

0.25 g,精密称定,分别精密加入含山姜素 0.220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和厚朴酚 0.150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、小豆蔻明 0.010 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、厚朴酚 0.280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL,每个样品平行 3 份,制备供试品溶液。在上述色谱条件下进行分析,计算山姜素、和厚朴酚、小豆蔻明、厚朴酚的质量分数,根据加入量计算回收率,结果加样回收率分别为 97.7%~100.3%、97.3%~98.7%、90.0%~100.0%、98.6%~99.3%,RSD 分别为 1.4%、1.5%、4.3%、0.8%。

2.11 样品测定:取 3 批厚朴温中汤浸膏样品,制备供试品溶液,取供试品溶液 10 μL 进样分析,按外标法计算,得相当于每 1 g 总药材的厚朴温中汤中山姜素、和厚朴酚、小豆蔻明、厚朴酚的质量分数,结果见表 1。

表 1 厚朴温中汤中山姜素、和厚朴酚、小豆蔻明与厚朴酚的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of alpinetin, honokiol, cardamomin, and magnolol in Houpu Wenzhong Decoction ($n=3$)

批号	山姜素/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	和厚朴酚/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	小豆蔻明/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	厚朴酚/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
01	0.224	0.145	0.010	0.278
02	0.226	0.143	0.012	0.286
03	0.230	0.148	0.009	0.290

3 讨论

3.1 流动相的选择:分别用甲醇-水、甲醇-水-醋酸、乙腈-水、乙腈-水-醋酸以不同的比例进行考察,结果表明采用甲醇-水-醋酸系统所得色谱峰峰形良好,保留时间适宜,可达到理想的分离度。

3.2 检测波长的选择:厚朴酚与和厚朴酚的最大吸收为 294 nm,山姜素的最大吸收 286 nm,小豆蔻明的最大吸收为 346 nm,在 294 nm 也有较灵敏的吸收。因此选择 294 nm 可同时测定 4 种成分。

3.3 柱温的选择:分别选择了 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 柱温进行比较,通过对比各种柱温的色谱图发现在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的柱温下有较好的峰形。所以选择了 25 $^{\circ}\text{C}$ 的柱温进行 HPLC 分析。

3.4 样品提取条件的选择:采用回流提取法,考察了水、不同体积分数的甲醇、乙醇作为提取溶剂时 4 种成分的提取结果,发现以甲醇为提取溶剂时提取率较高,分离效果较好,故采用甲醇为提取溶剂。考察了超声法、回流提取法,发现回流提取 0.5 h 效果较好,且操作简单,节省时间,故选择该提取方法。

参考文献:

- [1] 王立青,江荣高,陈蕙芳. 厚朴酚与和厚朴酚药理作用的研究进展[J]. 中草药,2005,36(10):1591-1594.
- [2] 陈泉生. 厚朴的活性成分厚朴酚(Magnolol)对胃液分泌及实验性溃疡的作用[J]. 国外医药:植物药分册,1981,3:38.
- [3] Lee S E, Shin H T, Hwang H J, et al. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(9): 1041-1047.
- [4] Syahida A A, Daud A. Cardamonin, inhibits pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 538: 188-194.
- [5] 阎明熙. 厚朴温中汤加味治愈顽固性十二指肠溃疡[J]. 哈尔滨中医药,1996(1):66-68.
- [6] 黄家瑜. 厚朴温中汤加味治疗慢性浅表性胃炎[J]. 安徽中医临床杂志,1997,9(2):97-98.
- [7] 干国平,江维,刘焱文. 厚朴温中丸质量标准的研究[J]. 中国药师,2007,10(5):438-440.

HPLC 法测定安神颗粒中金丝桃苷和芦丁

兰 静*

(天津市药品审评中心,天津 300070)

摘要:目的 建立测定安神颗粒中金丝桃苷和芦丁的高效液相色谱法。方法 采用 Dimark 十八烷基键合硅胶色谱柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇-1%冰醋酸(28:72);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:359 nm;进样量:20 μL 。结果 金丝桃苷和芦丁在 2.246~5.242 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2.110~4.922 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系, r 分别为 0.999 9 和 0.999 8。平均回收率分别为 101.4%、99.9%。结论 用此法测定安神颗粒中金丝桃苷和芦丁简单易行,结果准确。

关键词:安神颗粒;金丝桃苷;芦丁;高效液相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)10-1583-03

在国外贯叶金丝桃的研究主要集中在抗抑郁作用。安神颗粒采用以贯叶金丝桃为主药。贯叶金丝

桃中含有黄酮类化合物,笔者拟采用亚硝酸钠、硝酸铝法测定总黄酮的量,但因干扰较大,在显色后 510

* 收稿日期:2008-12-20

作者简介:兰 静(1980—),女,天津人,主管药师,硕士,主要从事新药审评。Tel:(022)60255283 E-mail:bluejing80@yahoo.com.cn

nm处未见最大吸收峰,无法测定。金丝桃苷和芦丁是贯叶金丝桃中的主要成分,因此本实验采用高效液相色谱法对金丝桃苷和芦丁定量测定,用以控制安神颗粒的质量。

1 仪器及试剂

日本 Shimadzu 公司 LC-2010A 型高效液相色谱仪系统,CLASS-VP Work Station 工作站。甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司);冰醋酸(天津市化学试剂一厂),金丝桃苷(批号:1521-200202)、芦丁(批号:0080-9705)对照品均为中国药品生物制品检定所提供。安神颗粒(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验:Dimark 十八烷基键合硅胶色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:40 °C;流动相:甲醇-1%冰醋酸(28:72);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:359 nm;进样量:20 μL。理论塔板数以金丝桃苷计不低于 2 000,金丝桃苷和芦丁的分离度大于 1.5,拖尾因子符合要求。

2.2 供试品溶液的制备:取本品约 0.25 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理 20 min,取出,放冷至室温,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.3 对照品贮备液的配制:分别精密称取金丝桃苷和芦丁对照品适量,加甲醇分别制成 7.488、7.032 μg/mL 的金丝桃苷和芦丁对照品溶液。

2.4 线性关系考察:对照品贮备液中分别取 3、4、5、6、7 mL,并分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度。分别取 20 μL 注入液相色谱仪,测定,记录峰面积。以质量为横坐标,峰面积为纵坐标,分别绘制标准曲线,拟合回归方程,分别为金丝桃苷: $Y = 41733 X - 6511.7$, $r = 0.9999$;芦丁: $Y = 30239 X - 5443.9$, $r = 0.9998$,结果表明金丝桃苷和芦丁分别在 2.246~5.242 μg/mL 和 2.110~4.922 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.5 干扰试验:按制法项下制备不含贯叶金丝桃的阴性颗粒,并用甲醇分别制成阴性溶液、安神颗粒供试液、金丝桃苷和芦丁对照品溶液,注入液相色谱仪进行测定。在不含贯叶金丝桃的阴性颗粒剂色谱图中,在金丝桃苷和芦丁出峰的时间范围内未见任何杂质峰,见图 1。

2.6 精密度试验:取对照品贮备液重复进样 6 次,以金丝桃苷和芦丁的峰面积计算,其 RSD 分别为 0.8%、1.6%。

2.7 重现性试验:取同一批样品 6 份,制备供试品

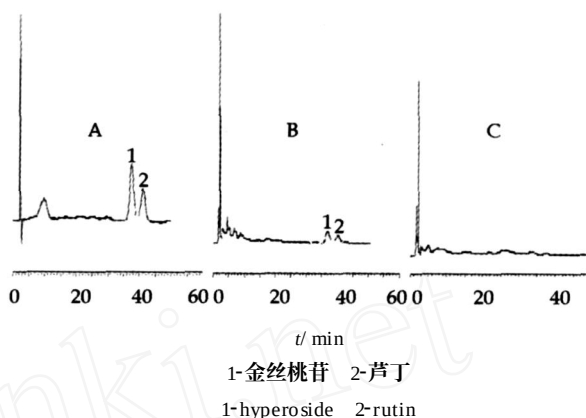


图1 对照品(A)、安神颗粒(B)和阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), Anshen Granula (B), and negative sample (C)

溶液,分别取 20 μL 注入液相色谱仪,分别计算金丝桃苷和芦丁的质量分数,结果 RSD 分别为 1.8%、1.9%。

2.8 稳定性试验:取样品按上述方法制备供试品溶液,在室温自然光下分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定样品中金丝桃苷和芦丁的质量分数,结果其 RSD 均为 1.2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验:分别取安神颗粒细粉 9 份,每份 0.125 g,精密称定,分别置 25 mL 量瓶中,每 3 份分别加入对照品贮备液(金丝桃苷 7.488 μg/mL 和芦丁 7.032 μg/mL) 5.0、6.25、7.5 mL,制备供试品溶液,取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪,计算得金丝桃苷和芦丁回收率分别为 101.4%、99.9%;RSD 分别为 1.00%、1.43%。

2.10 样品测定:分别精密称不同批号的样品,制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,计算金丝桃苷和芦丁的质量分数,结果见表 1。

表1 安神颗粒中金丝桃苷和芦丁测定结果

Table 1 Determination of hyperoside and rutin in Anshen Granula

批号	金丝桃苷/(mg·g ⁻¹)	芦丁/(mg·g ⁻¹)
021128	0.41	0.43
021206	0.42	0.42
021218	0.43	0.43

3 讨论

3.1 检测波长的确定:金丝桃苷和芦丁均属于黄酮类物质,两者以甲醇为溶剂时的紫外最大吸收波长非常接近,分别为 360、359 nm^[1,2],故选择紫外检测波长为 359 nm。

3.2 流动相的选择:因金丝桃苷和芦丁均属于黄酮类物质,且其色谱行为比较接近,根据文献报

道^[3,4],采用甲醇-1%冰醋酸(30:70),金丝桃苷和芦丁保留时间分别约为21、22 min,但本品采用该色谱条件时,两者不能达到基线分离,为使其达到完全分离的目的,实验对流动相甲醇与1%冰醋酸的比例进行了筛选,甲醇与1%冰醋酸的比例分别为30:70、29:31及乙腈与冰醋酸的比例为20:80时,样品中金丝桃苷和芦丁均不能达到基线分离,最终确定甲醇与1%冰醋酸的比例为28:72时,两者的分离度达到了1.5,采用HPLC-二极管阵列检测器检测峰纯度为0.999,理论板数分别为4 805、4 228,保留时间分别约为37、40 min。

3.3 提取方法的研究:采用乙醇和70%乙醇加热

回流30 min的方法处理样品,发现安神颗粒的70%乙醇溶液黏度大,不易滤过,而乙醇溶液色谱峰形不理想。另外取本品加甲醇分别采用加热回流30 min、超声处理20、30 min进行测定,测定结果无明显差异,因此选择超声20 min处理样品。

参考文献:

- [1] 万德光,裴瑾,严铸云.几种金丝桃属药用植物的金丝桃苷含量测定[J].中药材,2004,27(6):397-398.
- [2] 许乾丽,熊慧林,茅向军.黔产3种金丝桃属植物药中金丝桃苷的含量测定[J].药物分析杂志,2003,23(6):414-417.
- [3] Wu Y, Zhou S D, Li P. Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* by HPLC analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2002, 27(4): 280-282.
- [4] 黄琴伟,张文婷,赵维良. HPLC法测定鱼腥草不同生长季节、不同药用部位中黄酮类成分[J]. 中草药,2007,38(8):1253-1255.

热毒宁注射液中细菌内毒素的测定研究

刘涛^{1,2}, 萧伟¹, 王振中¹, 万德光², 彭国平³, 王永香^{1*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2. 成都中医药大学, 四川成都 610075;

3. 南京中医药大学, 江苏南京 210046)

摘要:目的 对热毒宁注射液进行细菌内毒素定量检查试验,建立定量检测热毒宁注射液中细菌内毒素的试验方法。方法 采用《中国药典》2005年版二部附录检测细菌内毒素的动态浊度法。结果 热毒宁注射液在稀释至120倍时用细菌内毒素定量法检测无干扰因素影响,内毒素回收率在50%~200%。结论 使用动态浊度法可以高效地测定热毒宁注射液的细菌内毒素。

关键词:热毒宁注射液;细菌内毒素;动态浊度法;干扰试验

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)10-1585-03

热毒宁注射液主要组成药味为青蒿、栀子、金银花,具有清热、疏风、解毒之功效,临床用于上呼吸道感染(外感风热症)所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症,其疗效显著。热毒宁注射液质量标准中对注射剂采用家兔法进行热原检查,但家兔法进行热原检查操作复杂,时间长。根据细菌内毒素定量检测方法(动态浊度法)具有灵敏度高、快速、准确、操作简便等优点,本实验按《中国药典》2005年版二部附录的细菌内毒素法及其应用指导原则建立热毒宁注射液细菌内毒素定量检测方法,确保临床用药安全。

1 仪器与材料

BET-16M 细菌内毒素测定仪(天津市天大天

发科技有限公司);涡旋混合器(天津天大天发科技有限公司);FZQ-2型涡旋混合器(江苏泰县医疗器械厂)。

鲎试剂(批号0812062, $\lambda = 0.03$ EU/mL,规格0.6 mL/Amp,湛江博康海洋生物有限公司);细菌内毒素工作标准品(批号150601-20086,160 EU/Amp,中国药品生物制品检定所);细菌内毒素检查用水(批号080320,规格5 mL/Amp,湛江博康海洋生物制品有限公司)。热毒宁注射液由江苏康缘药业股份有限公司生产。

2 方法和结果

2.1 细菌内毒素细菌内毒素限值(L)的确定:按《中国药典》2005年版二部附录可知人每千克每小

* 收稿日期:2009-03-12

基金项目:国家科技攻关项目(2004BA721A42)

作者简介:刘涛(1976—),男,四川南充人,高级工程师,成都中医药大学在读博士,研究方向为中药品种、质量及资源开发研究,已在各类核心期刊发表论文15篇,曾荣获江苏省科技进步二等奖、连云港市科技进步特等奖等8项市级以上奖励,享受连云港市政府特殊津贴。Tel:(0518)85521943 E-mail:liutao0578@sina.com

* 通讯作者 王永香 Tel:(0518)85521933