

HPLC法测定莲花清瘟胶囊中苦杏仁苷的含量^Δ

毕丹^{1*}, 陈育鹏¹, 王淑静², 王贵金², 赵倩¹, 魏峰^{1#}(1.北京以岭药业有限公司, 北京 102600; 2.石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-2978-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.31

摘要 目的:建立测定莲花清瘟胶囊中苦杏仁苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Kinetex XB-C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(6:94, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为207 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:苦杏仁苷检测质量浓度线性范围为43.16~215.80 μg/ml($r=0.9997$);检测限为0.4316 μg/ml、定量限为1.2948 μg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.69%;加样回收率为95.16%~100.49%(RSD=1.67%, $n=9$)。结论:该方法简便、快速、准确度高、重复性好,可用于测定莲花清瘟胶囊中苦杏仁苷的含量。

关键词 莲花清瘟胶囊;高效液相色谱法;苦杏仁苷

Content Determination of Amygdalin in the Lianhua Qingwen Capsule by HPLC

BI Dan¹, CHEN Yupeng¹, WANG Shujing², WANG Guijin², ZHAO Qian¹, WEI Feng¹(1.BeijingYiling Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102600, China; 2.Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang, 050035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of amygdalin in Lianhua qingwen capsule. METHODS: HPLC was performed on the column of Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.2% Phosphoric acid solution (6:94, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 207 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of amygdalin was 43.16-215.80 μg/ml ($r=0.9997$); the limit of detection was 0.4316 μg/ml, the limit of quantitation was 1.2948 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests no more than 0.69%; recovery was 95.16%-100.49% (RSD=1.67%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple and rapid with high accuracy and well reproducibility, and can be used for the content determination of amygdalin in Lianhua qingwen capsule.

KEYWORDS Lianhua qingwen capsule; HPLC; Amygdalin

莲花清瘟胶囊是由连翘、金银花、麻黄、苦杏仁等十几味中药材制成的中药复方制剂。该药有清热解毒、宣肺泄热的作用,用于治疗流行性感属热毒袭肺证^[1],其收载于2015年版《中国药典》(一部)。苦杏仁作为莲花清瘟胶囊的主要组成药材,具有降气止咳平喘、润肠通便的功效,其中苦杏仁苷是降气止咳平喘的药效成分^[2-3]。而以苦杏仁苷作为定量指标来控制莲花清瘟胶囊质量,目前尚未见报道。因此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定莲花清瘟胶囊中苦杏仁苷含量的方法,以期更好地控制该制剂质量和进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Dionex U-3000型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Thermo公司);AB135-S型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ250DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

莲花清瘟胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:A1404006、A1404007、A1404008,规格:0.35 g/粒);苦杏仁苷对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号:SLBF4693V,纯度≥99.9%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

^Δ 基金项目:北京市大兴区科技发展计划项目(No.15002)

* 博士。研究方向:中药新药开发及质量分析。电话:010-59705134

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药新药开发。E-mail:weifenghrb@sina.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Kinetex XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(6:94, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:207 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取苦杏仁苷对照品10.79 mg,置于10 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为1.079 mg/ml的对照品贮备液。精密吸取上述贮备液1.5 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品内容物适量,研细,取约1 g,精密称定,置于50 ml具塞锥形瓶中,加50%甲醇25 ml,回流提取1 h,滤过,滤渣加50%甲醇20 ml,洗涤1次,合并滤液和洗涤液置于100 ml蒸发皿中,蒸干,残渣置于10 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品处方比例和制备工艺制备不含苦杏仁的阴性样品,再按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法操作,即得。

2.3 系统适用性试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,苦杏仁苷峰与其他相邻色谱峰均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以苦杏仁苷峰计≥25 000;且阴性对照在与对照品相应的保留时间处(28.79 min)无色谱峰出现,表明处方中其他各味药材不干扰苦杏仁苷的测定。

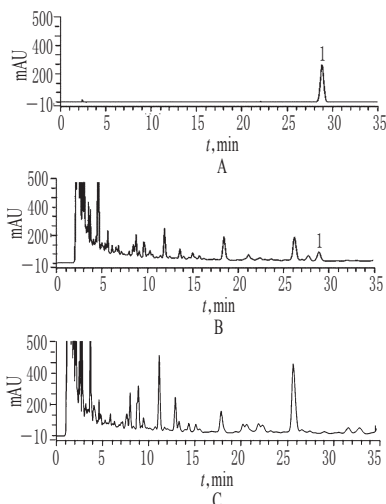


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 苦杏仁苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. amygdalin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、2.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 43.16、64.74、86.32、107.90、129.48、215.80 $\mu\text{g/ml}$ 的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各 10 μl , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以质量浓度(x , $\mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得苦杏仁苷的回归方程为 $y=0.1537x+0.1196$ ($r=0.9997$)。结果表明, 苦杏仁苷检测质量浓度线性范围为 43.16~215.80 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下苦杏仁苷对照品溶液适量, 等倍逐步稀释, 分别按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 3:1 时, 得检测限; 当信噪比为 10:1 时, 得定量限。结果, 苦杏仁苷的检测限为 0.4316 $\mu\text{g/ml}$ 、定量限为 1.2948 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μl , 按“2.1”项下色谱条件进样, 连续测定 6 次, 记录峰面积。结果, 苦杏仁苷峰面积的 $\text{RSD}=0.43\%$ ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:A1404006)适量, 分别于室温下放置 0、4、8、12、16、20、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 苦杏仁苷峰面积的 $\text{RSD}=0.69\%$ ($n=7$), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:A1404006)内容物适量, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果, 苦杏仁苷的平均含量为 1.58 mg/g , $\text{RSD}=0.55\%$ ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:A1404006)内容物约 0.5 g, 精密称定, 共 9 份, 置于 50 ml 具塞锥形瓶中, 分别加入 80%、100%、120% 的苦杏仁苷对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 每个浓度平行制备 3 份, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 1。

2.10 样品含量测定

取 3 批样品内容物各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按外标法计算苦杏仁苷的含量, 结果见表 2。

表1 加样回收率试验结果 ($n=9$)

Tab 1 Determination results of recovery test ($n=9$)

取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.5047	797.43	635.20	1410.06	96.45		
0.5028	794.42	635.20	1405.02	96.13		
0.5073	801.53	635.20	1405.98	95.16		
0.5019	793.00	794.00	1570.49	97.92		
0.5024	793.79	794.00	1555.51	95.93	97.15	1.67
0.5011	791.74	794.00	1558.93	96.62		
0.5008	791.26	952.80	1716.55	97.11		
0.5015	792.37	952.80	1731.65	98.58		
0.5006	790.95	952.80	1748.39	100.49		

表2 样品含量测定结果 ($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3$)

批号	苦杏仁苷含量, mg/粒	RSD, %
A1404006	0.54	
A1404007	0.56	2.07
A1404008	0.56	

3 讨论

3.1 提取方法的选择

由于苦杏仁苷易溶于甲醇、乙醇等溶剂^[9], 因此本试验考察提取溶剂时比较了甲醇、乙醇、50% 甲醇和 50% 乙醇对苦杏仁苷提取率的影响。结果表明, 50% 甲醇作为提取溶剂时, 苦杏仁苷的提取率最高。还比较了超声和加热回流两种提取方式, 结果表明回流提取的效果较好; 分别考察了 1 h 和 2 h 两种提取时间, 结果表明回流提取 1 h 苦杏仁苷就能够提取完全。因此, 本试验提取方法为 50% 甲醇回流提取 1 h。

3.2 色谱条件的选择

有关文献^[5-6]报道, 苦杏仁中苦杏仁苷(即 *D*-苦杏仁苷)在煎煮过程中会发生异构化, 产生 *L*-苦杏仁苷。本试验通过对连花清瘟胶囊进行分析, 发现 *L*-苦杏仁苷与苦杏仁苷相邻色谱峰的分子质量相同, 因此判断苦杏仁苷相邻色谱峰为 *L*-苦杏仁苷。由于相关文献^[7]报道苦杏仁苷与 *L*-苦杏仁苷在液相色谱中达到基线分离较困难, 故笔者根据文献考察了乙腈-0.2% 磷酸溶液和甲醇-0.2% 磷酸溶液两种流动相^[8-11]。结果, 以甲醇-0.2% 磷酸溶液作为流动相时苦杏仁苷的峰较宽, 与 *L*-苦杏仁苷色谱峰分离度较差; 而以乙腈-0.2% 磷酸溶液为流动相时苦杏仁苷峰形较好。经过反复多次试验, 通过比较不同的色谱柱以及调整流动相比, 结果发现采用 Phenomenex Kinetex XB-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-0.2% 磷酸溶液(6:94, *V/V*) 为流动相, 苦杏仁苷与 *L*-苦杏仁苷的分离效果最好, 能够达到基线分离。故最终选择上述色谱柱和流动相。

综上所述, 本方法简便、快速、准确度高、重复性好, 可用于测定连花清瘟胶囊中苦杏仁苷的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 945.
- [2] 张守平, 刘瑛丽, 曹洪锦. 苦杏仁 3 种提取工艺中苦杏仁苷提取率的比较[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(11): 656.
- [3] 张金艳, 何萍, 李貽奎. 苦杏仁、桔梗及二者配伍止咳、祛痰作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18):

HPLC法测定硫辛酸注射液中的有关物质

夏天水^{1*},熊全红²,罗云龙²(1.四川大学生物治疗国家重点实验室,成都 610041;2.成都倍特药业有限公司,成都 610041)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-2980-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.32

摘要 目的:建立测定硫辛酸注射液中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse Plus C₁₈,流动相A为0.005 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH至3.0~3.1)、流动相B为甲醇-乙腈(1:1, V/V)(梯度洗脱),流速为1.2 ml/min,检测波长为215 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:在所建立的色谱条件下,硫辛酸与各杂质及其降解产物分离良好;硫辛酸检测质量浓度线性范围为0.828~52.992 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性试验的RSD<3%;杂质A的加样回收率为98.45%~105.73%,RSD=2.41%($n=9$);其最大未知单个杂质的质量分数为0.152%~0.189%,总杂质的质量分数为0.487%~0.516%。结论:该方法简便、准确、专属性强、灵敏度高,可用于硫辛酸注射液中有关物质的测定。

关键词 硫辛酸注射液;高效液相色谱法;有关物质

Determination of Related Substances in Thioctic Acid Injection by HPLC

XIA Tianshui¹, XIONG Quanhong², LUO Yunlong²(1.State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;2.Chengdu Brilliant Pharmaceutical Co., Ltd, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Thioctic acid injection. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent Eclipse Plus C₁₈ with mobile phase A of 0.005 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted with phosphoric acid to pH 3.0 to 3.1) and B of methanol:acetonitrile (1:1, V/V) (gradient elution) at a flow rate of 1.2 ml/min; detection wavelength was 215 nm, column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: Under the established chromatographic conditions, thioctic acid with impurities and its degradation products were well separated; the linear range of thioctic acid was 0.828-52.992 μg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision and stability tests were lower than 3%; recovery of impurity A was 98.45%-105.73% (RSD=2.41%, $n=9$); the largest single impurity content in mass fraction was 0.152%-0.189%, the total impurity content in mass fraction was 0.487%-0.516%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, specific and sensitivity, and can be used to determine the related substances of the Thioctic acid injection.

KEYWORDS Thioctic acid injection; HPLC; Related substances

硫辛酸,亦称 α -硫辛酸,为类维生素类物质,具有很强的抗氧化活性。德国是最早在临床上使用硫辛酸治疗糖尿病神经病变的国家,且已有40余年历史。目前我国,很多硫辛酸产品已在临床上用于治疗糖尿病及相关并发症,如硫辛酸注射液(规格:12 ml:300 mg)作为处方药在临床上用于治疗糖尿病周围神经病变引起的感觉异常症状^[1-4]。

《欧洲药典》7.0版(EP7.0)和《美国药典》34版(USP34)中的硫辛酸原料、进口药品注册标准中的硫辛酸注射液

(JX20040271)均记载了硫辛酸有关物质检测方法,但上述方法的分离度均不够理想。本试验探索建立了以高效液相色谱法(HPLC)测定硫辛酸注射液中有关物质的方法,旨在为提升硫辛酸注射液的质量控制水平提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,含G1315D型检测器、G1329B型自动进样器、G1311C型泵(美国安捷伦公司);AE200型电子天平(瑞

- 173.
- [4] 厦其乐,王涛,陆胜民,等.苦杏仁苷的分析、提取纯化及药理作用研究进展[J].食品科学,2013,34(21):403.
- [5] 汤庆发,谢颖,陈飞龙,等.苦杏仁中苦杏仁苷的存在形式及其影响因素[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):107.
- [6] Joo WS, Jeong JS, Kim H, et al. Prevention of Epimerization and Quantitative Determination of Amygdalin in Armeniacae Semen with Schizandrae Fructus Solution[J]. Arch Pharm Res,2006,29(12):1 096.
- [7] Kang SH, Jing H, Kim N, et al. Micellar electrokinetic

- chromatography for the analysis of D-amygdalin and its epimer in apricot kernel[J]. J Chromatog A,2000,866(2):253.
- [8] 陈佩,翟宇,王曼泽.HPLC法测定小儿清热止咳口服液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和苦杏仁苷的含量[J].中国药房,2011,22(44):4 212.
- [9] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定麻杏口服液中苦杏仁苷的含量[J].解放军药学报,2013,29(1):57.
- [10] 尚严,李进,刘伟,等.HPLC测定苦杏仁不同炮制方法中苦杏仁苷的含量[J].中医学报,2011,26(7):831.
- [11] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定克咳胶囊中苦杏仁苷的含量[J].中国药师,2013,32(7):1 010.

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:028-85142721。
E-mail:tianshui.xia@btyy.com

(收稿日期:2015-07-30 修回日期:2016-05-16)
(编辑:刘 柳)