另外, 现有的氨基酸分析方法大多采用梯度分析, 基线波动较大; 本方法经过试验, 只需在等梯度条件下即可进行, 基线平稳, 分析结果重复性更好。

参考文献:

- [1] 王天勇, 杨文远. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定七种中药补养药种氨基酸 [J]. 分析测试技术与仪器, 1994, (1): 17
- [2] 郭燕捷, 黄一玲, 姚志建. BOC 柱前衍生法用于高效反相色谱测定氨基酸 [J]. 色谱, 1989, 7(4): 219
- [3] 曹 玲, 张云楚. 柱前衍生化 HPLC 法同时测定注射用复方甘草酸苷中盐酸半胱氨酸和甘氨酸的含量 [J]. 中国药品标准, 2007, 8(5): 31
- [4] 王桂珍, 廖 斌. AccQ-Tag 法测定复方氨基酸注射液氨基酸的含量 [J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(1): 29

(收稿日期: 2008-09-24; 修回日期: 2008-11-24)

(本文编辑 梁爱君)

文章编号: 1008-9926(2009)02-0174-03 中图分类号: R927.2 文献标识码: A

高效液相色谱法测定茜草双酯固体分散体中茜草双酯的含量

陈 莉^①, 肖若蕾, 张玉霖, 石 露

(^①咸宁学院药学院 湖北 咸宁 437100)

摘 要: 目的 建立茜草双酯固体分散体中茜草双酯含量的测定方法。方法 采用高效液相色谱法: 色谱柱为 Eurospher 100 - 5 C₁₈ 色谱柱 (250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水 (80:20); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 264nm。结果 茜草双酯在 20.0~100.0 μ g/mL 浓度范围内线性关系良好 ($r = 0.9998$), 平均回收率为 100.25%, RSD 为 1.13%。结论 本方法专属性好, 灵敏、可靠, 适用于茜草双酯类制剂药物浓度的检测。

关键词: HPLC; 茜草双酯; 固体分散体; 含量测定

^① 作者简介: 陈 莉 (1971 -), 女, 辽宁绥中人, 学士, 讲师。研究方向: 药物质量控制及体内药物分析。Tel: (0715) 8272135; E-mail: chenli8284@163.com

Determination of Rubidate in Rubidate Solid Dispersion by HPLC

CHEN Li^①, XIAO Ruo-Lei, ZHANG Yu-Lin, SHI Lu

(^① School of Pharmacy, Xianning University, Xianning 437100, Hubei China)

ABSTRACT: **Aim** To establish a method to determine the content of rubidate in rubidate solid dispersion by HPLC. **Methods** HPLC was used to determine the content of rubidate in rubidate solid dispersion. The separation was performed on Eurospher C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm) column with methanol-water (80:20) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and the wavelength was UV 264nm. **Results** The linear response range from 20.0~100.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$). The recovery rate was 100.25%, RSD = 1.13%. **Conclusion** The HPLC method, specific, sensitive and reliable, can be used in the detection of drug concentration.

KEY WORDS: HPLC; rubidate; solid dispersion; content determination

茜草双酯 (Rubidate) 具有明显的升高外围白细胞的作用, 能促进骨髓造血干细胞增殖, 对化疗药物所致白细胞减少有一定的治疗效果^[1], 另外其抗氧化和免疫抑制作用正在研究中^[2,3]。目前, 茜草双酯含量测定方法有比色法^[4]、紫外分光光度法^[5]、氧化还原滴定法^[5]、荧光法^[6]等。本文建立了采用高效液相色谱法测定茜草双酯固体分散体中茜草双酯含量的方法, 具有准确、简便、灵敏度高、选择性好等优点, 可作为茜草双酯原料药及其固体分散体制剂的质量控制方法。

1 仪器与试剂

N3000 高效液相色谱仪系统 (北京创新通恒), SARTORIUS AG BP211D 分析天平 (北京赛多利斯), CARY 50 CONC 紫外-可见分光光度计 (美国瓦里安), 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

茜草双酯标准品 (中国药品生物制品检定所); 茜草双酯原料 (含量 100.2%, 山东方明药业股份有限公司, 批号 051105); 茜草双酯固体分散体 (自制, 每克茜草双酯固体分散体含 0.1g 茜草双酯, 批号: 070611, 070705, 070904); PVPK30 (上海化学试剂公司, 040914); 甲醇为色谱纯, 其它为分析纯,

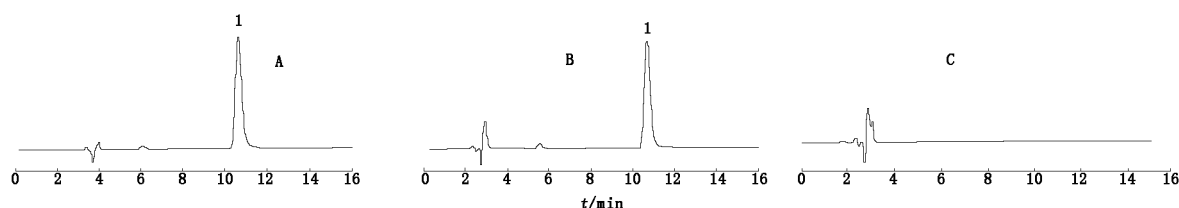
重蒸水为自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Eurospher 100-5C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: 甲醇-水 (80:20); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 264nm; 进样量: 20μL; 柱温: 室温。此种条件下茜草双酯与杂质有良好的分离, 辅料无干扰, 理论塔板数在 5000 以上, 色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液 精密称取茜草双酯对照品适量, 用无水乙醇溶解, 制成 100.0 μg·mL⁻¹ 的溶液, 即得对照品贮备液。(2) 供试品溶液 取茜草双酯固体分散体约 0.1g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加无水乙醇适量溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 再从中移取 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中定容, 即得。(3) 空白溶液 取未加茜草双酯的空白辅料约 50 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解, 定容。

2.3 检测波长的选择 采用紫外分光光度计对茜草双酯标准品溶液进行扫描, 茜草双酯有 3 个吸收峰, 见图 2。考虑吸收峰强度及测定干扰情况, 选择 264nm 最大吸收处作为检测波长。



A 对照品 B 样品 C 空白对照 1 茜草双酯

图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of rubidate control

2.4 标准曲线的制备 分别移取标准溶液 2、3、4、5、6、7、8、10mL至 10mL 量瓶中定容,按色谱条件测定并记录色谱流出曲线,以峰面积 (A)对其响应浓度 C进行线性回归,回归方程为:

$A = 32\,621C + 90\,912, r = 0.999\,8, n = 8$

表明茜草双酯在浓度 20.0~100.0μg·mL⁻¹范围内,线性关系良好。

2.5 最低定量限测定 取茜草双酯标准品适量,以无水乙醇稀释成系列浓度,分别进样测定,以信噪比 S/N≥10作为最低定量限。试验表明,在本试验条件下的最低定量限为 0.033μg·mL⁻¹。

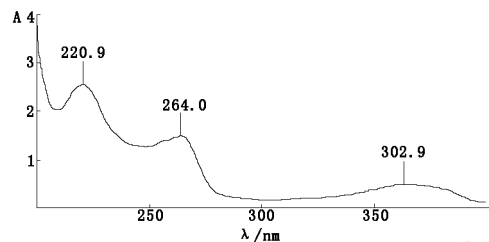


图 2 茜草双酯紫外光谱图
Fig 2 Ultraviolet spectrum of rubidate

2.6 精密度试验 取 2.3项下溶液,按 2.1项下色谱条件测定,连续进样 5次,RSD为 1.74%。

2.7 加样回收率试验 精密称取 6份已知含量的样品 (批号: 070705),每份约 50mg,精密加入 1.004mg·mL⁻¹的茜草双酯对照品溶液 5.0mL,按 2.2(2)项下制备供试品溶液,记录色谱图并计算回收率。

表 1 回收率测定结果 (n=6)
Tab 1 Results of recovery (n=6)

取样量 (mg)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	聊 (%)	RSD (%)
50.24	4.958	5.020	10.051	101.48		
51.13	5.046	5.020	10.136	101.39		
50.02	4.936	5.020	9.996	100.80		
50.37	5.030	5.020	10.034	99.69	100.25	1.13
49.64	4.898	5.020	9.858	98.77		
51.26	5.059	5.020	10.048	99.38		

2.8 重复性试验 取同一批号的样品 5份 (批号: 070611),精密称取约 100mg,按 2.1项下操作,结果平均含量为 96.4%,RSD为 1.44% (n=5)。

2.9 稳定性试验 取样品 (批号: 070611)适量配制无水乙醇溶液,放置 1、2、3、4h,进样 20μL,测得峰面积的 RSD为 1.63%,表明 4h内,在避光条件下茜草双酯无水乙醇溶液较稳定。

2.10 样品测定 精密称取不同次制备的茜草双酯固体分散体各 1份按 2.2(2)项下制备样品溶液。按色谱条件测定并计算,结果见表 2。

表 2 样品测定结果 (n=4)

批号	取样量 (g)	标示量 (%)
070611	0.1023	96.14
070705	0.1102	99.33
070904	0.1036	98.69

3 讨论

采用高效液相色谱法对茜草双酯固体分散体进行定量分析,具有比紫外可见分光光度法更好的专属性、准确性、灵敏度,更适于制剂分析。

实验过程中比较了不同浓度的乙醇-水及乙醇-水-冰醋酸混合液及无水乙醇等溶剂,考虑到茜草双酯易氧化和水解的特点及不易溶于水而易溶于乙醇溶液中,本实验选择无水乙醇做溶剂,同时采用避光操作,使样品保持稳定的时间较长,有利于实验的进行,确保了实验的准确性和稳定性。

本实验比较了各种流动相对分离效果的影响。采用多种流动相:甲醇-1.2%乙酸 (65:35);甲醇-水-四氢呋喃 (310:90:3);甲醇-水-冰醋酸 (80:20:1);乙腈-水 (60:40);乙腈-水 (80:20);乙腈-水 (70:30);甲醇-水 (80:20);甲醇-水 (70:30);甲醇-水 (85:15)。通过比较这些流动相对分离结果的影响,以流动相为甲醇-水 (80:20)时,色谱峰峰型、分离度均较好,拖尾因子小,且分析时间较适宜,经济易得。

由于茜草双酯化学性质不稳定,遇光逐渐变色,实验过程应注意避光处理,且放置时间不宜超过 4h。

参考文献:

[1] 晏媛,郑萍. 茜草的药理作用研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病, 2002, 18 (6): 64
[2] 杨胜利,刘惠亮,张华,等. 茜草双酯对缺血心肌的抗氧化作用机制的研究 [J]. 武警医学, 2004, 15 (11): 812
[3] 杨胜利,刘发. 茜草双酯的免疫抑制作用 [J]. 中国药学杂志, 1996, 31 (7): 425
[4] 谭才宏,蔡金龙. 茜草双酯片含量的比色测定法 [J]. 镇江医学院学报, 1996, 6 (1): 79
[5] 中国药典编辑委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 [S]. 2002 WS1-XG
[6] 刘琴棣,张秀国,吴德政. 茜草双酯的荧光测定方法 [J]. 中国人民解放军军事医学科学院院刊, 1984, 3: 347

(收稿日期: 2008-11-18;修回日期: 2008-12-25)

(本文编辑 魏萍)