

得回归方程 $Y = 628\ 366.0 X + 775.86$, $r = 0.999\ 9$ 。连翘苷在 $0.078 \sim 0.516\ 8\ \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验:取同一供试品溶液,精密吸取 $10\ \mu\text{L}$ 进样,连续进样 6 次,结果连翘苷峰面积的 RSD 为 0.84% 。

2.8 稳定性试验:取同一供试品溶液,精密吸取 $10\ \mu\text{L}$ 进样,分别在 0.4 、 8 、 12 、 16 、 $20\ \text{h}$ 进样,测定连翘苷峰面积,结果其 RSD 为 0.53% ,表明供试品溶液在 $20\ \text{h}$ 内稳定。

2.9 重现性试验:取同批号(批号 040516)5 份,制备供试品溶液,测定连翘苷的质量分数,结果平均质量分数为 $0.746\ 3\ \text{mg/g}$,RSD 为 1.42% 。

2.10 回收率试验:取桑姜感冒片(批号为 040516) $0.35\ \text{g}$,各 5 份,精密称定,分别精密加入 $6.078\ \mu\text{g/mL}$ 连翘苷对照品溶液 $20\ \text{mL}$,制备供试品溶液,测定,结果连翘苷的平均回收率为 98.9% ,RSD 为 1.47% 。

2.11 样品的测定:取桑姜感冒片 6 批样品,制备供试品溶液,测定,结果见表 1。

表 1 桑姜感冒片中连翘苷的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Results of forsythingnin in Sangjiang Ganmao Tablets ($n=2$)

批 号	连翘苷/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	批 号	连翘苷/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
040204	0.42	040515	0.88
040205	0.60	040516	0.75
040514	0.80	040517	0.63

3 讨论

3.1 波长的选择:经紫外光谱扫描,连翘苷在 $277\ \text{nm}$ 和 $230\ \text{nm}$ 均有最大吸收。经对样品的高效液相色谱图进行对比,采用 $277\ \text{nm}$ 波长测定,无杂质干

扰,分离度符合规定,故选用 $277\ \text{nm}$ 为检测波长。

3.2 流动相的选择:文献报道采用乙腈-水(25:75)和甲醇-乙腈-水(12:18:70)为流动相,通过实验发现,后者较前者分离效果相对较好,能使连翘苷峰与杂质峰的分离度符合规定,故选用甲醇-乙腈-水(12:18:70)为流动相。

3.3 提取方法的选择:桑姜感冒片中药味较多,其他药味及连翘本身的其他成分对连翘苷的分析影响很大。连翘苷在甲醇、乙醇中有很好的溶解性,同时亦溶于醋酸乙酯、三氯甲烷、乙醚,采用液液萃取分离杂质效果不好。曾采用超声处理后直接进样分析、采用氧化铝柱分离后进样分析、采用醋酸铅沉淀分离杂质后进样分析,结果本品超声后直接进样分析时,干扰很大,前沿的杂质峰大,连翘苷峰远达不到基线分离。采用中性醋酸铅沉淀的方法,连翘苷可被沉淀裹加一同沉淀,使测定结果偏低。试验中分别选用氧化铝、聚酰胺、大孔吸附树脂柱处理的办法去除杂质,结果表明,单纯采用以上方法都存在一定的不足。采用中性氧化铝柱分离时,前沿杂质多,未达到基线分离。采用大孔吸附树脂柱处理后的样品,杂质明显降低,缩短了分析时间,但连翘苷峰前有一凸坡使连翘峰未达到基线分离。故选用大孔吸附树脂柱和氧化铝柱处理,可去除大多数杂质,连翘苷峰也分离到基线。同时,试验中摸索了不同体积分数甲醇作为洗脱液对测定的影响,结果表明,采用大孔树脂柱分离时,用 45% 甲醇 $40\ \text{mL}$ 洗脱,可去除前沿的大多数杂质,又不影响被测物质;继续采用 70% 甲醇 $40\ \text{mL}$ 洗脱时,可将被测物质洗脱下来。采用中性氧化铝柱分离时,用 70% 甲醇洗脱后,可除去凸坡的影响,达到基线分离。

HPLC 法测定复方咳嗽枇杷颗粒中甘草酸

李海燕¹, 黄能章²

(1. 佛山科技学院医学院,广东 佛山 528000; 2. 广东怡康制药有限公司,广东 广州 510520)

复方咳嗽枇杷颗粒处方含枇杷、桔梗、苦杏仁、甘草等药材,具有止咳平喘功效,用于上呼吸道感染的治疗。枇杷叶是方中君药,但无明显的定量测定指标;桔梗药材主要含总皂苷,但苦杏仁、甘草等均含

有苷类成分,对其构成干扰,缺少专属性;而甘草中含有甘草酸等成分,在方中无干扰成分,故本实验以甘草酸单胺盐为指标进行 HPLC 定量测定方法研究,以便更好地控制制剂质量。

收稿日期:2005-12-16

作者简介:李海燕(1974—),女,药学讲师,主要从事天然药物化学成分研究及中药制剂质量标准研究工作。

1 仪器与试药

美国奥泰 P₂₄₆ 型液相色谱仪; P₂₄₆ 高压泵, Rheodyne 7725i 型进样阀, 200 型紫外检测器, 千谱色谱工作站。

甘草酸单铵盐对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110736-200423), 复方咳嗽枇杷颗粒(广东怡康制药有限公司), 甲醇(色谱纯), 水(重蒸馏水), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Hypersil ODS2 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2 mol/L 醋酸铵-冰醋酸(63:37:1); 检测波长: 250 nm; 进样量: 10 μL。理论板数以甘草酸峰计算不低于 2 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取甘草酸单铵盐对照品适量, 加甲醇制成 0.2 mg/mL 的溶液(0.2 mg 甘草酸单铵盐折合甘草酸为 0.195 9 mg)。

2.2.2 供试品溶液的制备: 本品适量, 研细, 取 1.0 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 残渣用甲醇洗涤, 合并洗液与滤液, 浓缩至约 1 mL, 加甲醇溶解并定量移入 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备: 按处方制备不含甘草药材的样品, 同法制成阴性对照溶液, 即得。

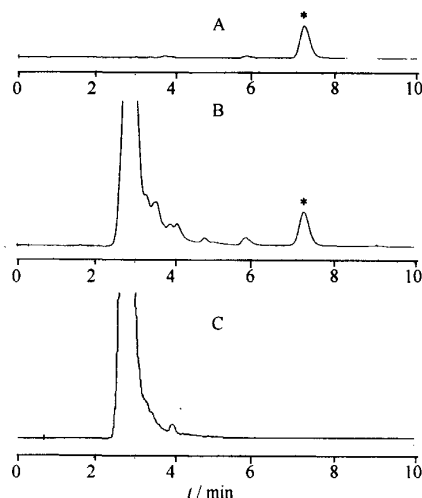
2.3 方法可行性考察: 取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 在上述色谱条件下进样 10 μL, 结果见图 1。可见阴性对照对甘草酸的测定无干扰。

2.4 线性关系的考察: 精密吸取甘草酸单铵盐对照品溶液(0.246 8 mg/mL) 5.0、7.5、10、12.5、15.0 μL, 分别注入液相色谱仪, 测定峰面积。以甘草酸的量(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算其回归方程为: $Y = 20\ 689 + 7.809 \times 10^6 X$, $r = 0.999\ 94$, 表明甘草酸在 1.234~3.702 μg 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取对照品溶液 10 μL, 按上述条件重复进样 5 次, 测定其峰面积, 结果其峰面积的 RSD 为 0.42%。

2.6 重现性试验: 取同一批供试品, 按供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 结果甘草酸单铵盐的平均质量分数为 1.679 mg/g, RSD 为 0.56%。

2.7 稳定性试验: 取供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 每隔 2 h 测定 1 次峰面积, 共 5 次, 结果其峰面积的 RSD 为 1.45%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。



* -甘草酸单铵盐

* -glycyrrhizinic acid monoammonium salt

图 1 甘草酸单铵盐对照品(A)、复方咳嗽枇杷颗粒(B)和缺甘草的阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of glycyrrhizinic acid monoammonium salt reference substance (A), compound Kesou Pipa Granula (B), and negative sample (C)

2.8 回收率试验: 采用加样回收法。分别精密称取含甘草酸单铵盐 1.679 mg/g 的样品 6 份, 各约 0.5 g, 分别精密加入 0.862 mg/mL (相当于甘草酸 0.844 3 mg/mL) 甘草酸单铵盐对照品溶液 1 mL, 制备供试品溶液, 测定, 计算其平均回收率为 102.88%, RSD 为 1.11%。

2.9 样品测定: 分别取 10 批咳嗽枇杷颗粒(规格 5 g/袋), 制备供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 进样, 测定, 采用外标法计算, 结果见表 1。

表 1 复方咳嗽枇杷颗粒中甘草酸的测定结果

Table 1 Results of glycyrrhizinic acid in Compound Kesou Pipa Granula

批号	甘草酸/(mg·袋 ⁻¹)	批号	甘草酸/(mg·袋 ⁻¹)
050501	8.495	050201	6.825
050502	8.184	050202	6.162
050503	8.312	050901	8.319
050301	7.792	050902	8.396
050302	8.331	050903	8.136

3 讨论

3.1 检测波长的选择: 参考《中国药典》2005 年版一部四逆汤项下方法, 选用 250 nm 为检测波长。

3.2 流动相的选择: 参考《中国药典》2005 年版一部四逆汤项下方法, 采用甲醇-0.2 mol/L 醋酸铵-冰醋酸(67:33:1)为流动相, 经过试验, 确定流动

相为甲醇-0.2 mol/L 醋酸铵-冰醋酸(63:37:1)时,样品峰形对称,阴性无干扰。

3.3 供试品提取方法的选择:采用甲醇为提取溶剂,选用超声处理和加热回流两种提取方法进行比较。结果超声 2 次,每次 30 min,仍有有效成分残

留,而加热回流 60 min 时有效成分基本提取完全。

测定结果表明,选用甘草酸作为定量检测指标以及建立的 HPLC 色谱条件,方法灵敏度高、专属性强、重现性好,并通过对 10 批样品含量进行考察,可作为复方咳嗽枇杷颗粒质量控制指标之一。

常规粉碎与超微粉碎的丹参中丹酚酸 B 的比较

张爱军¹, 戴 宁²

(1. 天津天士力集团,天津 300402; 2. 天津达仁堂制药厂,天津 300457)

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎,具有祛瘀止痛,活血通经,清心除烦的作用。其主要成分为脂溶性化合物如丹参酮 I_A 等,水溶性化合物如丹参素、总酚酸等。丹酚酸 B 为总酚酸的主要成分,约占总酚酸的 70%^[1],具有改善血液循环、抗血栓、抗氧化等作用^[2],临床上广泛应用于治疗心血管系统疾病。

有文献报道采用 75% 甲醇提取丹酚酸 B,回流提取 30 min 即可达到峰值^[3],超声提取丹参中水溶性成分 20 min 时最佳^[4]。超微粉碎技术采用机械或流体动力的方式,将物料颗粒粉碎至粒径小于 10 μm 的颗粒^[5],使细胞内的有效成分直接接触到提取用的溶媒,从而达到缩短药材提取时间及提高药材中有效成分的转移率。本实验以丹酚酸 B 为指标,比较经超微粉碎和常规粉碎对丹酚酸 B 提取效果的影响。

1 仪器与材料

Waters Allimce 高效液相色谱仪,2695 Separations Module 四元泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,Waters 2996 二级管阵列检测器,Empower 色谱工作站。DK-98-1 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),JJ2000 型精密电子天平(常熟双杰测试仪器厂),FW80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),KQ-100DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),BFM-6 型粉碎机(济南倍力粉技术工程有限公司)。试剂均为分析纯,纯化水,丹参药材来自陕西商洛天士力丹参 GAP 基地,丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6]:色谱柱:Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59);检测波长:286 nm;体积流量:1 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL。理论板数按丹酚酸 B 峰计算应不低于 2 000。

2.2 丹酚酸 B 对照品溶液的制备:精密称取丹酚酸 B 对照品适量,加 75% 甲醇制成 0.14 mg/mL 丹酚酸 B,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:称取常规或超微粉碎的丹参药材 35 g,加入 75% 乙醇 350 mL 超声提取 20 min,冷却,用 75% 乙醇补足质量,摇匀,滤过,取 5 mL 滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液供 HPLC 分析。

2.4 HPLC 分析结果的比较:HPLC 图谱见图 1,结果见表 1。可以看出,常规粉碎的丹参提取液丹酚酸 B 的量为 1.12%,而超微粉碎为 2.92%,为常规粉碎的 2.6 倍。

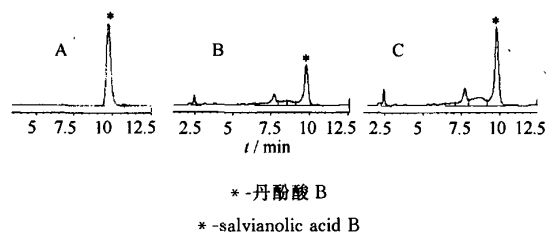


图 1 丹酚酸对照品(A)、常规粉碎丹参(B)和超微粉碎丹参(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of salvianolic acid B reference substance (A), *S. miltiorrhiza* by general communication (B) and superfine communication (C)

3 讨论