

HPLC法同时测定曲克芦丁香豆素片中曲克芦丁和香豆素的含量[△]

施洁明*,林 玲(广州市药品检验所,广州 510160)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1994-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.26

摘要 目的:建立同时测定曲克芦丁香豆素片中曲克芦丁和香豆素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil C₁₈,以0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节pH值至4.4)为流动相A,乙腈为流动相B,梯度洗脱,流速为0.5 ml/min,检测波长为276 nm。结果:曲克芦丁和香豆素检测质量浓度线性范围分别为1.00~200.98、1.05~42.19 μg/ml(*r*均为0.999 9),平均回收率分别为99.8%、99.5%,RSD分别为0.6%、0.8%(*n*=9)。结论:该方法简便、准确,可用于曲克芦丁香豆素片的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;曲克芦丁;香豆素;片剂;含量测定

Simultaneous Determination of Troxerutin and Coumarin in Troxerutin Coumarin Tablets by HPLC

SHI Jie-ming, LIN Ling (Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of troxerutin and coumarin in Troxerutin coumarin tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Venusil C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1 mol/L NaH₂PO₄ solution (pH adjusted to 4.4 with phosphoric acid) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B (gradient elution) at the flow rate of 0.5 ml/min. The detection wavelength was 276 nm. RESULTS: The linear ranges were 1.00-200.98 μg/ml for troxerutin (*r*=0.999 9) and 1.05-42.19 μg/ml for coumarin (*r*=0.999 9). The average recoveries were 99.8% (RSD=0.6%, *n*=9) and 99.5% (RSD=0.8%, *n*=9). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and suitable for quality control of Troxerutin coumarin tablets.

KEY WORDS HPLC; Troxerutin; Coumarin; Tablets; Content determination

曲克芦丁(Troxerutin)是芦丁经羟乙基化的半合成产物,是以三羟乙基芦丁为主,同时含有其他羟乙基衍生物的多组分混合物^[1],临床上用于治疗静脉障碍、血栓症及脑血管疾病^[2]。香豆素(Coumarin)是由水杨醛经Perkin反应制得,具有抗凝血及抗血小板聚集的作用^[3]。曲克芦丁香豆素片常用于外伤、关节炎的解热、消肿。2010年版《中国药典》未收载曲克芦丁香豆素片质量标准,国外药典亦未见该品种的质量标准。我国《国家药品标准》^[4]收载了该品种的质量标准(简称国标方法),但是只测定了曲克芦丁的含量,未对香豆素的含量测定作出规定。笔者使用国标方法中的色谱系统进行试验,结果香豆素保留时间较短,在曲克芦丁主峰之前出峰,曲克芦丁中其他组分的色谱峰干扰了香豆素的测定。目前,曲克芦丁和香豆素各自的含量测定方法均主要为高效液相色谱(HPLC)法^[5-8],但同时测定曲克芦丁和香豆素的HPLC法尚未见报道。笔者在参考《欧洲药典》7.0版^[9]曲克芦丁原料标准“组分测定”色谱条件的基础上,建立了一种分离度好、准确度高的HPLC法,可同时测定曲克芦丁香豆素片中曲克芦丁和香豆素的含量,可用于其质量控制。

1 材料

2695型HPLC仪、2487型紫外检测器(美国Waters公司)。

曲克芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100416-201004,纯度:95.2%);香豆素对照品(北京恒元启天化工技术研究院,批号:MUST-10072601,纯度:98.4%);曲克芦丁原料药(批号:A091203,纯度:70%)、香豆素原料药(批号:20100716,纯度:98%)均由YB公司提供;市售2个厂家共3个批号曲克芦丁香豆素片(YB公司,批号:090901;XS公司,

批号:870301、870302-2;规格均为:每片含曲克芦丁90 mg、香豆素15 mg);乙腈为色谱纯,磷酸二氢钠为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A: 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节pH值至4.4),流动相B: 乙腈(梯度洗脱程序为: 0~25 min, 流动相B比例为20%; 25~28 min, 流动相B比例从20%变为35%; 28~38 min, 流动相B比例为35%; 38~39 min, 流动相B比例从35%变为20%; 39~49 min, 流动相B比例为20%),流速: 0.5 ml/min;检测波长: 276 nm;柱温: 35 °C;进样量: 20 μl。

2.2 系统适用性与方法专属性试验

在“2.1”色谱条件下,取“2.8”项下对照品和供试品溶液进行样分析。结果,香豆素在曲克芦丁的各组分之后出峰,曲克芦丁的主峰与相邻色谱峰以及曲克芦丁与香豆素峰之间的分离度均良好,并且曲克芦丁中的其他组分对香豆素的测定无干扰,色谱图详见图1A、B。

按处方配制空白辅料,照“2.8”项下供试品溶液的配制方法处理,测定的色谱图见图1C,表明辅料对含量测定无干扰。

分别称取曲克芦丁香豆素片样品(批号:870301)粉末适量(约相当于曲克芦丁10 mg),分别进行以下试验:(1)加入1 mol/L 盐酸溶液1 ml,放置30 min,加入1 mol/L 氢氧化钠溶液1 ml中和;(2)加入0.1 mol/L 氢氧化钠溶液1 ml,放置10 min,加入0.1 mol/L 盐酸溶液1 ml中和;(3)加入30%过氧化氢溶液1 ml,放置30 min;(4)沸水浴30 min,放冷;(5)紫外光(254 nm,光照强度0.5 mW/cm²)照射24 h。取上述各破坏样品溶液用“2.8”项下的稀释液稀释至10 ml,滤过,取续滤液分别进样20 μl。结果表明,样品粉末在0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中不稳定,放置10 min后被破坏的色谱图见图1D。降解产物与曲克

△ 基金项目:国家药品标准提高研究项目(No.546)

* 主管药师。研究方向:药品质量控制和标准化。电话:020-81342687。E-mail: sjmgz@126.com

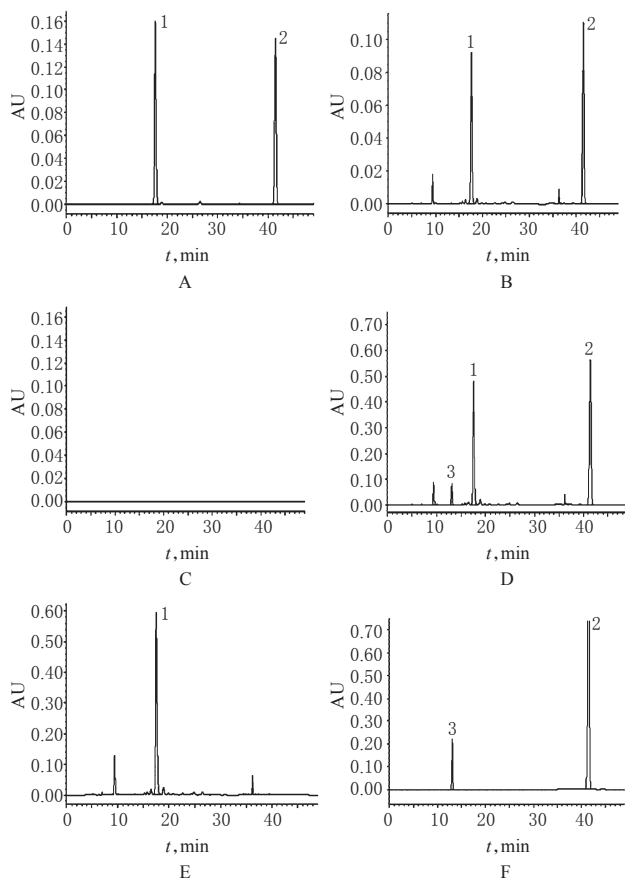


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.辅料;D.碱破坏后曲克芦丁香豆素片;E.碱破坏后曲克芦丁原料药;F.碱破坏后香豆素原料药;1.曲克芦丁;2.香豆素;3.降解产物

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. sample; C. excipient; D. troxerutin coumarin tablets destroyed by alkali; E. troxerutin destroyed by alkali; F. coumarin destroyed by alkali; 1. troxerutin; 2. coumarin; 3. degradation product

芦丁以及香豆素峰之间均分离良好,样品粉末在其他破坏条件下均未见降解产物(图略)。

分别取曲克芦丁原料药约10 mg在上述条件下破坏,结果均未产生降解产物,表明曲克芦丁性质较稳定,曲克芦丁碱破坏色谱图见图1E(其他图略)。

分别取香豆素原料药约10 mg在上述条件下破坏,结果在0.1 mol/L氢氧化钠溶液中放置10 min后破坏产生明显的降解产物峰,色谱图见图1F;而在其他破坏条件下均未产生降解产物(图略),表明图1D中的降解产物来自香豆素。

2.3 标准曲线绘制

精密称取曲克芦丁及香豆素对照品各适量,分别用“2.8”项下的稀释液溶解并制成各约1.0 mg/ml对照品贮备液。再分别精密量取对照品贮备液适量,用稀释液稀释成1.00、10.04、50.24、100.49、150.73、200.98 $\mu\text{g/ml}$ 曲克芦丁系列对照品溶液和1.05、5.27、10.54、21.09、42.19 $\mu\text{g/ml}$ 香豆素系列对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样分析。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标作线性回归,结果曲克芦丁和香豆素检测质量浓度线性范围分别为1.00~200.98、1.05~42.19 $\mu\text{g/ml}$,r均为0.999 9。

2.4 精密度试验

取“2.8”项下的对照品溶液连续进样6次,每次进样量20

μl ,结果,曲克芦丁峰面积RSD=0.2%(n=6),香豆素峰面积RSD=0.6%(n=6),表明方法精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.8”项下的供试品溶液室温放置8 h,每隔2 h进样20 μl ,记录峰面积。曲克芦丁和香豆素的含量测定结果与放置0 h相比基本不变,曲克芦丁峰面积RSD=0.3%(n=5),香豆素峰面积RSD=0.2%(n=5),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.6 回收率试验

取曲克芦丁与香豆素原料药各适量,加入处方比例的辅料,按“2.8”项下供试品溶液配制方法操作,在线性范围内配制高、中、低3个水平9份样品进行测定,两者的回收率结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

组分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
曲克芦丁	79.51	78.79	99.1	99.8	0.6
	78.93	78.37	99.3		
	78.70	79.15	100.6		
	98.82	98.45	99.6		
	97.49	97.13	99.6		
	98.26	97.92	99.7		
	122.03	122.21	100.1		
	118.97	119.93	100.8		
	118.25	117.56	99.4		
香豆素	13.13	12.93	98.5	99.5	0.8
	13.36	13.45	100.7		
	13.60	13.50	99.3		
	16.33	16.12	98.7		
	16.27	16.17	99.4		
	17.11	17.06	99.7		
	20.16	20.32	100.8		
	19.78	19.63	99.2		
	20.21	20.06	99.3		

2.7 重复性试验

取批号为090901的样品细粉分别配制6份供试品溶液,并测定含量。结果,曲克芦丁平均含量为每片79.4 mg,RSD=0.2%(n=6);香豆素平均含量为每片14.2 mg,RSD=0.8%(n=6)。

2.8 样品含量测定

取样品20片,精密称定,研细,取适量(约相当于曲克芦丁100 mg),精密称定,置于100 ml量瓶中,加稀释液[流动相A-B(80:20)]适量,超声使曲克芦丁和香豆素溶解,冷却至室温,加稀释液至刻度,摇匀,滤过;精密量取续滤液5 ml,置于50 ml量瓶中,用稀释液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;另取曲克芦丁和香豆素对照品各适量,精密称定,用稀释液溶解并定量稀释制成1 ml中约含曲克芦丁100 μg 和香豆素17 μg 的溶液,作为对照品溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液各20 μl ,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积分别计算曲克芦丁与香豆素的含量。另取样品按国标方法^[4][HPLC法,流动相为10%冰醋酸(用三乙胺调pH值至3.5)-乙腈(91:9),检测波长为254 nm],测定曲克芦丁的含量,并与本文方法的测定结果比较。结果表明,两种方法测定曲克芦丁的含量结果基本一致,详见表2。

3 讨论

对曲克芦丁和香豆素的对照品溶液分别进行紫外扫描,结果曲克芦丁在254、350 nm波长处有最大吸收,香豆素在276 nm波长处有最大吸收。按处方比例,二者相差6倍,为提高香豆素的检测灵敏度,采用香豆素的最大吸收波长276 nm

紫外分光光度计测定小儿速效感冒口服溶液中对乙酰氨基酚含量的4种定量分析方法比较

景霞*,徐进#,初立梅,李文静(南京医科大学附属南京儿童医院药学部,南京 210008)

中图分类号 R927.2;R971+.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1996-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.27

摘要 目的:比较紫外分光光度计测定小儿速效感冒口服溶液中对乙酰氨基酚含量的4种定量分析方法。方法:采用双波长法(测定波长257.2 nm、参比波长283.4 nm)、一阶导数法(271 nm)、单波长校正曲线法(257.2 nm)、吸光系数法(257.2 nm)对紫外扫描光谱数据进行定量分析,并进行4种方法的方法学考察。结果:4种方法中对乙酰氨基酚检测质量浓度线性范围均为2~10 μg/ml($r \geq 0.999\ 8$),平均回收率为99.30%~99.84%,批内RSD分别为0.13%、0.01%、0.27%、0.27%,批间RSD分别为0.18%、0.01%、0.37%、0.37%。结论:上述4种分析方法都可用于小儿速效感冒口服溶液中对乙酰氨基酚的含量测定,但双波长法和一阶导数法因操作更简便更适合医院制剂的测定。
关键词 小儿速效感冒口服溶液;对乙酰氨基酚;含量;紫外光谱扫描;双波长法;一阶导数法;单波长校正曲线法;吸光系数法

Comparison of Content Determination of Acetaminophen in Xiaer Suxiao Ganmao Oral Solution by 4 Quantitative Analysis Methods with UV Spectrophotometer
JING Xia, XU Jin, CHU Li-mei, LI Wen-jing (Dept. of Pharmacy, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare 4 quantitative analysis methods for the determination of acetaminophen content in Xiaer suxiao ganmao oral solution with UV spectrophotometer. METHODS: UV scanning spectrum was analyzed quantitatively by dual-wavelength spectrophotometry (detection wavelength of 257.2 nm, reference wavelength of 283.4 nm), first-derivative spectrophotometry (271 nm), single-wavelength calibration curve method (257.2 nm) and absorbancy index (257.2 nm). Methodology of 4 methods were all investigated. RESULTS: The linear range of acetaminophen were 2-10 μg/ml ($r \geq 0.999\ 8$) by 4 methods with average recoveries of 99.30%-99.84%; RSDs were 0.13%, 0.01%, 0.27% and 0.27% for within-run assays, and 0.18%, 0.01%, 0.37% and 0.37% for between-run assays. CONCLUSIONS: Above 4 methods can be used for the determination of acetaminophen in Xiaer suxiao ganmao oral solution, and dual-wavelength spectrophotometry and first-derivative spectrophotometry are simpler and more convenient for the determination of hospital preparation.
KEY WORDS Xiaer suxiao ganmao oral solution; Acetaminophen; Content; UV spectrum scanning; Dual-wavelength spectrophotometry; First-derivative spectrophotometry; Single-wavelength calibration curve method; Absorbancy index

表2 两种方法样品含量测定结果(mg/片)
Tab 2 Results of content determination of samples by 2 methods(mg/tablet)

样品批号	曲克芦丁		香豆素 (本文方法)
	本文方法	国标方法	
090901	79.4	78.6	14.2
870301	49.7	49.0	15.6
870302-2	46.5	45.2	13.5

作为检测波长。
本文参考《欧洲药典》7.0版曲克芦丁原料标准“组分测定”的色谱条件^[9],建立了HPLC法同时测定曲克芦丁香豆素片中曲克芦丁和香豆素的含量。结果表明,采用本文方法不仅曲克芦丁各组分得到有效分离,还排除了曲克芦丁各组分对香豆素测定的干扰,灵敏度高,专属性强,能更好地控制制剂质量。
现行国家标准仅测定样品中曲克芦丁的含量,并规定每片含曲克芦丁应不低于40.0 mg。作为处方明确的市售制剂,现行国家标准限度规定明显不够完善。从表2可知,2个厂家的曲克芦丁含量有较大差异,YB公司产品的曲克芦丁含量几

乎是XS公司的1.6倍。因此,为了保证药品的内在质量和临床疗效,该品种的质量标准需修订和提高。

参考文献

[1] 邓海星,晁若冰.HPLC检查曲克芦丁原料药中其它羟乙基芦丁衍生物[J].华西药学杂志,2001,16(4):251.
[2] 周昌奎,吴晓华.曲克芦丁临床研究新进展[J].中国生化药物杂志,2005,26(5):317.
[3] 张国铎,李航.香豆素类化合物的药理作用研究进展[J].中国药业,2011,20(17):1.
[4] 国家药品监督管理局.曲克芦丁香豆素片 WS-10001-(HD-1045)-2002[S].北京:人民卫生出版社,2002:111-113.
[5] 李军,徐本明,刘珂.曲克芦丁对照品的制备液相色谱法分离[J].中国医药工业杂志,2004,35(5):285.
[6] 翁水旺.注射用曲克芦丁中其它羟乙基芦丁衍生物的高效液相色谱法测定[J].分析试验室,2005,24(增刊):53.
[7] 陈捷,胡国昌.高效液相色谱法测定食品中的香豆素[J].色谱,1999,17(2):204.
[8] 董宇静,张玉英.高效液相色谱法测定黑香豆中香豆素的含量[J].中国民族民间医药,2010,6(12):54.
[9] Council of Europe. EP: Vol II [S].7.Oed.Strasbourg: ED-QM, 2011:3 155-3 156.

(收稿日期:2013-01-21 修回日期:2013-03-07)

* 主管药师。研究方向:医院制剂检验。电话:025-83117221。
E-mail:jing_xiaxia@163.com
通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:025-83117223。E-mail:xujin_cn@163.com