2.6 回收率考察: 采用加样回收法。按 2.7项下方法精密吸取石明止血合剂 (020601) 3份,每份 2.5 mL,分别加入 74 mg没食子酸对照品,继续按 2.4项下的方法操作,求得没食子酸平均回收率为 96.75%, RSD= 2.5%, (n= 6)。

2.7 样品溶液的配制和测定: 精密吸取石明止血合剂 5.0 mL,加盐酸 0.5 mL,于水浴中微沸水解 1 h,冷却后用乙醚 20 mL,分 10, 5, 5 mL 3次萃取,合并萃取液置蒸发皿中,蒸干,用乙醇定容至 25 mL量瓶中。精密吸取 1 mL置 5 mL量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取 1 mL上述溶液和 1 mL内标置 5 mL量瓶中,加乙醇稀释至刻度,作为供试品溶液。按选定的方法,测定石明止血合剂中没食子酸含量,结果见表 1。

表 1 石明止血合剂中没食子酸的含量 (n= 3)

Table 1 Determination of gallic acid in Shiming Zhixue Mistura (n= 3)

批 号	没食子酸含量 /(mg·mL^{-1})	RSD/%
020501	27.96	2.9
020601	33.44	2.7
020602	31.26	2.3

3 讨论

3.1 最低检测限: 以信噪比等于 3∶1为标准,测定没食子酸的最小检测浓度为 1 μg/mL。

3.2 运行缓冲液的 pH对分离效果的影响: 在 25 mmol/L硼砂缓冲液 (pH= 9.68)中添加不同浓度的氢氧化钠溶液 (相应 pH分别为 10.52, 12.24)。结果表明, pH为 9.68时的分离效果最佳。

3.3 检测波长的选择: 在实验中,对没食子酸对照品溶液在 200~ 600 nm进行光谱扫描。结果没食子酸在 214 nm处吸收值最大,灵敏度最高,故选择其为测定波长。

3.4 空白试验: 按处方比例制备不含石榴皮、五倍子药材的阴性对照溶液,按样品含量测定方法操作,结果空白溶液在与没食子酸对照品相同保留时间处,未显示明显色谱峰 (图 1),认为无干扰。

References:

[1] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol Ⅰ.

[2] Bian A F, Chang Y P, Jin R L. Determination of gallic acid in Shiming Zhixue Mistura [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1994, 19(5): 287-289.

[3] Wang B Q. *Research of Quality Standard of Standard Materials on Chinese Patent Medicine* (中成药质量标准与标准物质研究) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1994.

[4] Mao X J, Xu Q L, Xiong H L, *et al*. Determination of gallic acid in Relingqing Capsules by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 8(8): 589-591.

[5] An D K. *Selected Topics on Mondern Pharmaceutical Analysis* (现代药物分析选论) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2000.

HPLC测定刺五加软胶囊中异秦皮啶含量

赵陆华,屠 颖,赵振宇,徐继华,王广基*

(中国药科大学 分析中心,江苏,南京 210009)

刺五加软胶囊由刺五加浸膏粉、黄芪、枸杞等 6味中药经特殊制剂工艺提取后,加定量植物油和赋形剂制成,具有益气健脾、补肾安神之功效,用于脾肾阳虚、体虚乏力、腰膝酸痛等。刺五加含有多种化学成分,其中异秦皮啶 (isofraxidin)具有明显的镇静作用。因制剂成分较多,干扰较大,文献报道的异秦皮啶含量 HPLC测定方法[1-3]不适宜本品。经色谱优化,样品处理方法考察,本实验建立了一种 HPLC法测定其中总异秦皮啶含量,重现性好,可用于评价刺五加及其制剂中该成分的指标。

1 仪器与试药

日本岛津 LC-10A高效液相色谱仪, SPD-10A检测器, C-R6A记录仪。甲醇为色谱纯,其余均为分析纯,水为二次重蒸水。异秦皮啶对照品 (中国药品生物制品检定所提供),刺五加软胶囊 (自制,批号: 991011, 991013, 991016)。

2 方法与结果

2.1 测定波长的选择: 取异秦皮啶对照品适量,加流动相溶解,在 200~ 400 nm波长扫描 (图 1)。本品在 343.4 nm处有最大吸收,故选择 344 nm作为检测波长。

2.2 色谱条件: 色谱柱: Alltima C_{18} (4.6 mm× 250 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水-冰醋酸 (45∶55∶1);流速: 1 mL/min;检测波长: 344 nm;进样量: 20 μL。

* 收稿日期: 2003-03-31

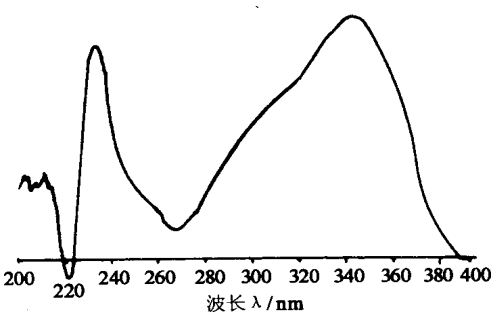


图 1 异秦皮啶 UV光谱图

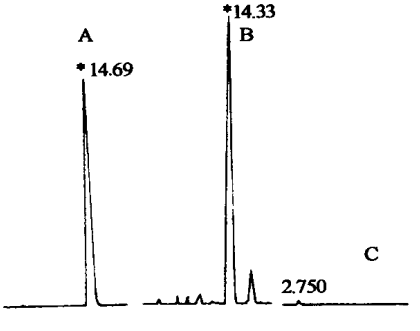
Fig. 1 UV absorption spectrum of isofraxidin

2.3 对照品溶液的制备: 取异秦皮啶对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 62.63 μg/mL的溶液, 作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备: 取本品 6粒, 剪开, 置 100 mL锥形瓶中少量正己烷洗尽油分, 加甲醇 50 mL, 超声 30 min, 放冷, 抽滤, 滤液回收至干, 残渣加 2 mol/L H_2SO_4 30 mL, 沸水浴回流 2 h, 稍冷, 加氯仿 20 mL回流 30 min, 再用氯仿萃取 3次, 每次 20 mL, 水洗两次, 每次 30 mL, 氯仿液回收至干, 加甲醇约 8 mL溶解, 加水定容至 10 mL, -2 ℃冷藏 2 h, 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 阴性对照溶液的制备: 取缺刺五加的其他各味中药按处方工艺制成阴性对照品, 按 2.4项下方法制成阴性对照溶液。

2.6 测定方法: 分别精密吸取上述 3种溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 结果阴性对照溶液无干扰。样品中异秦皮啶色谱峰的保留时间为 14.33 min, 用二极管阵列检测器做峰纯度检查, 匹配度为 999, 表明该峰为纯的色谱峰。色谱图见图 2



* -异秦皮啶

* -isofraxidin

图 2 异秦皮啶对照品 (A)、刺五加软胶囊 (B) 和阴性对照 (C)的 HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of isofraxidin (A), Ciwujia Soft Capsule (B) and negative sample (C)

2.7 方法学考察

2.7.1 标准曲线的制备: 取异秦皮啶对照品适量, 加甲醇制成 21.68, 43.36, 65.04, 86.72, 108.4 μg/mL的溶液, 照高效液相色谱法, 分别取 20 μL注入液相色谱仪, 测定。以浓度为横坐标, 峰面积纵坐标进行回归, 方程为 $Y = 7.3294 \times 10^3 X - 2.3933 \times 10^3$, $r = 0.9997$。结果表明, 异秦皮啶在 21.68~108.4 μg/mL线性良好。

2.7.2 最低检测限: 在信噪比 $S/N = 3$时, 最低检测限为 60.0 ng。

2.7.3 稳定性考察: 同一样品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8 h进样, 测得异秦皮啶浓度的 RSD= 1.7%。表明样品溶液在 8 h内稳定。

2.7.4 精密度试验: 取同一样品溶液连续进样 6次, 测得异秦皮啶的峰面积 RSD= 1.3%。

2.7.5 重现性试验: 取同一批号样品 6份 (991011), 按 2.4项下方法操作, 分别测定异秦皮啶的含量, RSD= 1.6%。

2.7.6 回收率试验: 采用加样回收率测定方法。取刺五加软胶囊 3粒, 添加一定量 (263.0 μg)的异秦皮啶对照品溶液, 按 2.4项下方法操作, 制备成加样回收供试液, 并依法测定。结果异秦皮啶的平均加样回收率为 96.47%, RSD= 2.9% ($n = 6$)。

2.8 样品测定结果: 取 3批样品依法操作, 测定峰面积, 计算样品含量, 结果见表 1。

表 1 刺五加软胶囊中总异秦皮啶的含量测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Isofraxidin in Ciwujia Soft Capsule ($n = 3$)

批 号	总异秦皮啶 /(μg·粒$^{-1}$)
991011	107.8
991013	104.9
991016	107.6

3 讨论

3.1 样品不经水解, 测定的游离型异秦皮啶含量较低, 占总异秦皮啶量的 1/3, 故测定总异秦皮啶更能反映产品内在质量。

3.2 分别考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-水-甲酸、乙腈-0.05 mol/L KH_2PO_4系统, 结果甲醇-水-冰醋酸 (44∶55∶1)系统分离效果最佳。

References

[1] Qiao F, Zhang Q B, Lu S Q. Determination of isofraxidin in Ciwujia Preparation by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(3): 168-169.

[2] Zhang S M, Wang H W, Liu Y J. Determination of isofraxidin in Gengniankang Tablet by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1996, 13(3): 216-217.

[3] Zhou G P, Zhang L J. Study on determination of total isofraxidin in Ciwujia Tablet by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(2): 92-94.