

HPLC-ELSD测定补中益气丸(浓缩丸)中黄芪甲苷的含量

熊龙花,朱俊彦(江西省南昌市食品药品检验所,南昌 330009)

摘要:目的 建立 HPLC-ELSD法测定补中益气丸(浓缩丸)中黄芪甲苷的含量。方法 采用高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定,Alltech C₁₈ 色谱柱 5 μ m(4.6 \times 250mm),流动相为乙腈-水(37:63);流速:1.0mL/min;ELSD参数:漂移管温度 108 $^{\circ}$ C,氮气流速:2.5mL/min。结果 平均回收率为 99.3%,RSD=0.7%。结论 该方法对黄芪甲苷的测定良好。

关键词: HPLC-ELSD;补中益气丸(浓缩丸);黄芪甲苷

中图分类号:R284.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2006)09-0909-03

Determination of astragaloside IV in Buzhong Yiqi Wan (concentrated pills) by HPLC-ELSD

XIONG Long-hua, ZHU Jun-yan(Nan Chang Institute of Food and Drug Control, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method to determine the content of astragaloside IV in Buzhong Yiqi Wan (concentrated pills) by HPLC-ELSD. **METHODS** HPLC-ELSD was used to determine astragaloside IV in Buzhong Yiqi Wan (concentrated pills). The separation was performed on C₁₈ column with a mixture of acetonitrile-water (37:63) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The temperature of drift tube for measurement was 108 $^{\circ}$ C and the rate of N₂ was 2.5 mL/min as well. **RESULTS** The average recovery was 99.3%, and RSD was 0.7%. **CONCLUSION** The method is precise in determining astragaloside IV in Buzhong Yiqi Wan (concentrated pills).

KEY WORDS: HPLC-ELSD; Buzhong Yiqi Wan (concentrated pills); Astragaloside IV

补中益气丸(浓缩丸)由黄芪、党参、甘草、白术、当归、升麻、柴胡、陈皮等八味药材炼制而成,有补中益气、升阳举陷之功效。黄芪对正常机体的抗体生成功能有明显促进作用。现代药理研究表明黄芪具有免疫调节、抗炎降压、镇静、镇痛、保肝、护心、清除多种自由基等作用,其主要活性成分为黄芪甲苷、胡萝卜苷、异槲皮素等,故我们选用黄芪甲苷做样品中含量测定的指标成分。文献测定黄芪甲苷的方法主要有薄层扫描法、比色法,但在实际工作中发现,上述方法步骤较多,受实验条件的影响较大,重现性也较差,近有报道采用 HPLC-UV 测定黄芪甲苷,吸收波长为 203nm,利用紫外末端吸收,灵敏度低,一些微量强吸收杂质或溶剂(甲醇)会产生干扰,影响色谱峰的基线分离,因此采用 HPLC-ELSD对方中的黄芪甲苷进行测定,其提取方法及色谱条件根据《中国药典》2005年版一部中补中益气丸(水蜜丸)的黄芪甲苷含量测定方法,我们在此基础上加以改进,探索出一种灵敏度高,专属可靠的高效液相色谱法测定该制剂中黄芪甲苷的含量,经阴性对照试验,阴性对照溶液在黄芪甲苷的保留时间上无干扰,经过方法学研究,证明本法具有简便、准确、重现性好,专属性强等特点。对控制本制剂的内在质量有重要意义。

1 仪器、试剂、对照品与样品

高效液相色谱仪:岛津高效液相色谱仪(LC-10ADVP Pump),Alltech 500ELSD检测器,HGA-5000空气发生器;柱温箱:Agilent AI-130 温度控制箱;Easy3000 色谱工作站;

TG332-A半微量分析天平;甲醇为色谱纯,乙腈为色谱纯;水为重蒸馏水;其他试剂均为分析纯,黄芪甲苷对照品(购自中国药品生物制品检定所);补中益气丸(浓缩丸)(浓缩丸)批号:040802,040803,040804,040824,040825,040826,040827,040901,040902,040903(江西汇仁有限责任公司)

2 测定方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Alltech C₁₈柱 5 μ m(4.6 \times 250mm);流动相:乙腈-水(37:63);流速:1.0mL/min;柱温:室温;蒸发光散射检测器参数:漂移管温度为 108 $^{\circ}$ C;氮气流速:2.5mL/min;进样量:20 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

取黄芪甲苷对照品 10mg,精密称定,加甲醇制成每 1mL 含 0.5mg的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品适量,研碎,取 4g,精密称定,置索氏提取器中,加入甲醇适量,加热回流提取 7h,提取液回收甲醇至干,残渣加水 25mL,微热使溶解,用乙醚轻摇洗涤 2次,每次 20mL,水溶液再用水饱和的正丁醇振摇提取 6次,每次 20mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 3次,每次 40mL,正丁醇液回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解,转移至 10mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系的考察

作者简介:熊龙花(1962),女,江西南昌人,副主任药师,从事药品的检验、方法及质量控制的研究,电话:13177910468

取黄芪甲苷对照品 63.54mg,精密称定,加甲醇制成每 1mL 含 0.6354mg 的溶液,分别精密吸取对照品溶液 1mL、2mL、5mL、10mL、15mL、20mL 置 25mL 量瓶中,加甲醇稀释成不同浓度的对照品溶液。取不同浓度的标准溶液 20 μ L,于 2.1 项下色谱条件分别进样分析,测得的峰面积 (A) 对浓度 (C μ g/mL) 进行线性回归,以峰面积自然对数为纵坐标,浓度自然对数为横坐标,回归标准曲线方程为 $\lg A = 1.68870 \lg C + 1.51074$ $r = 0.9997$ 结果见表 1 和图 1。

表 1 线性范围试验结果 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Linear range of the astragaloside IV ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

浓度 (μ g/mL)	面积值			RSD (%)	lgA	lgC
	A1	A2	平均 A			
25.4	7784	7661	7723	1.13	3.8878	1.4048
50.8	23874	23293	23584	1.74	4.3726	1.7059
127.1	122194	120547	121371	0.96	5.0841	2.1041
254.2	382540	378993	380767	0.66	5.5807	2.4052
381.2	710658	718456	714557	0.77	5.8540	2.5812
508.3	1200287	1214497	1207389	0.83	6.0818	2.7061

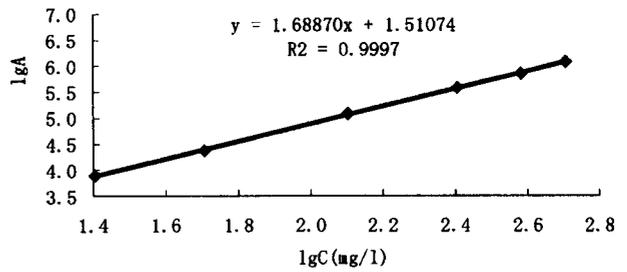


图 1 黄芪甲苷标准曲线

Fig 1 The standard curve of astragaloside IV

因此试验结果表明黄芪甲苷浓度在 25.4 ~ 508.3 μ g/mL 范围内与色谱峰面积呈良好线性关系。

2.5 阴性对照溶液和供试品溶液液相色谱分离情况

除蜜炙黄芪外,其余各味药按处方量的十分之一投料制成的阴性浓缩丸,用 2.3 项下供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液 20 μ L,分别注入色谱仪,按其色谱条件测定,比较供试品溶液色谱和黄芪甲苷对照品溶液色谱及阴性对照溶液色谱。实验结果表明:阴性对照溶液中其他成分对黄芪甲苷的测定无干扰。结果见图 2、3、4。

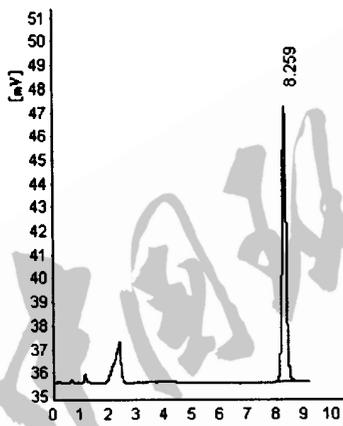


图 2 对照品

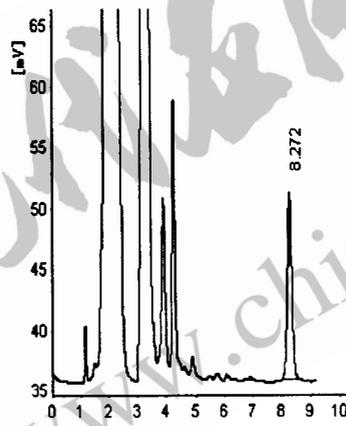


图 3 供试品

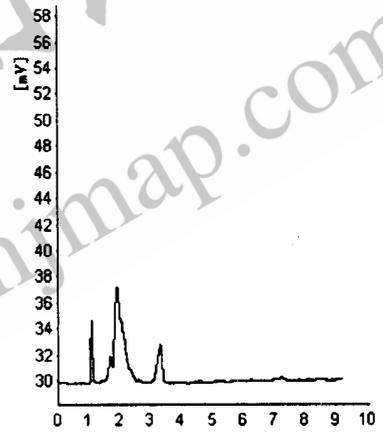


图 4 阴性对照

2.6 稳定性试验

取本品 (批号 040802) 4g,按 2.3 项下供试品制备方法制备供试品溶液,按其液相色谱条件,每隔 1h 进样 1 次,4h 后第 8 小时进样一次,第 12 小时进样一次,考察精密度 (RSD = 1.56%, $n = 6$),结果供试品溶液中黄芪甲苷在 12h 内峰面积无明显变化,结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果

Tab 2 Stability test

时间 (h)	峰面积值	平均峰面积值	RSD (%)
0	132530		
1	128399		
2	128782		
3	129636	129688.3	1.56
4	127181		
8	131602		
12	129561		

2.7 精密度试验

取样品 (批号 040802) 4g,精密称定,按 2.3 项下的供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按其液相色谱条件,重复进样 6 次,同一进样量 (20 μ L),测定峰面积值,测得黄芪甲苷色谱峰面积的 RSD = 1.28%,说明进样精密度良好。结果见表 3。

表 3 精密度试验结果

Tab 3 Precision test

次数	峰面积	平均值	RSD (%)
1	132530		
2	132345		
3	129263	131951.8	1.28
4	134444		
5	131777		
6	131352		

本实验表明精密性好。

2.8 重现性试验

取本品(批号 040802) 4g,精密称取不同量的供试品 6

表 4 重复性试验结果

Tab 4 Repeatability test

取样量 (g)	面积值 (A)			lgA 含量	lgC 含量	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
	A1	A2	平均值				
4.0378	110997	111664	111320.5	5.0466	2.1031	0.314	
4.0310	111393	110815	111104	5.0457	2.1025	0.314	
4.1569	118529	115645	117087	5.0685	2.1169	0.315	0.3
4.0665	113577	113909	113743	5.0559	2.1090	0.316	
4.0751	114528	112731	113629.5	5.0555	2.1087	0.315	
4.1287	115658	115411	115534.5	5.0627	2.1133	0.314	

2.9 回收率试验

取同一批已知含量的样品(批号 040802)适量 6份,分别准确加入已知量的黄芪甲苷对照品溶液,按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按其项下色谱条件进行测定,计算回收率,(见表 5),6 次测定回收率,平均值为 99.3%, RSD = 0.7%,结果见表 5。

$$\text{回收率} = \frac{\text{测出黄芪甲苷的量} - \text{样品中黄芪甲苷的含量}}{\text{加入黄芪甲苷的量}} \times 100\%$$

表 5 加样回收率结果

Tab 5 The rRecovery test of astragaloside IV

取样量 (g)	取样相当于 黄芪甲苷 的量 (mg)	添加黄芪 甲苷的量 (mg)	实测黄芪 甲苷量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
2.1106	0.6648	0.6383	1.3021	99.8		
1.9020	0.5991	0.6383	1.2324	99.2		
1.9209	0.6051	0.6383	1.2358	98.7	99.3	0.7
2.0965	0.6604	0.6383	1.2953	99.5		
2.0080	0.6325	0.6383	1.2725	100.3		
2.1962	0.6918	0.6383	1.3200	98.5		

本试验结果表明该供试品溶液的制备方法合理。

2.10 样品测定

取供试品十批,按 2.3 项下方法制备供试品溶液和对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液 5, 10, 15, 20 μ L 与供试品溶液 20 μ L,注入液相色谱仪,测定,用标准曲线对数方程计算,即得。结果见表 6。

3 讨论

本次含量测定实验我们首先以《中国药典》2005 年版一部中补中益气丸含量测定方法为基础,进行方法学研究,通过试验确认该方法简便、重现性好、准确度高、基线分离可达到药典要求,阴性样品无干扰,故在本实验中采用。蒸发光散射检测法是基于不挥发样品分子对光的散射程度与其质量成正比,与其所含基团性质无关,只要选择适当的检测器

份,分别依 2.3 项下供试品溶液制备方法制备成供试品溶液,依其项下液相色谱条件平行测定 6 份含量,结果 RSD = 0.3%,说明该方法重复性好。结果见表 4。

表 6 十批样品测定结果

Tab 6 Determination results of ten samples

批号	黄芪甲 苷含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	批号	黄芪甲 苷含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)
040803	0.330		040802	0.314	
	0.328	0.329		0.315	0.315
040804	0.292		040827	0.358	
	0.290	0.291		0.364	0.361
040824	0.264		040901	0.314	
	0.272	0.268		0.306	0.310
040825	0.323		040902	0.362	
	0.319	0.321		0.358	0.360
040826	0.338		040903	0.325	
	0.341	0.340		0.321	0.323

参数,便可使流动相和溶剂完全气化,不产生信号,而样品中的各组分以不挥发粒子存在,对光有散射,被检测。检测器参数选择主要有雾化气体流速和漂移管温度。设定原则是力求得到高信噪比的结果,以检测器使用手册推荐值为起点,逐渐改变漂移管温度或气体流速,观察流动相进入检测器时的基线噪音,结果发现:温度 108 $^{\circ}$ C,气流 2.5SLPM 条件下噪音最小,进样分析此时信号最强,故确定该条件为测定条件。

参考文献

- [1] 中国药典 2005 年版一部。
- [2] 国家中成药标准汇编·中成药地方标准上升国家标准部分。
- [3] 卫生部药品标准中药成方制剂·第七册·第 83 页。
- [4] 黄芪药理研究和临床应用,时珍国药研究,1998,9(3):230。
- [5] 黄芪及有效成分的研究概况,现代中西医结合杂志,2003,12(10):1112-1114。

收稿日期:2005-12-12