

好, 利奈唑胺能和内标物峰分离完全, 且不受血浆中内源性杂质的干扰。

3.2 内标的选择

根据文献[2-4]报道, 采用的内标物为利奈唑胺的类似物, 或选用左氧氟沙星, 但必须采用梯度洗脱。本试验选择苯巴比妥为内标物, 在优化的色谱条件下, 内标物与血浆的内源性物质以及利奈唑胺均实现较好的分离, 而且内标物和利奈唑胺吸收很稳定。

3.3 血样处理方法的选择

文献[3-4]采用固相萃取方法进行血样预处理, 操作较繁琐, 所需费用也较高, 而文献[2]采用 5% 三氯醋酸-甲醇(3:1)沉淀蛋白后加入 0.1% NaOH 溶液中和再进样, 操作也比较繁琐。本试验参考文献[5]采用 1.5 倍的乙腈沉淀蛋白后直接进样, 此法血浆中内源性杂质及代谢物不干扰测定, 基线噪音小, 操作简便。

REFERENCES

- [1] CUI X L, ZHAO Z G. Pharmacology and clinical evaluation of linezolid [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2008, 18(6): 530-533.
- [2] BOAK L M, LI J, NATION R L, et al. High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(8): 782-786.
- [3] TOUTAIN J, BOSELLI E, DJABAROUTI S, et al. Determination of linezolid in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 813(12): 145-150.
- [4] PENG G W, STRYD R P, MURATA S, et al. Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 20(12): 65-73.
- [5] ZENG J Z. *Biopharmaceutical Analysis(生物药物分析)* [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1998: 28.

收稿日期: 2009-07-29

HPLC-ELSD 测定三黄合剂中黄芪甲苷的含量

刘庆丰, 李中东, 刘珏, 施孝金*, 钟明康(复旦大学附属华山医院临床药理学室, 上海 200040)

摘要: 目的 建立三黄合剂中黄芪甲苷含量测定的 HPLC 方法并制定该制剂的质量控制指标。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 柱, 流动相为乙腈-水(35:65), 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 漂移管温度为 95 °C, 氮气流速为 3.0 L·min⁻¹。结果 进样量在 0.25~5.00 μg 内, 黄芪甲苷浓度的对数值 lgC 与峰面积积分的对数值 lgA 之间呈良好的线性关系, r=0.999 3。结论 本法操作简便, 准确, 可用于三黄合剂的质量控制。

关键词: 三黄合剂; 黄芪甲苷; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; 含量测定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)04-0355-04

Determination of Astragaloside IV in Sanhuang Mixture by HPLC-ELSD

LIU Qingfeng, LI Zhongdong, LIU Jue, SHI Xiaojin*, ZHONG Mingkang(*Research Division of Clinical Pharmacy, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method using HPLC coupled with ELSD for determination of astragaloside IV in Sanhuang mixture and formulate a standard for quality control. **METHODS** A Diamonsil C₁₈ column(200 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, acetonitrile-water (35:65) was used as mobile phase and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The temperature of drift tube for ELSD was 95 °C and the flow rate of nitrogen was 3.0 L·min⁻¹. **RESULTS** The linear range for astragaloside IV was 0.25–5.00 μg (r=0.999 3), the RSDs of intra- and inter-day were less than 2.0%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and suitable for quality control of Sanhuang mixture.

作者简介: 刘庆丰, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (021)32120059 E-mail: gywyl@gmc.edu.cn *通信作者: 施孝金, 男, 副主任药师
Tel: (021)32120059 E-mail: xiaojin_shi@online.sh.cn

KEY WORDS: Sanhuang mixture; astragaloside IV; HPLC-ELSD; determination

三黄合剂为我院中医科经验方,由黄芪、黄连、蒲黄等药组成,具有益气固表,利水消肿,清热燥湿,泻火解毒,利胆退黄等功能,主要用于治疗代谢综合征。黄芪为方中君药,黄芪甲苷为其重要的有效成分。为方便临床应用,三黄合剂被开发成了便于携带和服用的口服液。黄芪甲苷成分的含量测定可采用比色法、薄层扫描法^[1]与紫外检测法^[2]等,但这些方法操作繁琐或者低波长处干扰较大,重现性一般比较差。本试验根据文献报道^[3-4],采用高效液相色谱-蒸发光散射法测定三黄合剂中黄芪甲苷的含量,稳定性及重复性较好,测定结果准确可靠,可有效控制三黄合剂的质量。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),CHEM STATION 工作站; PL-ELS 2100 型蒸发光散射检测器(Agilent)。乙腈(色谱纯),去离子化的双蒸水(新鲜制备),其余试剂均为分析纯。黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111562-200302,纯度:98%)。三黄合剂(复旦大学附属华山医院药剂科制备)。

2 方法和结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对

照品 25.0 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取 10 mL 浸膏液,置具塞锥形瓶中,加甲醇 100 mL,超声提取 30 min,收集上清液,残渣再用 50 mL 甲醇超声提取 15 min,合并上清液,过滤,蒸干甲醇;残渣置分液漏斗中,用水饱和正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液;用氨试液洗涤 3 次,每次 20 mL,合并氨试液层;用 20 mL 水饱和的正丁醇洗涤氨试液层,合并正丁醇层,减压回收至干,用甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,用微孔滤膜(孔径为 0.24 μm)过滤,得供试品溶液。

2.1.3 阴性对照品溶液的制备 取缺黄芪的处方药,按处方及工艺要求制备空白试样,取空白样品 10 mL,按“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(4.6 mm \times 200 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水(35:65), 流速: 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。蒸发光散射检测器条件: 漂移管温度: 95 $^{\circ}\text{C}$, 雾化器温度: 50 $^{\circ}\text{C}$, 载气: 氮气(0.999 99), 流量: 3.0 SLPM (L $\cdot\text{min}^{-1}$)。理论板数以黄芪甲苷峰计为 4 883。见图 1。

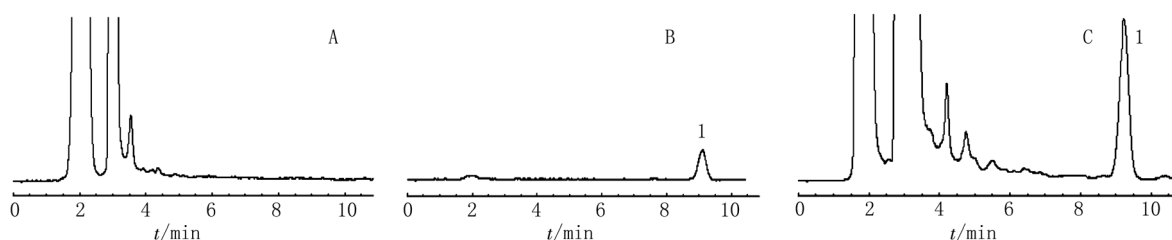


图 1 HPLC-ELSD 色谱图

A-阴性样品; B-对照品; C-供试品; 1-黄芪甲苷

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms

A-blank sample; B-chemical reference substance; C-sample; 1-astragaloside IV

2.3 专属性考察

在“2.2”条件下,黄芪甲苷与三黄合剂中其它中药成分以及防腐剂、矫味剂等辅料分离较好,无干扰,说明测定方法专属性较好,见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得到浓度分别为 25, 50, 100, 200, 400, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。进样量 10 μL ,按“2.2”色谱条件测定峰面积,以进样浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的常用

对数 $\lg C$ 为横坐标, 峰面积的常用对数 $\lg A$ 为纵坐标, 作标准曲线, 回归方程为 $Y = 1.6689X - 0.6818$, $r = 0.9993$, 进样量在 $0.25 \sim 5.00 \mu\text{g}$ 内线性关系良好。黄芪甲苷典型出峰时间为 9.15 min 。

2.5 精密度试验

按“2.1.1”项下方法配制对照品溶液, 浓度分别为 $40, 150, 450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。每种浓度取 5 份, 分别于日内连续测定 3 次, 计算黄芪甲苷峰面积积分值的对数值的日内 RSD($n=5$)分别为 1.23% , 0.96% 和 0.71% 。连续测定 5 d, 计算得日间 RSD ($n=5$)分别为 1.81% , 1.13% 和 0.59% 。表明本方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液分别在 $0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 \text{ h}$ 进样测定, 测得峰面积积分值的对数值的 RSD 为 0.36% , 表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批次的本品(批号: 080816), 平行 6 份(每份 20 支, 每支 10 mL), 按“2.1.2”项下方法操作, 按“2.2”色谱条件测定, 计算, 结果黄芪甲苷的含量的 RSD 为 1.20% ($n=6$)。表明本法重复性良好。

2.8 仪器精密度试验

取浓度分别为 $40, 150, 450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 平行 5 份, 分别重复进样 5 次, 测得黄芪甲苷含量分别为 (38.7 ± 0.3) , (140.6 ± 10.4) , $(435.6 \pm 12.7) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD($n=5$)分别为 1.28% , 0.95% 和 0.86% , 表明仪器精密度良好。

2.9 回收率试验

精密吸取 9 份已知含量为 $228.65 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的本品 10 mL , 分别准确加入按“2.1.1”项下方法配制的浓度分别为 $40, 150, 450 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 2 mL , 按“2.2”色谱条件测定, 计算, 平均回收率为 98.89% , RSD= 1.19% ($n=9$), 结果见表 1。

2.10 样品测定

分别取不同批号的本品, 按“2.1.2”项下方法操作及“2.2”色谱条件测定, 根据“2.4”线性方程计算黄芪甲苷的含量, 结果见表 2。

3 讨论

因为黄芪甲苷仅在紫外区末端(200 nm 附近)有弱吸收, 选用蒸发光散射检测器对其检测已成共

表 1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=9$)

| 样品含量/ μg | 加入量/ μg | 测得量/ μg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| | 80 | 2 314.20 | 97.79 | | |
| | 80 | 2 369.10 | 100.11 | | |
| | 80 | 2 322.96 | 98.16 | | |
| | 300 | 2 575.12 | 99.56 | | |
| 2 286.5 | 300 | 2 593.48 | 100.27 | 98.89 | 1.19 |
| | 300 | 2 531.92 | 97.89 | | |
| | 900 | 3 190.32 | 100.12 | | |
| | 900 | 3 095.68 | 97.15 | | |
| | 900 | 3 155.91 | 99.04 | | |

表 2 样品中黄芪甲苷含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Determination of astragaloside IV contained in samples($n=3$)

| 批号 | 编号 | 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 平均含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|--------|----|--------------------------------------|--|
| | 1 | 224.39 | |
| 080816 | 2 | 228.65 | 228.42 |
| | 3 | 232.21 | |
| | 4 | 219.70 | |
| 081228 | 5 | 222.04 | 222.07 |
| | 6 | 224.48 | |
| | 7 | 227.39 | |
| 090420 | 8 | 223.53 | 227.41 |
| | 9 | 231.33 | |

识, 但是对于标准曲线线性关系的认识却存在较大分歧。早些年报道的进样浓度与峰面积的线性相关系数一般大于 0.9990 , 本课题组经过大量实验表明, 黄芪甲苷进样浓度与峰面积的线性相关系数一般小于 0.9900 , 但是其进样浓度的常用对数与峰面积的常用对数的线性相关系数一般大于 0.9980 , 与黄绳武等^[5]报道相符, 更加适合于黄芪甲苷含量测定方法中标准曲线线性关系的研究; 而且在精密度与稳定性研究中用峰面积对数值考察 RSD 可能更加合理。

药典规定黄芪药材中黄芪甲苷含量不低于 0.04% , 本试验测定 3 个批号样品的含量约为 0.015% , 考虑到该制剂工艺为经过 3 因素 3 水平正交试验优化筛选所得, 含量降低的原因可能是药材

来源有差别、该制剂制备过程黄芪甲苷破坏损失以及提取测定过程损失等原因引起,所以,本试验所测结果是合理的。另外,由于本方法测定结果重复性较好、精密度较高,作为制剂质控方法是可行的。

供试品溶液的制备方法,一般采用甲醇提取后正丁醇提取再用碱液洗去杂质的方法。笔者经过实验表明,对于9个不同浓度的样品,1式3份,分别用1%氢氧化钠溶液与浓氨水洗涤正丁醇提取液,2种方法所得溶液含量差异明显。选用1%氢氧化钠溶液作为洗涤液,方法重复性较差,含量普遍较低,甚至无法测出黄芪甲苷;而选用具有刺激性气味的浓氨水作为洗涤液,方法重复性较好,含量普遍较高,杂质干扰少,可以得到较好的分离结果和比较高的测定含量。

REFERENCES

[1] LIU Y, FU C M, WANG S Y. Using TLCS to determine the

contents of astragaloside IV in Qianggu granula [J]. J Chengdu Univ: Nat Sci (成都大学学报:自然科学版), 2008, 27(2): 102-104.

[2] JIANG Y, CHAO R B. Comparison of contents of astragaloside IV and total saponins in Astragalus membranaceus [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2007, 22(3): 322-324.

[3] LI F, PEI J J, ZHANG A J, et al. Determination of astragaloside IV in Radix Astragali of Feilao tablets by HPLC-ELSD [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med(山东中医药大学学报), 2007, 31(6): 507-509.

[4] YU J P, FANG C F, TANG D F. Determination of astragaloside IV in Shengkangning pian by HPLC-ELSD[J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2007, 24(5): 408-410.

[5] HUANG S W, WU Z H, HU X B, et al. Determination of astragaloside IV in Anxinkang dropping pills by HPLC-ELSD [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2007, 11(27): 1559-1561.

收稿日期: 2009-06-17

LC-MS 检测金锁固精丸中非法添加的枸橼酸西地那非

任淑玲, 朱旭江(甘肃省药品检验所, 兰州 730000)

摘要: 目的 采用液质联用技术检测金锁固精丸中非法添加的枸橼酸西地那非。方法 选用 C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液梯度洗脱, 对此制剂的提取液进行液质联用分析, 通过与对照品的色谱和质谱行为比较, 检测此制剂中枸橼酸西地那非成分。结果 在该金锁固精丸中检出枸橼酸西地那非。结论 本方法简便、灵敏、准确, 专属性强, 可分析检测此制剂中的枸橼酸西地那非。

关键词: 枸橼酸西地那非; 液质联用; 检测

中图分类号: R917.101; R286 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)04-0358-03

Determination of Sildenafil Citrate Illegally Mixed into Jinsuo Gujing Pills by LC-MS

REN Shuling, ZHU Xujiang(*Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To detect sildenafil citrate illegally mixed into Jinsuo Gujing pills by LC-MS. **METHODS** The sildenafil citrate of Jinsuo Gujing pills was analyzed through a C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 5 μ m), using the mobile phase of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate by gradient elution. **RESULTS** Sildenafil citrate were found in the drugs. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and accurate. It can be used to detect sildenafil citrate mixed into illegal drug.

KEY WORDS: sildenafil citrate; LC-MS; determination