

高效液相色谱法测定心可宁胶囊中原儿茶醛含量

骆红梅¹ 童 红² 何 斌³

(1. 贵阳中医学院第二附属医院药剂科, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州省药品检验所, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州得轩堂制药有限公司, 贵州 贵阳 550008)

摘要:目的 建立高效液相色谱 (HPLC) 法以测定心可宁胶囊中原儿茶醛的含量。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (磷酸调节 pH 值至 3.0) - 甲醇 (80:20) 为流动相, 流速 1 mL/min, 检测波长 280 nm。结果 心可宁胶囊中原儿茶醛线性范围为 0.051 ~ 0.459 μg ($r = 0.999\ 85$), 平均回收率为 98.27%, RSD 为 0.85%。结论 HPLC 法简单, 操作方便, 重现性好, 阴性无干扰, 能有效地控制药品质量。

关键词: 心可宁胶囊; 原儿茶醛; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号 R284.1 R286.0

文献标识码 A

文章编号 1006-4931(2007)15-0032-02

心可宁胶囊为《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂 (第九册)》收载品种, 具有活血散瘀、开窍止痛之功效, 用于治疗冠心病、心绞痛及胸闷、心悸、眩晕等。原质量标准只有定性鉴别而无定量鉴别。由于处方中丹参为加水煎煮, 故可检测其水溶性成分。为了更好地控制产品质量, 笔者以制剂所含原儿茶醛为定量指标, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定其含量, 并进行了方法学考察, 现报道如下。

1 仪器与试剂

惠普 1100 型高效液相色谱仪 (美国), 包括四元泵、在线脱气机、DVD 二极管阵列检测器、柱温箱、20 μL 进样阀、HP 化学工作站等; CH-330 型超声波清洗机。原儿茶醛对照品 (中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号为 110810-200205); 甲醇 (色谱纯) 磷酸二氢钾 (分析纯) 磷酸 (分析纯) 水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (磷酸调节 pH 值至 3.0) - 甲醇 (80:20); 流速: 1 mL/min; 柱温: 35℃; 检测波长: 280 nm。

2.2 对照品溶液制备

精密称取原儿茶醛对照品 12.75 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 再精密吸取 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液制备

提取溶剂考察: 取心可宁胶囊内容物粉末 2 份, 每份 1.5 g, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 分别加入甲醇及乙醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 分别用甲醇和乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液注入液相色谱仪, 记录峰面积, 计算含量。结果显示用甲醇提取较完全。

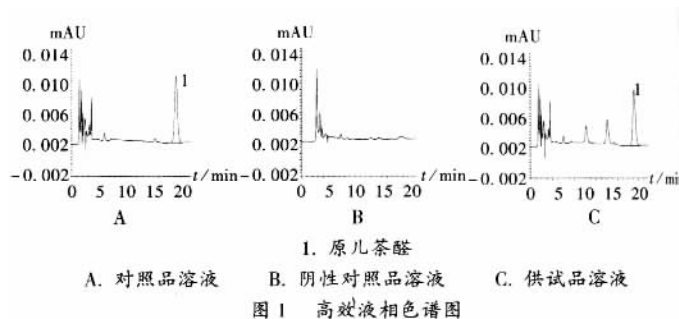
提取方式考察: 取心可宁胶囊内容物粉末 2 份, 每份 1.5 g, 一份加甲醇超声提取, 另一份加甲醇回流提取。精密吸取上述溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪中, 记录峰面积, 计算含量。结果显示两种方法无显著差异, 为节省时间, 采用超声提取。

提取时间考察: 取心可宁胶囊内容物粉末 3 份, 每份 1.5 g, 分别超声提取 15、30、60 min, 精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 计算含量。结果表明超声提取 30 min 即提取完全。

制备方法确定: 取装量差异项下内容物粉末 1.5 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 准确称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 称重, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

空白干扰试验: 取处方中除去丹参的其他药材, 按供试品制备工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取阴性对照品溶液、原儿茶醛对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入色谱仪。结果在与对照品色谱峰相应的位置上无吸收峰 (见图 1), 说明处方中其他成分及辅料对测定结果无影响。



线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 (0.025 5 mg/mL) 2、10、14、18 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以对照品溶液进样量 (μg) 为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得原儿茶醛的回归方程为 $Y = 3\ 599.1 X + 3.3$, $r = 0.999\ 85$ ($n = 5$)。结果表明原儿茶醛进样量在 0.051 ~ 0.459 μg 范围内与峰面积具有良好的线性。

精密度试验: 精密吸取对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪中, 连续进样测定 5 次, 记录峰面积。结果的 RSD 为 1.92%, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 将同一批供试品溶液分别于 0、2、6、8 h 吸取 10 μL, 注入液相色谱仪中测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.35%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

重现性试验: 取同一批样品 5 份, 每份约 1.5 g, 照供试品溶液方法制备, 分别吸取 10 μL 进样, 记录峰面积并计算含量。结果的 RSD 为 0.80%, 说明方法重现性良好。

加样回收试验: 取已知含量 0.358 9 mg/g 的样品 5 份, 每份 0.75 g, 精密称定, 于每份中加入原儿茶醛对照品溶液 (0.010 928 mg/mL) 25 mL, 照供试品溶液方法制备待测溶液, 取 10 μL 进样, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 原儿茶醛加样回收试验结果 ($n = 5$)

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.269 4	0.273 2	0.573 2	98.02		
0.269 5	0.273 2	0.540 6	99.23		
0.269 4	0.273 2	0.537 7	98.21	98.27	0.85
0.269 7	0.273 2	0.539 7	98.83		
0.269 8	0.273 2	0.534 9	97.04		

2.5 样品含量测定

标准曲线法测定硫酸庆大霉素片的抗生素效价

田光彩

(河南省濮阳市食品药品监督管理局, 河南 濮阳 457000)

摘要 :用标准曲线法测定硫酸庆大霉素片的抗生素效价,其浓度在 4.2 ~ 10.6 U/mL 范围内菌圈清晰,标准品菌圈直径与中心浓度菌圈的差与抗生素浓度对数线性关系良好 ($r = 0.998\ 64$) ,结果重现性好,效果满意。

关键词 :标准曲线法;抗生素效价;硫酸庆大霉素片

中图分类号 R927.1 R978.1+2 文献标识码 A 文章编号 1006-4931(2007)15-0033-02

硫酸庆大霉素片属氨基糖苷类药物,与氨基糖苷类其他抗生素比较,抗菌谱广,抗菌活性强。2005 年版《中国药典(二部)》规定用二剂量法或三剂量法^[1]测定其抗生素微生物效价。笔者用标准曲线法(又称一剂量法)^[2]测定其效价,取得了良好效果。

1 仪器、试剂与菌种

仪器:CAM-Ⅲ型抑菌圈自动测量仪(上海波浦电脑系统工程有限公司),H.S 电恒温水浴锅(上海医疗器械厂),隔水式 PYX-DHS-40X5 型电热恒温培养箱(国营创新医疗器械厂),L-160DTP 分析天平(日本岛津公司),XXQ-SG41.280 型手提式蒸汽灭菌器(上海华线医用核子仪器厂),测定抗生素效价用培养皿(直径 90 mm),牛津杯,陶瓦盖等。

试剂及菌种:磷酸二氢钾(分析纯),磷酸氢二钾(分析纯),硫酸庆大霉素片(规格 40 000 U,批号为 20050707,20060504,20060401,20060405,开封制药<集团>有限公司),抗生素检定培养基 I (pH 值为 7.8 ~ 8.0,中国药品生物制品检定所),短小芽孢杆菌[CMCC(B)3202,河南省药品检验所]。

2 方法与结果

2.1 缓冲液、菌悬液及双碟制备

取磷酸氢二钾 11.18 g 与磷酸二氢钾 0.82 g 加水使成 2 000 mL,滤过,在 115℃ 灭菌 30 min,即得磷酸盐缓冲液(pH = 7.8)。取短小芽孢杆菌[CMCC(B)3202]的营养琼脂斜面培养物,接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中,在 35 ~ 37℃ 培养 7 d,用革兰氏染色法涂片镜检,应有芽孢 85% 以上,用灭菌水将芽孢洗下,在 65℃ 加热 30 min,即得短小芽孢杆菌菌悬液。取直径约 90 mm,高 16 ~ 17 mm 的平底双碟,分别注入加热融化的抗生素检定培养基 I 20 mL,使在碟底内均匀摊布,放置水平台上使凝固,作为底层;另取抗生素检定培养基 I 适量加热融化后,放冷至 60℃,加入短小芽孢杆菌菌悬液适量(能得清晰的抑菌圈为度,使标准品溶液的中心浓度所致的抑菌圈直径为 15 ~ 17 mm)摇匀,在每一双碟中分别加入 5 mL,使在底层上均匀摊布,作为菌层。放置水平台上冷却后,在每一双碟中以等距离均匀放置牛津杯 6 个,用陶瓦圆盖覆盖,备用。

2.2 标准曲线制备

中心浓度选择:根据抗生素的对数浓度(剂量)与抑菌圈(反

应)关系的线性范围,选择中心浓度 $C_0 = 6.8\text{ U/mL}$ 。

标准溶液浓度确定:各剂量按等比级数稀释,剂距为 1:0.88,算出与中心剂量邻近的 2 个高低浓度, C_{0+1} 及 C_{0-1} ,再分别计算各剂量的浓度,各种浓度 C_k ($k_1 - k_8$) 分别为 4.2,4.8,5.5,6.4,7.2,8.2,9.3,10.6 U/mL。

硫酸庆大霉素标准溶液制备:精密称取硫酸庆大霉素标准品,用灭菌水制成 1 000 U/mL 的溶液,精密吸取 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加上灭菌磷酸盐缓冲液(pH = 7.8)稀释成 100 U/mL。再分别精密吸取 6.8,4.2,4.8,5.5,6.4,7.2,8.2,9.3,10.6 mL,置 100 mL

表 1 硫酸庆大霉素标准曲线试验数据									
标准品浓度 (U/mL)	中心浓度抑菌圈直径 (y_0)			$\bar{y}_0$	各剂量抑菌圈直径 (y_k)			F_k	
	1	2	3		1	2	3	$y_k - y_0$	
4.2	15.95	15.97	15.61		17.49	17.31	17.46		
	15.09	15.07	15.67	16.00	17.45	17.36	17.40	17.40 - 1.40	
	16.25	16.31	16.54		15.10	17.77	15.08		
4.8	15.45	16.20	16.13		15.15	17.62	17.77		
	15.40	16.11	16.03	16.04	15.47	17.80	17.53	15.07 - 0.97	
	16.22	16.48	16.34		15.70	15.34	15.22		
5.5	16.48	15.94	15.42		17.91	15.30	15.70		
	16.29	15.85	15.24	16.03	17.98	17.97	17.28	15.39 - 0.66	
	16.24	16.41	16.44		16.06	15.01	15.40		
6.4	15.88	16.16	15.88		15.80	15.38	15.43		
	15.82	16.09	15.82	16.02	15.00	15.43	15.46	15.76 - 0.26	
	15.79	16.14	16.62		16.60	16.13	15.85		
7.2	16.10	15.85	15.12		15.10	15.68	16.27		
	16.04	15.78	15.10	15.92	15.09	15.68	16.40	15.92 - 0	
	16.47	15.99	16.91		16.76	16.36	16.65		
8.2	16.23	16.07	16.79		17.02	16.95	16.32		
	16.15	16.00	16.68	16.04	16.95	16.36	16.65	16.51 - 0.47	
	15.64	16.25	15.58		16.17	16.40	15.00		
9.3	15.69	16.61	16.72		17.06	16.86	16.68		
	15.66	15.55	15.62	16.08	17.62	16.55	16.65	16.80 - 0.72	
	15.49	15.80	15.60		16.72	16.49	16.63		
10.6	16.36	16.72	15.00		17.05	17.15	17.97		
	15.87	15.57	16.12	16.04	17.23	17.39	16.61	17.21 - 1.17	
	15.95	15.94	16.01		17.11	17.34	16.09		

参考文献:

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖,等. 中药现代化研究与应用(第一卷)[M]. 北京:学苑出版社,1998:225.
- [2] 苗明三,李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:12.
- [3] 葛建华,龚旭东,窦志华,等. 高效液相色谱法测定丹参口服液中原儿茶醛的含量[J]. 时珍国医国药,2004,15(6):266.
- [4] 邵宪平,杨广德. HPLC 法测定乳块消片中原儿茶醛含量[J]. 西北药学杂志,2000,15(2):61.

(收稿日期 2006-11-16)