

中空纤维离心超滤-HPLC法测定茵栀黄口服液中绿原酸的含量

安 静^{1*},董占军^{1#},王 冉²(1.河北省人民医院药学部,石家庄 050051;2.河北医科大学药学院,石家庄 050017)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)48-4594-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.48.31

摘 要 目的:建立测定茵栀黄口服液中绿原酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法,样品经中空纤维离心超滤法处理后进行测定。色谱柱为 Sapphire C₁₈柱,流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(15:85, V/V),检测波长为327 nm,流速为1.0 ml/min,进样量为20 μl,柱温为25 ℃。结果:绿原酸检测质量浓度在7.5~120 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.6%;平均加样回收率为98.5%,RSD=1.5%($n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、经济、环保,有利于更加客观、全面地评价及控制茵栀黄口服液的质量。

关键词 中空纤维离心超滤法;高效液相色谱法;茵栀黄口服液;绿原酸;含量测定

Content Determination of Chlorogenic Acid in Yinzhihuang Oral Liquid by Hollow Fiber Based Centrifuge Ultrafiltration-HPLC

AN Jing¹, DONG Zhan-jun¹, WANG Ran²(1. Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the content determination of chlorogenic acid in Yinzhihuang oral liquid. **METHODS:** A hollow fiber based centrifuge ultrafiltration pretreatment procedure combined with HPLC was applied to purify solution samples. The separation was carried out on a Sapphire C₁₈ column with acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (15:85, V/V) as mobile phase at flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 327 nm, the sample size was 20 μl, and the column temperature was set at 25 ℃. **RESULTS:** The linear range for chlorogenic acid was 7.5-120 μg/mL ($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 98.5% (RSD=1.5%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.6%. **CONCLUSIONS:** The method is simple, accurate, economical and environmental, and contributes to objective and comprehensive quality evaluation and control of Yinzhihuang oral liquid.

KEY WORDS Hollow fiber based centrifuge ultrafiltration; HPLC; Yinzhihuang oral liquid; Chlorogenic acid; Content determination

茵栀黄口服液是由茵陈提取物、栀子提取物、黄芩苷、金银花提取物等几种成分制成的传统中成药,具有清热解毒、利湿退黄之功效^[1]。其中,君药茵陈、佐使药金银花中的主要活性成分为绿原酸。茵栀黄口服液经灭菌后产生沉淀,说明有杂质经水提醇沉处理后仍未被除尽^[2]。金银花提取物含大量的蛋白质、多糖、树脂、黏液质等大分子杂质^[3],栀子提取物中含多肽和蛋白质等,黄芩苷提取物含鞣质和蛋白质等。《中国药典》(2010年版)中并未对茵栀黄口服液中的绿原酸进行控制^[4],茵栀黄口服液中绿原酸的含量分析也未见文献报道。且近两年的相关文献对茵栀黄其他制剂中绿原酸的高效液相色谱(HPLC)法测定中,只在进样前用0.45 μm微孔滤膜滤过或不处理^[4-7],无法除净这些大分子杂质,会对色谱柱造成损害。

中空纤维离心超滤法操作简便、省时、经济,既能有效地除去大分子杂质,避免其在色谱柱上沉积堵塞,从而延长色谱柱的使用寿命^[8-9],而且处理时间短,能有效防止对光敏感的绿原酸在处理过程中发生降解,提高分析样品的准确性,适于中

药液体制剂的质量控制。同时,该方法重复性好,有机溶剂用量少,有益环保。因此,本研究采用中空纤维离心超滤法进行样品前处理,通过测定茵栀黄口服液中绿原酸的含量以达到更加客观、全面地评价及控制该制剂质量的目的。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱系统,包括Series 200型高压泵(美国Perkin Elmer公司)、785 A型紫外检测器(美国Applied Biosystems公司)、CT-22型色谱信号采集单元(南京千谱软件有限公司)、HW-2000色谱工作站(上海千谱软件有限公司);KQ-250E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP211D型精密电子天平(德国Sartorius公司);聚砜中空纤维、聚丙烯中空纤维(截留分子量:30 000,杭州凯洁膜分离技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200413);茵栀黄口服液(北京双鹤高科天然药物有限责任公司,批号:272109、272157、272440,规格:10 ml×6支);甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱:Sapphire C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:

* 硕士研究生。研究方向:药品的质量研究与控制。E-mail: anjingyaofen@163.com

通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:医院药事管理、中药的质量研究与控制。电话:0311-85988604。E-mail: 13313213656@126.com

乙腈-0.4%磷酸溶液(15:85, V/V);检测波长:327 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μ l;柱温:25 $^{\circ}$ C。该色谱条件下,绿原酸保留时间为8.2 min,理论板数以绿原酸峰计不低于7 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品7.5 mg,置于25 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为300 μ g/ml的绿原酸对照品贮备液。精密量取该贮备液2 ml,加入5 ml棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为120 μ g/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取茵栀黄口服液样品5 ml,置于50 ml棕色量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,再精密量取5 ml,置于50 ml棕色量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得样品溶液。将中空纤维切成16 cm的小段,放入水中超声清洗15 min(功率:250 W,频率:40 kHz),晾干,备用。吸取适量上述样品溶液注入小玻璃管中,将已清洗干净的中空纤维弯成U型,并置于小玻璃管中,以离心半径为8 cm,4 000 r/min离心15 min,取出中空纤维,收集中空纤维内的液体,即得供试品溶液。

2.3 选择性试验

在“2.1”项色谱条件下,分别取对照品溶液和供试品溶液进样测定,记录色谱,详见图1。结果,绿原酸色谱峰与其他共存组分的分离度良好,其他组分不干扰绿原酸的测定。

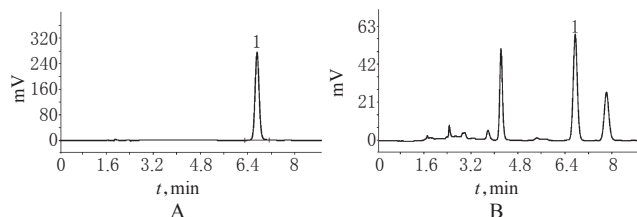


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.绿原酸

Fig 1 HPLC chromatogram

A. substance control; B. test sample; 1. chlorogenic acid

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液5 ml,置于10 ml棕色量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得绿原酸质量浓度为60 μ g/ml的溶液,如此依次稀释得绿原酸质量浓度分别为120、60、30、15、7.5 μ g/ml的系列线性工作溶液。各取20 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样分析。以绿原酸的峰面积(y)对其浓度(x)进行线性回归,得回归方程 $y=1.04 \times 10^5 x - 7.13 \times 10^4$ ($r=0.9999$)。结果表明,绿原酸检测质量浓度在7.5~120 μ g/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 检测限和定量限

分别取“2.4”项下不同质量浓度的绿原酸系列线性工作溶液20 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样分析,测定色谱峰的信噪比(S/N)。以S/N=10计,绿原酸的定量限为36.9 ng/ml;以S/N=3计,绿原酸的检测限为11.1 ng/ml。

2.6 精密度试验

取“2.4”项下质量浓度为60 μ g/ml的绿原酸对照品溶液,连续进样6次,记录峰面积。结果,RSD=0.9%,表明仪器的精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下同一供试品溶液适量,分别于制备后0、2、

4、6、8、12 h进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.6%,表明供试品溶液在12 h内质量稳定。

2.8 重复性试验

取6支茵栀黄口服液(批号:272109),分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.6%,表明本方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取同一批号样品(批号:272109)适量,共6份,分别加入一定量的绿原酸对照品,加水稀释至10 ml,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

取样量, ml	所含量, μ g	加入量, μ g	测得量, μ g	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
3	13.6	15.0	28.1	96.6		
3	13.6	15.0	28.3	97.8		
3	13.6	15.0	28.4	98.6		
3	13.6	15.0	28.3	97.8	98.5	1.5
3	13.6	15.0	28.7	101.0		
3	13.6	15.0	28.5	99.1		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,采用标准曲线法计算其中绿原酸的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Content determination of samples(n=3)

批号	含绿原酸的量, mg/ml	RSD, %
272109	0.443	
	0.461	2.0
	0.456	
0.470		
272157	0.464	1.0
	0.473	
	0.473	
272440	0.455	1.2
	0.453	
	0.463	

3 讨论

3.1 流动相的选择

本试验比较了甲醇-水系统与乙腈-水系统作为流动相的洗脱情况,结果发现,选用乙腈-水(15:85, V/V)时绿原酸获得了较好的分离,在水相中加入0.4%的磷酸,改善了绿原酸峰的拖尾现象。故最终选择乙腈-0.4%磷酸溶液(15:85, V/V)作为本试验的流动相。

3.2 中空纤维膜材的选择

不同膜材的中空纤维对药物制剂中的待测成分的吸附性不同,为了减少由于膜吸附造成的测定误差,本试验考察了聚砜(截留分子量:30 000)、聚丙烯(截留分子量:30 000)两种膜材的中空纤维对绿原酸的吸附性。结果表明,聚砜中空纤维对绿原酸几乎不吸附,所测得的绿原酸的回收率大于97.4%,其吸附性较聚丙烯中空纤维小。故最终选择聚砜中空纤维用于本试验。

3.3 中空纤维离心超滤法的优势

绿原酸见光易分解,所以试验所用的玻璃仪器为棕色容

丙泊酚的体内药物浓度分析方法研究进展^Δ

李锐莉*,吴寅,赵超,贾娜,李玉文,王超,曹珊珊,王璐,文爱东[#](第四军医大学西京医院药剂科,西安 710032)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)48-4596-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.48.32

摘要 目的:为准确测定丙泊酚的体内药物浓度提供参考。方法:查阅文献,对常用的几种丙泊酚的体内药物浓度分析方法进行归纳和总结。结果与结论:丙泊酚的体内药物浓度分析常用方法包括高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法和气相色谱-质谱联用法,每种方法都各有其利弊,且其线性范围均能满足临床需要。不同的药物浓度分析方法具有不同的灵敏度和特点,其中高效液相色谱法相对比较常用。新的更精密的分析方法还有待进一步探索。

关键词 丙泊酚;体内药物浓度;分析方法;进展

丙泊酚是广泛应用于麻醉诱导和维持的静脉麻醉药,其应用于临床已有20多年,由于诱导迅速、体内代谢快、维持时间短、麻醉过程平稳易于控制、停药后苏醒快、临床性能良好等特点^[1],广泛用于多种手术的麻醉和重症加强护理病房(ICU)镇静。丙泊酚的主要不良反应有注射痛、肌阵挛、呼吸暂停、动脉血压下降等,偶尔还可引起注射部位血栓性静脉炎。丙泊酚由于具有脂溶性高、分布体积大、组织再分布速度快等特点,在体内能够快速发挥作用。但是,丙泊酚的定量仍然面临着一些特殊的挑战,如体内药物浓度低、在空气中易被氧化等。目前,常用的分析丙泊酚体内药物浓度的方法有高效液相色谱(HPLC)法、液相色谱-质谱联用(LC-MS)法和气相色谱-质谱联用(GC-MS)法等。本文拟对丙泊酚体内药物浓度分析的必要性及主要方法作一综述。

1 丙泊酚体内药物浓度分析的必要性

药物进入体内后,其作用强度与体液中的药物浓度相关,血液、尿液是常用的体内分析样品。丙泊酚进入人体后,其药动学受性别、体质量、年龄、人种和伴发疾病等多个因素的影响。性别对丙泊酚的药物代谢的影响主要跟生理参数如心输

出量和脂肪含量有关,一般女性的脂肪含量比男性要高,女性的外周室表观分布容积要比男性大。徐晓莹等^[2]研究发现,丙泊酚的清除率与去脂体质量呈正相关,但与年龄呈负相关。侯芝绮等^[3]研究发现,60岁以上的老年人中央室清除率随年龄增加呈线性减少,中央室容积随之减少,这可能与老年人的心脏、肝、肾功能自然衰退有关。Ortolani O等^[4]研究发现,白种人、中国人、马来西亚人和印度人使用丙泊酚后,手术期间的刺激反应和手术后的苏醒时间有差异,这可能是由于不同的人种间代谢酶的等位基因不同造成丙泊酚的药动学过程不同。丙泊酚的代谢主要在肝脏进行,90%以上的丙泊酚在肝脏代谢为水溶性的4-羟基丙泊酚,再在其他组织中通过葡萄糖苷酸和硫酸盐的共轭作用,生成无活性的最终代谢产物1'-葡萄糖醛酸或硫酸盐的丙泊酚经肾脏排泄。在尿内以原型排出部分不足1%,随粪便排泄部分仅2%。王同春等^[5]的研究表明,肺组织含有与丙泊酚羟基化相关的细胞色素P₄₅₀酶以及葡萄糖醛酸化相关的尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶,因此肺也参与丙泊酚的代谢,可使丙泊酚转化成2,6-二异丙基-1,4-对苯二酚。因此,肝、肾疾病患者或肺部疾病患者都存在丙泊酚的代

器,且用黑色材料遮光。与其他样品前处理方法相比,本试验所采用的中空纤维离心超滤法更简便、省时,有效地减少了绿原酸暴露在光照下的时间,使绿原酸的测定结果更为准确。

综上所述,该方法操作简便、结果准确、经济、环保,有利于更加客观、全面地评价及控制茵栀黄口服液的质量。

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,2010:871.
[2] 高希章,李冠忠,申效国.茵栀黄口服液的工艺研究[J].山东医药工业,1996,15(3):1.

Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2011ZXJ09302)

* 硕士研究生。研究方向:药物色谱分析。电话:029-84775475-8211。E-mail:lwrcll@163.com

通信作者:主任药师,博士研究生导师。研究方向:新药研发、临床药理及合理用药。电话:029-84773636。E-mail:adwen-2004@hotmail.com

[3] 韩伟,刘志平,马婧,等.金银花中绿原酸的超滤纯化[J].南京工业大学学报:自然科学版,2009,31(4):17.
[4] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC测定苍苓止泻口服液中绿原酸含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):121.
[5] 史宏妍,潘成学.HPLC法同时测定小儿热速清颗粒中绿原酸和黄芩苷的含量[J].中国药房,2012,23(16):1531.
[6] 李延雪,杨立志,苏玉娟.高效液相色谱法测定复方苓兰口服液中绿原酸含量[J].中国药业,2013,22(4):34.
[7] 唐慧慧,蔡清宇.高效液相色谱法测定柴银口服液中绿原酸含量[J].解放军药科学学报,2011,27(5):442
[8] 孙婷,孙玉刚,李璐沫,等.羟丙甲纤维素滴眼液中苯扎溴铵的中空纤维分离-HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2009,40(9):705.
[9] 李新民,孙玉江,陈璟.中空纤维超滤膜装置模糊控制的研究[J].纺织学报,1997,18(4):216.

(收稿日期:2013-03-21 修回日期:2013-10-31)