

高效液相色谱法测定苦味叶下珠胶囊中没食子酸的含量

李彩东^{1,2,3}, 吴斌², 张伟², 师彦平¹ (1. 中国科学院兰州化学物理研究所 甘肃省天然药物化学重点实验室, 兰州 730000; 2. 兰州市第二人民医院肝病研究所, 兰州 730046; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:目的 测定苦味叶下珠胶囊中没食子酸的含量。方法 反相高效液相色谱法。C₁₈色谱柱, 甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 270 nm。结果 没食子酸在 4.16~41.6 μg 内与峰面积呈线性关系, 平均回收率为 99.3%, RSD 为 0.82% (n=5)。结论 方法简便, 结果准确, 可用于苦味叶下珠胶囊的质量控制。

关键词: 苦味叶下珠胶囊; 没食子酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R931.6; R917.101

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2007)06-0487-02

Determination of Gallic Acid In Kuwei Yexiaozhu Capsules by HPLC

LI Cai-dong^{1,2,3}, WU Bing², ZHANG Wei², SHI Yan-ping¹ (1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Lanzhou 730000, China; 2. The Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730046, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a determination method of gallic acid in Kuwei Yexiaozhu capsules (KWXC). **METHODS**

HPLC, chromatographic column is C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase meth and 0.1% phosphoric acid and the detection wavelength 270 nm. **RESULTS** The linear range was between 4.16 ~ 41.6 μg for gallic Acid. The mean recovery was 99.3%, RSD = 0.82% (n=5). **CONCLUSION** The method is convenient, accurate and can be used for the quality control of KWXC.

KEY WORDS: Kuwei Yexiaozhu capsules; gallic acid; HPLC

苦味叶下珠胶囊 (KWXC) 是由苦味叶下珠提取而制成的纯中药制剂, 具有清热解毒, 扶正祛邪之功效, 临床上用于乙型和丙型肝炎的治疗。该制剂由苦味叶下珠组成, 其所含的没食子酸为该药的主要成分之一, 而已报道的没食子酸测定方法对杂质干扰耐受力不强, 重复性较差。没食子酸带有羟基和羧基, 极性较大, 所以笔者采用反相柱、梯度洗脱, 以测定没食子酸含量, 这样不但能将样品中的低极性杂质干扰除去, 而且保证了测样的连续性, 获得满意结果。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AVP 高效液相色谱仪 (包括 SPD-10AVP 二极管阵列检测器, LC-10AT 二元泵); FA2004N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); 没食子酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0831-9501); 苦味叶下珠胶囊 (兰州市第二人民医院制剂室提供); 甲醇 (色谱醇), 重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

ODS C₁₈ 分析柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 270 nm; 流动相: A 甲醇, B 0.1% 磷酸水溶液; 梯度洗脱条件:

0~15 min, A-B (10:90), 15~17 min, A-B (90:10), 17~35 min, A-B (10:90); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温室温; 进样量 20 μL。理论板数按没食子酸对照品计算大于 5000。

2.2 供试品溶液的制备

取本品 10 粒, 精密称定, 求得平均装量后, 混匀, 精密称取内容物适量 (约 300 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加入 30% 甲醇溶液约 25 mL, 称定重量, 加热回流 2 h, 放冷, 用 30% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取减压干燥至恒重的没食子酸对照品, 加 30% 甲醇制成 41.6 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

取不含苦味叶下珠的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照液各 20 μL, 分别注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 结果阴性对照在没食子酸相应的保留时间处无干扰, 色谱图见图 1。

2.5 线性关系的考察

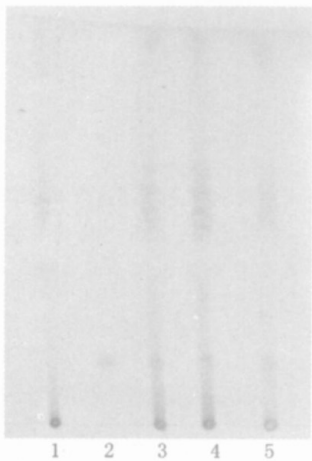


图 1 甘草鉴别薄层图谱

1. 甘草阴性; 2 甘草酸铵对照品; 3- 5 样品

Fig 1 TLC chromatogram of Radix Glycyrrhizae. Blank 2 Standard ammonium glycyrrhizate; 3- 5 Samples

乙酯-甲醇 (6: 4: 2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105℃ 烘至斑点清晰。供试品色谱中在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 而阴性样品在此位置上无此斑点。结果见图 2。



图 2 平地木鉴别薄层图谱

1. 平地木阴性; 2 岩白菜素对照品; 3- 5 样品

Fig 2 TLC chromatogram of Herba Ardisiae Japonicae

1. Blank; 2 Standard bergenia; 3- 5 Samples

2.2 芍药苷含量测定

2.2.1 色谱条件和选择 色谱柱: Zorbax ODS (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (25: 75); 柱温: 25℃; 流速: 1.5 mL · min⁻¹; 检测波长: 230 nm (芍药苷对照品在 230 nm 处有最大吸收)。理论塔板数按芍药苷峰计算应不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品溶于甲醇, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 配成 0.158 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。另精密称取样品约 0.15 g 至 10 mL 量瓶, 加水 1 mL 加热溶解, 加甲醇至刻度, 超声 10 min 滤过, 精密量取续滤液 5 mL 蒸干, 加流动相 5 mL 溶解,

离心 10 min (3000 r · min⁻¹), 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2.3 线性关系的考察 精密吸取芍药苷对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL, 按上述色谱条件测定, 以峰面积积分值为纵坐标, 芍药苷量为横坐标绘制标准曲线, 计算得回归方程: $Y = 905.571 - 36X - 2.691.75$ ($r = 0.9999$), 表明芍药苷在 0.316~1.580 μg 内具有良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验 精密吸取芍药苷对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 结果其 RSD 为 0.41%。结果表明此方法精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 将芍药苷对照品溶液在室温放置 0.1, 2.3, 4.5 h 分别测定峰面积, 结果其 RSD 为 0.98%。表明芍药苷在 5 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品精密称取约 0.15 g 按供试品溶液制备法处理, 进行 6 次平行试验, 测定芍药苷含量, 结果其 RSD 为 0.94%。表明此方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 (批号: 20060313-1, 含量为 0.517%) 5 份, 各约 0.1 g 精密加入芍药苷对照品, 按供试品溶液制备法处理、测定芍药苷含量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab 1 Data for recoveries of paeoniflorin

样品号	样品量 /g	含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均回收率 %	RSD %
1	0.0945	0.4886	0.60	1.0866	99.67		
2	0.0967	0.4999	0.60	1.0978	99.65		
3	0.0962	0.4973	0.60	1.0860	98.11	98.64	1.24
4	0.0974	0.5036	0.60	1.0977	99.01		
5	0.0978	0.5056	0.60	1.0861	96.75		

结果芍药苷平均回收率为 98.64%, RSD 为 1.24%, 表明此方法的加样回收率良好。

2.2.8 阴性样品试验 精密称取约 0.15 g 不含白芍的空白样品, 按照供试品溶液制备项下测定。结果表明阴性样品溶液色谱在芍药苷出峰处无干扰峰。

2.2.9 样品含量测定 分别取 10 批术芍颗粒, 按照供试品溶液制备项下制备, 分别精密吸取对照品和供试品溶液各 5 μL, 注入高效液相色谱仪, 依上述色谱条件进行测定, 以外标法计算样品芍药苷的含量, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Tab 2 Contents of paeoniflorin in samples

批号	含量 %
20060228-1	0.681
20060228-2	0.773
20060303-1	0.663
20060303-2	0.536
20060307-1	0.663
20060307-2	0.585
20060310-1	0.611
20060310-2	0.573
20060313-1	0.517
20060313-2	0.539