

3.4 含量的标准规定

脱氧核苷酸钠原料为 4 种脱氧核苷酸钠的混合物, 其中各成分中的钠含量各不相同, 平均一个分子中约含有 1~2 个钠原子。因此在拟定标准中应明确最终计算“均以二钠盐计”, 以便统一计算公式。这与文献[3]报导的思路是一致的。原标准含量测定的限度为“含脱氧核苷酸钠的总量不得少于 70.0%”, 此限度适用于供口服用原料, 而对于供注射用原料应制定更严格的含量限度。经考察上海丽珠制药有限公司产品的多批次含量测定数据, 将限度制定为“含脱氧核苷酸钠的总量不得少于 98.0%”。

3.5 小结

本文建立了 HPLC 测定脱氧核苷酸钠的含量

及有关物质方法, 此方法快速准确, 灵敏度高, 结果可靠。其含量测定方法与原有国家标准相比, 对脱氧核苷酸钠 4 个组分的分离度更好; 通过建立有关物质分析方法, 可以进一步提高产品质量标准, 对考察其产品的安全性、生产工艺的稳定性及控制其产品质量有重大意义。

REFERENCES

- [1] The Quality Standards of China. National Drug Standard of Chemical Drugs Up to National Standard. Vol 9(国家药品标准 化学药品地方标准上升国家标准. Vol 9) [S]. 2002: 30.
- [2] CHEN M F, HUANG H, KUANG P Y. HPLC determination of content of sodium deoxyribonucleotide and its preparation [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(1): 31-33.
- [3] CHENG S Y, HAO S L, YANG H X. Discussion on the content determination of sodium deoxyribonucleotide [J]. *Drug Stand China*(中国药品标准), 2008, 9(5): 368-369.

收稿日期: 2012-04-23

HPLC 测定龙血竭脂质纳米粒中龙血素 A 的含量

叶菲¹, 楼雪芳², 杜永忠^{3*} (1.浙江大学医学院, 杭州 310058; 2.浙江大学城市学院, 杭州 310015; 3.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要:目的 采用 HPLC 测定龙血竭脂质纳米粒中龙血素 A 的含量并计算其包封率。方法 采用 Diamonsil™ C₁₈(200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-1%冰醋酸水溶液(38:62)为流动相, 流速为 1.3 mL·min⁻¹, 检测波长为 260 nm, 柱温为 40 °C, 测定样品中龙血素 A 的含量并计算其包封率。结果 龙血素 A 于 0.135~5.4 μg·mL⁻¹ 内有良好线性关系, Y=33.694X+1.589 8(r=0.999 9)。低、中、高 3 个浓度的日内 RSD 分别为 2.70%, 2.36%, 1.48%; 日间 RSD 分别为 2.70%, 2.61%, 1.97%, 该方法的平均回收率为 99.2%, RSD 为 3.9%, 平均包封率为 89.59%。结论 本方法准确、简便、重复性好, 可用于龙血竭脂质纳米粒中龙血素 A 含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 龙血竭; 龙血素 A; 脂质纳米粒

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0069-04

Determination of Loureirin A in Solid Lipid Nanoparticles Encapsulating Resina Draconis by HPLC

YE Fei¹, LOU Xuefang², DU Yongzhong^{3*} (1. Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 3. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of loureirin A content in solid lipid nanoparticles(SLN) of Resina Draconis. **METHODS** A Diamonsil™ C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used for the determination of loureirin A with mobile phase of acetonitrile-1% acetic acid solution (38:62). The flow rate was 1.3 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 260 nm, and the column temperature was 40 °C. **RESULTS** The linear range of loureirin A was 0.135–5.4 μg·mL⁻¹, Y=33.694X+1.589 8(r=0.999 9). The RSDs of within-day were 2.70%, 2.36%, 1.48%, and the RSDs of between-day were 2.70%, 2.61%, 1.97% in the high-, middle-, and low-dose Resina Draconis loaded SLN. The average recovery was 99.2%(RSD 3.9%), and the average drug encapsulation efficiency was 89.59%. **CONCLUSION** The method is simple and reliable for the determination of loureirin A in Resina Draconis loaded SLN.

KEY WORDS: HPLC; Resina Draconis; loureirin A; solid lipid nanoparticle

作者简介: 叶菲, 女, 硕士生, 药师 Tel: (0571)88206049-818 E-mail: sophie8587@126.com

龙血竭是百合科植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的树脂经加工制成, 具有活血散淤、定痛止血和敛疮生肌的功能, 用于跌打损伤、淤血止痛、妇女气血凝滞、外伤出血和褥疮久不收口^[1]。龙血竭含有黄酮、挥发油、酚类、强心苷、多糖等成分, 其中龙血素 A 为龙血竭中主要化合物之一, 且常以 HPLC 测定龙血素 A 的含量作为其质量控制手段^[1-2]。龙血竭在水中溶解度小, 难以吸收, 生物利用度低。脂质纳米粒作为药物传递系统, 具有靶向性、细胞亲和性、缓释性、低毒性和稳定性的特点, 特别是针对难溶性药物, 制成脂质体可大大提高生物利用度^[3-5], 为此制备了龙血竭脂质纳米粒。本实验采用 HPLC 测定龙血竭脂质纳米粒内龙血素 A 的含量, 从而控制其质量, 更有效地保证其药效。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

FA1104 电子天平(上海天平仪器厂); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Beckman 64R 高速离心机(Beckman 公司)。

1.2 试剂

龙血竭(广西中医学院制药厂, 批号: 20100607); 龙血素 A 对照品(中国生物制品检定所, 批号: 111660-200402, 纯度: 100%); 冰醋酸(分析纯); 盐酸(分析纯); 硬脂酸(化学纯); 聚乙烯醇(PVA0486); 二次重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[4]

色谱柱: DiamonsilTMC₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-1%冰醋酸水溶液(38:62), 流速: 1.3 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C, 检测波长: 260 nm, 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称龙血素 A 对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解配制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的储备液, 置 4 °C 冰箱冷藏备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取龙血竭 25 mg, 硬脂酸 25 mg, 用 5 mL 乙醇溶解后, 室温下, 在磁力搅拌条件下缓慢注入 45 mL 0.1% PVA 水溶液中, 制得 1 mg·mL⁻¹ 龙血竭脂质纳米粒。取 1 mL 样品溶液, 加入 4 mL 甲醇, 超声溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤器过滤。续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 按“2.1”项下色谱条件, 将对照品溶液、供试品溶液、空白脂质纳米粒溶液分别进样, 结果龙血素 A 和相邻的杂峰达到了基线分离, 空白脂质纳米粒对龙血素 A 的测定无干扰。色谱图见图 1。

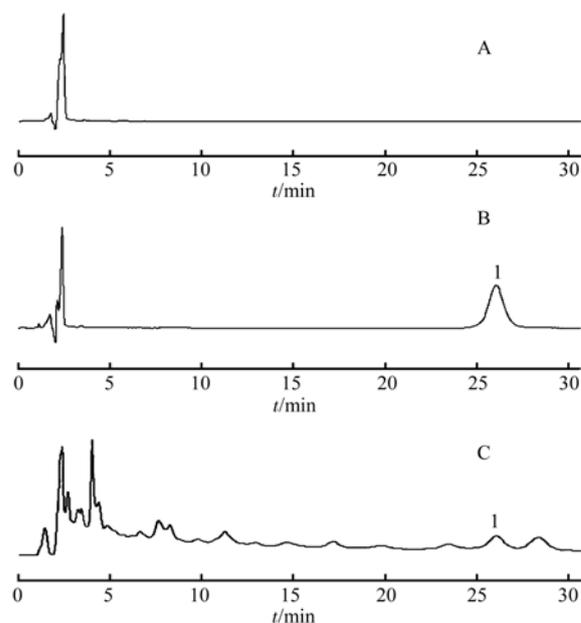


图 1 高相液相色谱图

A-空白脂质纳米粒溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-龙血素 A

Fig 1 HPLC chromatogram

A-blank SLN solution; B-control; C-sample; 1-loureirin A

2.3.2 线性关系 分别将配置的对照品溶液用甲醇稀释 50, 100, 200, 400, 800, 2 000 倍。取不同倍数稀释的对照品溶液各 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样, 并记录色谱图。结果浓度(X)与峰面积(Y)的回归方程为 $Y=33.694X+1.5898$, $r=0.9999$, 表明龙血素 A 在 0.135~5.4 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.3.3 回收率试验 取硬脂酸 50 mg, 用 5 mL 乙醇溶解后, 室温下, 在磁力搅拌条件下缓慢注入 45 mL 0.1% PVA 水溶液中, 制得 1 mg·mL⁻¹ 硬脂酸浓度的空白纳米粒。

取自制 1 mg·mL⁻¹ 空白纳米粒溶液, 分别精密加入一定量的低、中、高浓度的对照品溶液, 涡旋, 取 1 mL 所得到的样品加入到 4 mL 的甲醇中超声溶解, 微孔滤膜(0.22 μm)过滤, 取所得续滤液按“2.1”项下色谱条件下测定, 计算低、中、高浓度下的回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.54	0.53	98.15		
0.54	0.53	98.15		
0.54	0.54	100.00		
2.7	2.63	97.41		
2.7	2.66	98.52	98.35	0.77
2.7	2.65	98.15		
5.4	5.29	97.96		
5.4	5.35	99.07		
5.4	5.28	97.78		

2.3.4 精密性试验 按“2.2.2”项下方法制备浓度为 0.25, 1, 3 mg·mL⁻¹ 龙血竭脂质纳米粒供试品溶液各 3 份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以龙血素 A 的峰面积记, 计算日内、日间精密性。结果见表 2。结果表明, 低、中、高 3 个浓度的日内、日间 RSD 均<3%。

表 2 精密性试验结果(n=3)

Tab 2 Results of precision test(n=3)

	浓度/mg·mL ⁻¹	测得量/μg·mL ⁻¹	RSD/%
日内	0.25	0.36±0.01	2.70
	1	1.43±0.06	2.36
	3	4.30±0.15	1.48
日间	0.25	0.36±0.01	2.70
	1	1.42±0.08	2.61
	3	4.28±0.18	1.97

2.3.5 重复性试验 精密称取同 1 批样品 6 份, 各 20 mg, 按“2.2.2”项下的方法制成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, RSD 为 3.4%, 表明重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取 5.4 μg·mL⁻¹ 供试品溶液 20 μL, 分别于配制后 0, 24, 48 h 进样测定 (n=3), RSD=3.0%, 表明样品放置 48 h 内稳定。

2.3.7 龙血竭脂质纳米粒理化性质测定 取 10 mL 样品溶液, 加入 40 mL 甲醇, 超声溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。取过滤后的样品溶液 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件分析, 计算样品中龙血素 A 的总含量。

取 10 mL 样品溶液, 滴入适量的盐酸溶液调节样品 pH 值至 1.2, 4 °C 下 20 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。取过滤后的样品溶液 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件分析。

计算脂质纳米粒外龙血素 A 的含量。

测得龙血竭脂质纳米粒含龙血素 A 总量为 1.43 μg·mL⁻¹, 龙血竭脂质纳米粒溶液游离龙血素 A 0.15 μg·mL⁻¹, 平均包封率为 89.59%, RSD 为 0.77%(n=3)。

表 3 龙血竭脂质纳米粒包封率测定结果(n=3)

Tab 3 Results of the encapsulation efficiency test(n=3)

样品 编号	龙血素 A 总浓度/ μg·mL ⁻¹	包封率/ %	平均 包封率/%	RSD/ %
1	1.46	89.91		
2	1.41	88.72	89.59	0.77
3	1.43	90.15		

3 讨论

由于龙血竭所含龙血素 A 与龙血素 B 的结构非常接近, 很难将其分开, 本次试验参照文献考察了不同的流动相系统: 乙腈-1%冰醋酸水溶液(40:60)^[6], 1%冰乙酸-甲醇(34:66)^[7], 乙腈-1%冰醋酸水溶液(34:66)^[8], 乙腈-1%冰醋酸水溶液(37:63)^[9], 1%冰乙酸-甲醇(45:55)^[10]; 不同的流速: 1.0, 1.1, 1.2, 1.3 mL·min⁻¹; 不同的柱温: 20, 30, 40 °C。结果表明, 以乙腈-1%冰醋酸水溶液(38:62)流动相, 流速为 1.3 mL·min⁻¹, 柱温为 40 °C 时, 龙血素 A 的分离度、出峰时间、理论板数及峰形较好。

回收率实验中, 考察不同体积比例的样品溶液-提取溶液(甲醇)(1:1, 1:4, 1:9)对提取效果的影响, 结果显示样品溶液-甲醇为 1:1 时, 龙血素 A 提取不完全; 1:9 时, 龙血素 A 被稀释 10 倍, HPLC 测得其峰面积较小, 而比例为 1:4 时, 既能保证龙血素 A 提取完全, HPLC 测得样品浓度在标准曲线范围内, 因此确定提取时比例为样品溶液-甲醇(1:4)。

脂质纳米粒由于自身的双电层结构, 在体系中稳定, 不容易被离心成沉淀, 故测定脂质纳米粒内龙血素 A 含量时调 pH 至 1.2。此外本研究对离心转速和离心时间进行考察, 研究发现当转速在 20 000 r·min⁻¹, 离心时间在 20 min 时液体中的大部分粒子可被离心成固体沉淀, 因此确定离心条件为 20 000 r·min⁻¹, 20 min。

本研究所建立的高效液相色谱法用于测定龙血竭脂质纳米粒中龙血素 A 的含量, 该法灵敏, 具有较高的准确度与精密性, 可用于龙血竭脂质纳米粒的质量控制。

REFERENCES

- [1] WEN D X. Advances in studies on resin of *Dracaena cochinchinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 32(11): 1053-1054.
- [2] HU Y Q, CUI L G, et al. Determination of dihydrochalcone(loureirin A) in Dragon's blood capsules by HPLC [J]. Acta Acade Med CPAPF(武警医学院学报), 2001, 2(10): 96-97.
- [3] HU L D, TANG X, CUI F D. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(12): 1527-1535.
- [4] CUI F D. Pharmaceutics(药剂学) [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 421-426.
- [5] QU J J, FENG S H, LI K Y. Preparation and quality evaluation of artemisinin liposomes [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(3): 251-256.
- [6] SUN S L, MI H M, LOU Z Y. Determination of loureirin A and B in home-made Resina Draconis by RP-high-pressure liquid chromatography [J]. Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报), 2002, 23(12): 1366-1368.
- [7] TONG H J, YANG Z X, HONG Z G. Determination of loureirin A and containing percent in Dragon's blood capsules by HPLC [J]. J South Central Univ Nationalities(Nat Sci Ed)(中南民族大学学报 自然科学版), 2007, 6(1): 1-3.
- [8] HU Y Q, ZHANG Q Y, HU X G, et al. Determination of loureirin A and B extracted from Sanguis Draconis in two extract processed by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2002, 24(12): 962-964.
- [9] YUAN W J, GAO W F. Determination of loureirin A in Wudidan capsules by HPLC [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2010, 33(4): 12-14.
- [10] LI C E, LI G Y, SU Y Z. Determination of loureirin A in Gufukang capsule by HPLC [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2010, 5(12): 84-85.

收稿日期: 2012-04-05

HPLC-ELSD 测定复方益母草胶囊中盐酸水苏碱的含量

李存金¹, 郭飞宇²(1.江西省宜春市食品药品检验所, 江西 宜春 336000; 2.宜春职业技术学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 目的 建立复方益母草胶囊中盐酸水苏碱的 HPLC 含量测定方法。方法 高效液相色谱法, 采用 Agilent ZORBAX NH₂(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水(83 : 17), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 采用蒸发光散射检测器检测, 对数法计算含量。结果 盐酸水苏碱对照品线性范围为 5.32~15.96 μg, $r=0.999$; 平均回收率为 98.66%, RSD 为 1.9%($n=9$)。结论 本方法快速、简便、重复性好、专属性强且准确度高。

关键词: 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器; 复方益母草胶囊; 盐酸水苏碱; 含量

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0072-03

Studies on the Determination of Stachydrine Hydrochloride in Compound Motherwort Capsules by HPLC-ELSD

LI Cunjin¹, GUO Feiyu²(1.Jiangxi Provincial Yichun Institute for Drug Control, Yichun 336000, China; 2.Yichun Professional Technology Institute, Yichun 336000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to determine the content of Stachydrine hydrochloride in compound motherwort capsules. **METHODS** The Agilent ZORBAX NH₂ column was used. The mobile phase was acetonitrile and water (83 : 17). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detector was ELSD. Logarithmic method was used to calculate the content. **RESULTS** The linear range of reference substance of Stachydrine hydrochloride was 5.32~15.96 μg($r=0.999$); The average recovery rate was 98.66% and the relative standard deviation(RSD) was 1.9%($n=9$). **CONCLUSION** The quantitative method is rapid, simple, highly specific with good repeatability and accuracy.

KEY WORDS: HPLC; ELSD; compound motherwort capsules; stachydrine hydrochloride; content

复方益母草胶囊为妇科中成药, 不同于益母草胶囊, 其为复方制剂, 主要成分有益母草、熟地黄和当归。功能与主治为调经活血、祛瘀生新;

用于瘀血所致月经过多、过少及经期延长, 产后子宫复旧不全引起的恶露不绝。益母草中的生物碱具有显著的药理活性, 盐酸水苏碱是益母草中

作者简介: 李存金, 男, 主管药师 Tel: 13576162021 E-mail: licunjin@qq.com