

双波长UPLC法同时测定艾滋病口腔含漱液中梓醇、哈巴昔和哈巴俄昔的含量^Δ

杨 辉*(南宁食品药品检验所, 南宁 530001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3414-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.35

摘要 目的:建立同时测定艾滋病口腔含漱液中梓醇、哈巴昔和哈巴俄昔含量的方法。方法:采用双波长超高效液相色谱法,色谱柱为Eclipse Plus C₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.2 ml/min,波长切换,0~8 min在210 nm波长测定梓醇和哈巴昔的含量,8~15 min在280 nm波长测定哈巴俄昔的含量,柱温为30 ℃,进样量为2 μl。结果:梓醇、哈巴昔、哈巴俄昔进样量分别在0.018 5~0.129 2、0.014 0~0.098 3、0.015 7~0.110 0 μg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999 6$ 、 $0.999 7$ 、 $0.999 7$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.77%;平均加样回收率分别为99.44%、99.90%、100.20%,RSD分别为0.75%、0.82%、0.73%($n=6$)。结论:该方法操作简便、重复性好,可以更有效地控制艾滋病口腔含漱液的质量。

关键词 超高效液相色谱法;艾滋病口腔含漱液;梓醇;哈巴昔;哈巴俄昔;含量测定

Simultaneous Determination of the Content of Catalpol, Harpagide and Hapagoside in AIDS Oral Gargle by Double-wavelength UPLC

YANG Hui(Nanning Institute for Food and Drug Control, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of the content of catalpol, harpagide and hapagoside in AIDS oral gargle. METHODS: Dual-wavelength UPLC was performed on the column of Eclipse Plus C₁₈ with mobile phase of acetonitrile -0.05% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.2 ml/min. Wavelength was switching, it was set at 210 nm to determine the contents of catalpol and harpagide in the first 8 min and then changed to 280 nm to determine the content of hapagoside in 8-15 min. The column temperature was 30 ℃, and injection volume was 2 μl. RESULTS: The linear range was 0.018 5-0.129 2 μg ($r=0.999 6$) for catalpol, 0.014 0-0.098 3 μg ($r=0.999 7$) for harpagide and 0.015 7-0.110 0 μg ($r=0.999 7$) for hapagoside; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 0.77%; average recoveries were respectively 99.44% (RSD=0.75%, $n=6$), 99.90% (RSD=0.82%, $n=6$) and 100.20% (RSD=0.73%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple can reproducible, and can be used for effectively quality control.

KEYWORDS UPLC; AIDS oral gargle; Catalpol; Harpagide; Hapagoside; Content determination

艾滋病口腔含漱液是广西横县人民医院中医科根据传统中医古方“增液汤”加味组成,由地黄、玄参、苦参、麦冬、南沙参、黄连^[1]、岗梅^[2]、胶股蓝^[3]等8味药组成。本含漱液具有清热、抗炎、抗菌、调节免疫功能的作用,并对艾滋病患者的口腔病损防治具有较好的功效,且价格低廉、使用方便、口感良好、患者乐于接受^[4-5]。原质量标准只是对制剂的性状、检查项下的相对密度、其它项进行检验,没有对制剂中君药地黄、玄参中的有效成分梓醇、哈巴昔和哈巴俄昔进行含量测定。为了更好地控制药品质量,保证公众用药的安全有效,笔者参考相关文献报道^[6-7],采用双波长UPLC法切换同时对艾滋病口腔含漱液中梓醇、哈巴昔和哈巴俄昔的含量进行测定,经方法学考察结果令人满意。

1 材料

1.1 仪器

1290型HPLC仪,包括G4226A自动进样器、G4212A二极

Δ 基金项目:广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项课题(N0.GZYZ1121)

* 副主任药师。研究方向:药品检验、质量标准与提高。电话:0771-3100835。E-mail: yh07719001@21cn.com

管阵列检测器、G4204A四元泵、G2170AA数据处理软件系统(美国Agilent公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-300型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

艾滋病口腔含漱液(广西中医药大学第一附属医院制剂室制备,批号:20131013、20131015、20131018,规格:200 ml/瓶)。梓醇对照品(批号:110808-201210,纯度:98.1%)、哈巴昔对照品(批号:111729-201204,纯度:94.5%)、哈巴俄昔对照品(批号:111730-201106,纯度:96.0%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为高纯水。

1.3 药材

试验用药材地黄(产地:河南新乡,批号:20130201)、玄参(产地:河南南阳,批号:20121120)、苦参(产地:广西河池,批号:20130710)、麦冬(产地:四川绵阳,批号:201201022)、南沙参(产地:甘肃张掖,批号:20130218)、黄连(产地:四川洪雅,批号:20130301)、岗梅(产地:广西河池,批号:20130501)、胶股蓝(产地:广西柳州,批号:20130420)均由广西横县人民医院从广西一心医药有限责任公司提供,并经本所中药室鉴定为现行药品标准收载品种,符合规定;艾滋病口腔含漱液(广西中医药大学第一附属医院制剂室制备,批号:20131013、

20131015、20131018,规格:每瓶装 200 ml),试验所用剩余药材已退横县人民医院药库。

2 方法及结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱,程序详见表1;流速:0.2 ml/min;检测波长:波长切换,0~8 min在210 nm波长测定梓醇和哈巴苷的含量,8~15 min在280 nm波长测定哈巴俄苷的含量;柱温:30 °C;进样量:2 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0~4	2	98
4~8	2→10	98→90
8~12	10→35	90→65
12~15	35→50	65→50

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取干燥至恒质量的梓醇、哈巴苷、哈巴俄苷对照品 9.41、7.43、8.19 mg,分别置于 100 ml 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.092 3、0.070 2、0.078 6 mg/ml 的对照品贮备液。分别精密吸取对照品贮备液各 5.0 ml,置于 20 ml 棕色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品混合溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取艾滋病口腔含漱液 5.0 ml,置于 50 ml 量瓶中,加 50% 甲醇稀释并定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照液 按广西横县人民医院提供的处方比例及制备工艺要求,分别配制不含地黄、玄参药材的阴性对照品,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制成阴性对照液。

2.3 系统适用性试验

采用外标峰面积法计算,在“2.1”项色谱条件下,阴性对照溶液的色谱图在梓醇、哈巴苷和哈巴俄苷对照品保留时间的相应位置上无干扰峰出现,表明阴性对照对测定无干扰。色谱见图 1。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下对照品贮备液 1.0、2.0、3.0、5.0、7.0 ml,分别置于 10 ml 棕色量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀。吸取上述不同浓度对照品溶液分别进样,按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,梓醇、哈巴苷和哈巴俄苷的回归方程分别为 $y=162.32x+51.24$ ($r=0.999\ 6, n=5$)、 $y=120.33x+6.89$ ($r=0.999\ 7, n=5$)、 $y=179.04x+1.79$ ($r=0.999\ 7, n=5$)。结果表明,梓醇、哈巴苷和哈巴俄苷的进样量分别在 0.018 5~0.129 2、0.014 0~0.098 3、0.015 7~0.110 0 μg 范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 2 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。结果,梓醇、哈巴苷和哈巴俄苷峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.74%、0.63%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液(批号:20131013)适量,分别于配制 0、2、4、

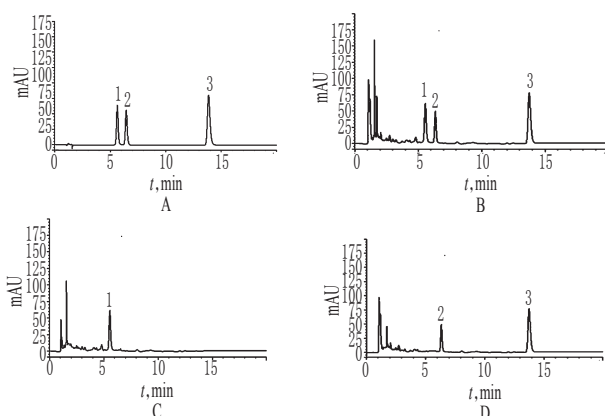


图1 超高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.缺玄参的阴性样品;D.缺地黄的阴性样品;1.梓醇;2.哈巴苷;3.哈巴俄苷

Fig 1 UPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative sample without Figwort root; D. negative sample without Rehmannia glutinosa; 1. catalpol; 2. harpagide; 3. hapagoside

6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,梓醇、哈巴苷、哈巴俄苷峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.76%、0.64%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批艾滋病口腔含漱液(批号:20131013)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,并计算各组分含量。结果,梓醇、哈巴苷、哈巴俄苷的含量分别为 0.090 5、0.100 6、0.110 4 mg/ml,峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.70%、0.77%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品(批号:20131013)3.0 ml,置于 50 ml 量瓶中,分别精密加入梓醇对照品贮备液 2.5、3.0、3.5 ml,哈巴苷和哈巴俄苷对照品贮备液各 3.5、4.5、5.0 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,取供试品溶液和对照品混合溶液各 2 μl,分别注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果详见表 2。

2.9 样品含量测定

取艾滋病口腔含漱液不同批号样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 2 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算样品中梓醇、哈巴苷和哈巴俄苷的含量,结果详见表 3。

3 讨论

3.1 对照品溶液配制比例的选择

哈巴苷和哈巴俄苷均为环烯醚萜类化合物,2010年版《中国药典》(一部)^[1]中玄参的主要成分哈巴苷和哈巴俄苷对照品溶液的配制比例约为 3:1。而在本试验中这两个成分含量相差不大,经过考察主要原因是该制剂生产过程中采用经炮制的玄参饮片入药,哈巴俄苷转化为哈巴苷,从而使其制剂中这两个成分含量相差不大,这也与相关资料报道结果^[7]一致。

3.2 检测波长的选择

在试验中,将梓醇、哈巴苷和哈巴俄苷对照品混合溶液,在 DAD 进行全波长紫外扫描。结果,梓醇、哈巴苷在 210 nm 处,哈巴俄苷在 280 nm 处吸收值最大,并在此波长无干扰,故

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests (n=6)

待测成分	取样量, ml	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
梓醇	3.0	0.271 5	0.230 8	0.501 6	99.70	99.44	0.75
	3.0	0.271 5	0.230 8	0.499 2	98.66		
	3.0	0.271 5	0.276 9	0.549 3	100.32		
	3.0	0.271 5	0.276 9	0.544 5	98.59		
	3.0	0.271 5	0.323 0	0.591 9	99.19		
	3.0	0.271 5	0.323 0	0.595 1	100.19		
哈巴昔	3.0	0.301 8	0.245 7	0.548 7	100.49	99.90	0.82
	3.0	0.301 8	0.245 7	0.544 2	98.66		
	3.0	0.301 8	0.315 9	0.616 9	99.75		
	3.0	0.301 8	0.315 9	0.618 4	100.22		
	3.0	0.301 8	0.351 0	0.650 6	99.37		
	3.0	0.301 8	0.351 0	0.656 0	100.91		
哈巴俄昔	3.0	0.331 2	0.275 1	0.604 9	99.49	100.20	0.73
	3.0	0.331 2	0.275 1	0.607 4	100.40		
	3.0	0.331 2	0.353 7	0.685 5	100.17		
	3.0	0.331 2	0.353 7	0.682 1	99.21		
	3.0	0.331 2	0.393 0	0.728 2	101.02		
	3.0	0.331 2	0.393 0	0.727 7	100.89		

表3 样品含量测定结果(n=3, mg/ml)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=3, mg/ml)

批号	梓醇	哈巴昔	哈巴俄昔
20131013	0.090 5	0.100 6	0.110 4
20131015	0.096 2	0.110 9	0.120 4
20131018	0.097 5	0.111 3	0.121 5
均值	0.094 7	0.107 6	0.117 4

选择双波长切换: 0~8 min 在 210 nm 波长测定梓醇、哈巴昔的含量, 8~15 min 在 280 nm 波长测定哈巴俄昔的含量。

3.3 流动相的选择

参考文献报道^[8-9], 试验中考察了不同比例的甲醇-醋酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-醋酸水溶液

的流动相对该制剂中的梓醇、哈巴昔和哈巴俄昔与其他成分的分选效果, 最后选定为: 以乙腈为流动相 A, 以 0.05% 磷酸为流动相 B, 按本试验设计的规定梯度洗脱, 出峰时间约为 5.5、6.5、13.8 min, 基线稳定, 对照品与样品中其他组分达到基线分离, 且出峰时间适宜, 阴性对照色谱中无干扰峰出现, 专属性强, 故选择该流动相, 结果令人满意。

综上所述, 本方法操作简便、重复性好, 可以更有效地控制艾滋病口腔含漱液的质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 108、115、144、188、228、285、附录 36.
- [2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准: 第一卷[S]. 2008 年版. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008: 120.
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区中药饮片炮制规范[S]. 2007 年版. 南宁: 广西科学技术出版社, 2007: 277.
- [4] 陈振念, 何艳英, 卫奕荣. 中药含漱液防治艾滋病口腔病损 102 例疗效观察[J]. 四川中医, 2010, 28(10): 114.
- [5] 何艳英, 郑培秋, 卫奕荣. 中药含漱液防治艾滋病口腔病损的疗效观察[J]. 广西医学, 2008, 30(12): 1 868.
- [6] 苏雪清, 黄燕萍. HPLC 法测定小儿清解颗粒中梓醇的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1 428.
- [7] 白云娥, 袁鹏飞, 王庆辉, 等. HPLC-UV 波长转换法测定玄参药材及饮片中哈巴昔与哈巴俄昔的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2 697.
- [8] 孙琳林, 任岩海, 陈海玲, 等. RP-HPLC 法测定左归丸中梓醇的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(4): 374.
- [9] 魏庆华, 王勤. HPLC 测定增液承气口服液中含哈巴昔和哈巴俄昔含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 81.

(收稿日期: 2014-12-09 修回日期: 2015-06-19)

(编辑: 余庆华)

以自主创新走特色发展之路的立方制药

创立于 2002 年的合肥立方制药股份有限公司, 被国家科技攻关项目指南对“渗透泵控释技术”的高度评价所吸引, 开始了自主创新与特色发展之路。围绕国际上第一个非洛地平渗透泵控释产品的开发, 立方制药先后获得科技部中小企业创新基金、火炬计划以及安徽省重大专项支持, 从而在渗透泵控释技术领域上实现了“重点跨越”, 成为国内的佼佼者, 达到国际先进水平。

科技创新是企业的最高效率, 规范管理为立方赢得快速升级。经过十余年的快速发展立方已成长为科工贸一体的企业集团。目前立方制药下属三家医药工业、一家医药商业、一家医药连锁企业, 从创立之初的年销售不足 3000 万元, 短短几年就突破了 10 亿元大关。立方制药先后获得国家高新技术企业、安徽省创新型企业、安徽省企业技术中心、安徽省药物缓释工程技术中心、中国化学制药工业综合实力百强企业等荣誉称号。“立方”商标被认定为“中国驰名商标”。

立方制药主导产品非洛地平缓释片(II), 是国内外首个将非洛地平与激光打孔渗透泵控释技术相结合的高血压治疗用药,

以先进制剂技术提升临床疗效及改善患者治疗依从性。公司的亮菌口服溶液用于慢性肝炎、迁延性肝炎、慢性胆管炎、胆囊炎、慢性、浅表性、萎缩性胃炎, 化疗引起的白细胞减少的辅助治疗, 用药人群广以及天然提取物的安全性, 使产品广受医患欢迎。公司的丹皮酚软膏是治疗湿疹皮炎的中药软膏剂, 不含激素, 用于各种皮炎、皮肤瘙痒症以及蚊虫叮咬所引起的痛痒, 品牌影响力及市场销量在同品种中占主导地位。用于良性前列腺增生的甲磺酸多沙唑啉缓释片是公司的第二款渗透泵技术产品。公司尚有多项特色独家产品益气和胃胶囊、坤宁颗粒、复方土荆皮凝胶、克痊隐酮凝胶等。

立方制药坚持以临床需求为导向, 形成以高技术门槛为特征的研发产品布局, 研发产品管线涵盖心血管、糖尿病、呼吸系统以及精神神经等重大疾病, 并成为在渗透泵制剂领域拥有研发品种数量最多、掌握技术类型最全面的企业。依托与中国科技大学及清华大学共建的立方制药“企业博士后工作站”, 先后开展了“长效与靶向注射给药技术”、“全人源抗体工程技术”等研究, 培育了企业的持续创新能力。