

3.4 精密度试验: 以同一混合对照品溶液进样, 每次 $20\mu\text{L}$, 重复进样 5 次, 齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.7%, 熊果酸峰面积 RSD 为 0.6%。

3.5 重现性试验: 精密称定同一批样品, 按供试品溶液制备的方法分别制备 5 份供试品溶液, 分别测定, 结果齐墩果酸含量的 RSD 为 2.2%, 熊果酸含量的 RSD 为 1.1%。

3.6 回收率试验: 已知含量的各样品适量, 加入一定量的齐墩果酸、熊果酸对照品, 测定, 结果山茱萸药材中齐墩果酸平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.5% ($n=6$); 知柏地黄丸 (浓缩丸) 中齐墩果酸平均回收率为 97.4%, RSD 为 1.9% ($n=6$); 山茱萸药材中熊果酸的回收率为 101.0%, RSD 为 1.4% ($n=6$); 知柏地黄丸 (浓缩丸) 中熊果酸的回收率为 101.1%, RSD 为 1.3% ($n=6$)。

3.7 样品测定: 吸取各供试品溶液各 $10\sim 20\mu\text{L}$, 分别进样, 测定齐墩果酸、熊果酸峰面积积分值, 用外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 山茱萸药材及知柏地黄丸中

齐墩果酸、熊果酸的含量 ($n=3$)

品名	产地或生产厂家	批号	齐墩果酸 (mg/g)	熊果酸 (mg/g)
山茱萸	江苏		0.624	2.944
	江苏		0.728	3.102
	安徽		0.612	2.761
知柏地黄丸 (浓缩丸)	河南宛西制	980802	0.059	0.270
	药有限公司	980620	0.063	0.345
		20000809	0.054	0.282

4 讨论

齐墩果酸甲醇液 λ_{max} 为 207 nm, 熊果酸甲醇液 λ_{max} 为 206 nm。在此检测波长下, 流动相中甲醇的紫外吸收干扰较大, 基线不稳。故选择 215 nm 为检测波长。

用乙腈-甲醇-水-乙酸胺为流动相, 因乙腈无末端吸收, 与单纯使用甲醇-水为流动相比较^[5], 基线平稳。加入盐改善了峰形, 且将两峰的保留时间相对拉开, 达到基线分离, 分离度大于 1.5。

在进行回收率试验时, 曾对索氏提取法、回流、浸泡过夜后超声 3 种提取方法进行了比较。对同样数量的样品, 索氏提取法所得齐墩果酸、熊果酸均含量最高, 说明采用索氏提取法提取较为完全。

采用 HPLC 法测定山茱萸、知柏地黄丸中齐墩果酸与熊果酸含量, 精密度优于薄层扫描法, 无需显色, 结果稳定, 方法简便。为采用 HPLC 法测定杞菊地黄丸、金匱肾气丸、麦味地黄丸、明目地黄丸及女贞子、山楂、连翘、栀子中齐墩果酸与熊果酸含量提供了一种可借鉴的方法。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993.
- [3] 吕曙华, 王强, 夏光成. 中药女贞子中齐墩果酸、熊果酸的高效液相色谱分析 [J]. 药物分析杂志, 1993, 13(5): 291-294.
- [4] 李广勋. 中药药理与临床 [M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 1992.
- [5] 曾庆煜, 孙敏, 林荣禄. 十一批六味地黄丸中熊果酸测定及其分析探讨 [J]. 中成药, 1989, 11(11): 17.

RP-HPLC法同时测定蜂胶中槲皮素和山柰酚的含量

杜海燕, 郑志刚, 李婷, 刘彤, 王岩, 高旭*

(天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 天津 300142)

蜂胶是蜜蜂采集植物上的树脂与蜜蜂自身的分泌物混合而成的天然物质。具有显著的抗菌、防腐、消炎、抑制病毒、镇痛、增进机体免疫功能及促进组织再生等作用。蜂胶中主要含有黄酮类和萜类物质。蜂胶活性组分中, 具有代表性的是黄酮化合物中的槲皮素。文献报道多采用紫外分光光度法对蜂胶总黄酮成分进行含量测定^[1-3], 而高效液相色谱法定量

分析较少报道。本实验进行了这方面的研究, 采用 RP-HPLC 法同时测定蜂胶中槲皮素及山柰酚的含量, 并进行了方法学研究。其结果与比色法比较, 重现性好, 干扰因素少, 更能反映蜂胶的内在质量, 使蜂胶质量标准具有科学性与先进性。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, SPD-6AV

* 收稿日期: 2002-01-10

* 天津中医学院 96 级实习生

检测器。

槲皮素(批号: 0081-9304)、山柰酚(批号: 0861-9901)对照品购自中国药品生物制品检定所(供含量测定用)。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为去离子水。蜂胶样品由天津达仁堂制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: ODS C₁₈ (4.6 mm× 75 mm);流动相: 甲醇-0.4%磷酸-四氢呋喃(5∶5∶1);流速: 0.5 mL/min;波长: 365 nm。该条件下槲皮素、山柰酚与其他干扰成分能同时得到满意分离。

2.2 对照品纯度试验: 取槲皮素及山柰酚对照品适量,各加甲醇制成 0.2 mg/mL的对照品溶液。精密吸取槲皮素及山柰酚对照品溶液各 5 μL,按照高效液相色谱法《中华人民共和国药典》2000年版一部附录测定,其纯度分别为 98.8%和 100%。

2.3 标准曲线绘制: 取槲皮素及山柰酚对照品适量、精密称定,用甲醇分别制成 0.004 mg/mL和 0.005 mg/mL的溶液,作为对照品溶液。精密吸取槲皮素及山柰酚对照品各 4, 8, 12, 16, 20 μL进样,测定色谱峰面积。以槲皮素及山柰酚的含量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线。槲皮素回归方程为 $Y = -154.7 + 451.043.8X$, $r = 0.9999$;线性范围: 16~80 ng。山柰酚回归方程为 $Y = -1211.3 + 451.535X$, $r = 0.9999$;线性范围: 20~100 ng。

2.4 精密度考察: 精密吸取槲皮素及山柰酚对照品溶液 10 μL,分别重复进样 5次,测定,结果槲皮素峰面积的 $RSD = 1.38\%$,山柰酚峰面积的 $RSD = 1.44\%$ 。

2.5 重现性试验: 取同一批样品,精密称取 6份,按样品含量测定方法提取、分析,结果槲皮素峰面积 $RSD = 1.76\%$,山柰酚峰面积的 $RSD = 1.63\%$ 。

2.6 稳定性试验: 将制备好的供试品溶液进行进样分析,以后每 2 h进样 1次,测 3次,结果槲皮素含量的 $RSD = 1.67\%$,山柰酚含量的 $RSD = 1.36\%$,表明供试品溶液的含量在 6 h内基本无变化。

2.7 回收率测定: 取同批槲皮素含量为 0.40%,山柰酚含量为 0.62%的蜂胶样品,精密称取 5份,每份 50 mg,分别精密加入浓度为 0.04 mg/mL的槲皮素对照品溶液 5 mL,浓度为 0.05 mg/mL的山柰酚对照品溶液 6 mL。各份均依样品测定方法操作。结果槲皮素平均回收率为 96.7%, $RSD = 1.43\%$,山柰酚平均回收率为 99.02%, $RSD = 1.06\%$ 。

2.8 样品测定: 取本品 100 mg,精密称定,置 50 mL锥形瓶中,加 70%乙醇 20 mL,超声 10 min,溶

液用 0.5倍量石油醚萃取 2次,残渣用甲醇定容至 100 mL容量瓶中,用 0.45 μm滤膜过滤,滤液作供试品溶液。

精密吸取槲皮素及山柰酚对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算结果见表 1。

表 1 蜂胶中槲皮素及山柰酚的含量测定 (n= 2)

批 号	槲皮素含量 (%)	山柰酚含量 (%)
1	0.435	0.715
2	0.415	0.645
3	0.375	0.675
4	0.410	0.690
5	0.410	0.610

3 讨论

3.1 波长的选择: 应用紫外分光光度计 (UV-2100)测定槲皮素及山柰酚的紫外吸收光谱,365 nm处均有最大吸收,此时检测基线稳定,槲皮素及山柰酚前后杂质干扰小,故选择 365 nm为检测波长。

3.2 提取方法选择: 实验曾将 70%乙醇提取液直接经 HPLC分析,样品中槲皮素及山柰酚分离度差,杂峰干扰多,且分析时间长达 60 min。经采用石油醚萃取,脱脂,除去脂溶性杂质,且考察了石油醚部分,在所测定成分处无吸收峰,此时样品中槲皮素及山柰酚峰形对称,分离效果最佳,分析时间缩短一半。在此基础上又摸索用 1倍量的乙酸乙酯萃取两次,经 HPLC分析,峰形好,分离度好,但损失大,所以不宜采用。故选用 70%乙醇提取,石油醚脱脂方法。实验结果显示,经此处理后测得的结果令人满意。

3.3 流动相的选择: 本实验曾选用甲醇-水-冰醋酸 (600∶400∶0.5)^[4]以及甲醇-0.4%磷酸^[5]为流动相,样品峰形钝且分离度差,后加入四氢呋喃,并调整比例,经摸索,结果以甲醇-0.4%磷酸-四氢呋喃 (5∶5∶1)为最佳,样品中槲皮素及山柰酚的分离效果最好。

3.4 目前国内文献报道蜂胶中黄酮类化合物的含量测定多采用比色法,用芦丁作对照品定量所有峰,此法准确性差,专属性不强。本实验采用 HPLC法同时测定槲皮素及山柰酚含量相对干扰小、重现性好,更能准确反映其内在质量,提高了蜂胶原有的质量标准。但蜂胶中的成分极为复杂,由于时间所限,其他成分的 HPLC定量方法,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 高言明. 贵州蜂胶中总黄酮的含量分析 [J]. 贵阳中医学院学报, 1998, 20(3): 62-63.
[2] 曹 瑶,凌 娅. 蜂胶中黄酮类化合物含量测定方法的改进

- [J]. 蜜蜂杂志, 1997, 12(2): 8-9.
- [3] 毛丽珍, 徐世芳. 蜂胶口服液中黄酮类化合物的测定 [J]. 中草药, 1998, 29(4): 231-232.
- [4] 刘松青, 唐先哲, 马文秀, 等. 高效液相色谱法测定银杏叶制品

中总黄酮 [J]. 中草药, 1995, 26(9): 461-462.

- [5] 蔡定国, 缪平, 顾明娟. 高速逆流色谱法从银杏叶分离异鼠李素、山柰酚和槲皮素对照品 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 44-46.

北豆根气雾剂质量标准研究

陈志歆, 张怡, 王爱华*

(黑龙江省医药工业研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040)

北豆根气雾剂为北豆根经提取分离制成的中药制剂, 具有清咽利喉、消肿止痛之功效。临床用于治疗慢性咽炎已 20 余年, 疗效确切, 毒副作用小。北豆根总碱为北豆根中主要成分^[1], 北豆根总碱含量测定方法一直采用酸碱滴定法。为了有效地控制北豆根气雾剂的质量, 我们采用了紫外分光光度法测定总碱含量, 克服了酸碱滴定法中终点判定难的缺点, 使得北豆根的测定结果更准确, 同时为北豆根气雾剂制定了质量控制标准。

1 仪器、试剂与样品

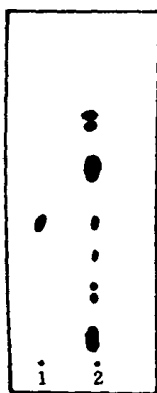
722 型光栅分光光度计 (上海第二分析仪器厂); 蝙蝠葛碱对照品 (中国药品生物制品检定所); 硅胶 G (青岛海洋化工厂); 试剂均为 AR 级。北豆根气雾剂 (黑龙江省医药工业研究所植化室制备)。

2 薄层色谱鉴别

2.1 供试品溶液的制备: 取本品 20 mL, 加氨水 2 mL, 振摇混匀, 用氯仿萃取 3 次 (40, 40, 20 mL), 分取氯仿液蒸干, 用 1 mL 甲醇溶解, 作供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备: 取蝙蝠葛碱对照品, 用甲醇制成 0.5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 薄层色谱鉴别: 吸取上述 2 种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G



1 蝙蝠葛碱

2 北豆根气雾剂

图 1 TLC 图谱

薄层板上, 以氯仿-甲醇-氨水 (8: 2: 0.2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以碘化铋钾试剂^[2]。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点 (图 1)。

3 含量测定

3.1 对照品溶液的制备: 精密称取蝙蝠葛碱适量, 用

甲醇溶解制成 0.1 mg/mL 的溶液, 作对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备: 精密吸取北豆根气雾剂 10 mL, 加氨水 2 mL, 振摇混匀, 用氯仿萃取 4 次 (20, 20, 20, 10 mL), 分取氯仿液, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 作为供试品溶液。

3.3 标准曲线的制备: 精密吸取蝙蝠葛碱对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 分别加 0.1% 溴甲酚绿 0.2 mL, 无水甲醇 5 mL, 摇匀, 用 722 型光栅分光光度计在 620 nm 处测吸光度, 回归方程: $A = 10.9C + 0.00065$, $r = 0.99997$ 。结果表明, 蝙蝠葛碱在 0.2~1.0 mg/mL 呈良好线性关系。

3.4 稳定性试验: 精密吸取一定量的供试品溶液, 按样品测定项下进行操作, 每 1 h 测定 1 次, 结果表明, 供试品在 10 h 内稳定, $RSD = 1.3\%$ 。

3.5 重现性试验: 精密吸取一定量的供试品溶液共 5 份, 按样品测定方法测定, 结果 $RSD = 1.72\%$, 重现性良好。

3.6 回收率试验: 采用加样回收法, 精密吸取已知含量的北豆根气雾剂 1 mL, 准确加入一定量蝙蝠葛碱对照品溶液, 按样品测定方法测定, 测得平均回收率为 98.5%, $RSD = 1.9\%$ ($n = 5$)。

3.7 样品的测定: 精密吸取供试品溶液 2 mL, 蒸干, 加 0.1% 溴甲酚绿 0.2 mL, 无水甲醇 5 mL, 摇匀, 在 620 nm 处测吸光度。结果见表 1。

表 1 北豆根气雾剂中北豆根总碱的测定 ($n = 3$)

批号	北豆根总碱量 (mg/mL)	$RSD (\%)$
000416	9.89	2.13
000527	10.07	1.88
000620	10.11	2.59

4 讨论

通过反复试验, 最后确定了薄层色谱鉴别方法, 该方法灵敏度高, 专属性强, 斑点显色明显, 结果易于观察判断。