

HPLC 测定排氡片中黄芪甲苷的含量

李磊¹, 李志军², 周玉新², 杜树山^{1*}, 李宝林¹, 高云¹

(1. 北京师范大学资源学院教育部资源药物工程研究中心, 北京 100088;

2. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004)

[摘要] 目的: 建立排氡片中黄芪甲苷的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(32:68), 漂移管温度 50℃, 载气压力 2.0 bar, 蒸发光散射检测器, 流速: 1.0 mL·min⁻¹。结果: 黄芪甲苷在 0.41~2.45 μg 范围内呈现良好的线性关系($r=0.9999$), 加样回收率 100.04%, RSD 为 0.13%。结论: 该方法快速、简便、准确、重复性较好, 结果可靠, 可用于控制排氡片中黄芪甲苷的含量。

[关键词] 排氡片; 黄芪甲苷; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0037-03

Determination of Astragaloside in Paichuan Tablets by HPLC

LI Lei¹, LI Zhi-jun², ZHOU Yu-xin², DU Shu-shan^{1*}, LI Bao-lin¹, GAO Yun¹

(1. College of Resources Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100088, China;

2. Institute of Chinese traditional medicine of Henan University, Kaifeng 475004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an accurate method for the determination of astragaloside in Paichuan

[收稿日期] 2009-10-15

[基金项目] 全军十一五重点课题, (200603004)

[通讯作者] * 杜树山, Tel: (010) 62208032; E-mail: dushushan@ires.cn

测定结果也均符合药典标准。由此可见, 1 262 cm⁻¹ 峰位的选定、峰高 0.005 阈值的设定, 已基本达到丹酚酸 B 含量不合格药材初步筛查的目的。

3 结论

红外光谱技术是一种全成分信息的分析手段, 通过原谱与二阶导数谱的峰形、特征峰位和吸收峰值等信息反映不同产地的药材。不同产地的丹参药材存在与丹酚酸 B 对应的, 但数目不同的特征峰位, 能够基本反映丹参药材的产地特性。在初步判定丹参药材产地基础上, 找到丹参药材中共同存在的丹酚酸 B 特征峰位, 选定其中最高峰 1 262 cm⁻¹ 峰, 将其峰高值与液相色谱定量分析结果进行相关分析研究, 确定 0.005 为阈值, 可实现丹参药材中丹酚酸 B 的快速半定量分析。本研究为丹参药材投料前快速质量评价提供了一种新的备选方法。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 52.
- [2] 叶显纯. 中药学(上册)[M]. 上海: 中医学院出版社, 1999: 379.
- [3] 韩明霞, 周群, 李全宏, 等. 不同产地葛根红外光谱的三级鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2009(7): 1851.
- [4] 武彦文, 肖小河, 孙素琴, 等. 黄连不同提取物的红外光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009(1): 93.
- [5] 陈惠清. 红外指纹图谱鉴别丹参的研究[J]. 中国中药杂志, 2006(8): 1285.
- [6] 关昕璐, 阎玉凝, 任子和, 等. 翼首草溶剂提取物的红外光谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006(6): 10.
- [7] 储德韧, 周群, 郁露. 红外光谱阵列相关系数法在丹参鉴别中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2007(9): 1706.

Tablets. **Method:** Diamonsil C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm), with a mobile phase consisting of acetonitrile-H₂O (32:68), the detector is Evaporative Light-scattering Detector, The drift tube temperature of 50 °C, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** A good linearity of astragaloside was obtained within the range of 0.41 ~2.45 μg, the average recovery was 100.04% and RSD was 0.14%. **Conclusion:** The method was simple and accurate, and can be used for the quality control of Paichuan Tablets.

[Key words] Paichuan Tablets; astragaloside; HPLC; determination

排氡片由黄芪、茯苓、猪苓、泽泻、白术、桂枝、桔梗等药味组成,具有调节免疫,排除体内放射性毒素的作用,用于预防放射性元素对人的损害效果较好。为了更好的控制排氡片的质量,本文采用高效液相色谱法对本处方中君药黄芪中有效成分黄芪甲苷进行含量测定。

1 材料

LC-2010 型高效液相色谱仪(大连申江科技),蒸发光散色检测器(迪马公司),LC-2010 色谱工作站(浙江大学)。乙腈(色谱纯, Fisher, 070421)水为超纯水,正丁醇,甲醇,氨水均为析纯,系北京化工厂生产。样品排氡片批号 20070802, 20070810, 20070815, 规格每片重 0.5 g, 第二炮兵总医院药剂科)。对照品黄芪甲苷(供含量测定,批号 0781-200109, 中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (5 μm, 4.6 mm ×250 mm); 柱温 30 °C; 流动相乙腈-水(32:68), 流速 1.0 mL·min⁻¹。ELSD 漂移管温度 50 °C, 载气压力 2.0 bar。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品去除薄膜衣后的细粉约 3.5 g, 精密称定, 置 250 mL 的具塞锥形瓶中, 分别加甲醇 100 mL, 氨水 1 mL, 超声 30 min, 放冷, 滤过, 用甲醇 30 mL 洗涤残渣, 合并甲醇液, 减压浓缩回收至干, 加水 50 mL 溶解, 用水饱和正丁醇萃取 3 次(40, 30, 30mL) 合并正丁醇层, 用氨水洗涤 3 次(40, 30, 30mL) 弃去氨液, 合并正丁醇层减压浓缩至干, 甲醇定容至 10 mL, 即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取黄芪甲苷对照品 2.04 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈溶解并定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.3 阴性对照液的制备 按成品制剂方法制得黄芪阴性样品制剂, 按供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

比较供试品溶液、黄芪甲苷对照品溶液、阴性对照的色谱图, 结果样品中黄芪甲苷峰与其他色谱峰能达到基线分离, 阴性对照液中色谱峰无干扰, 见下图 1。

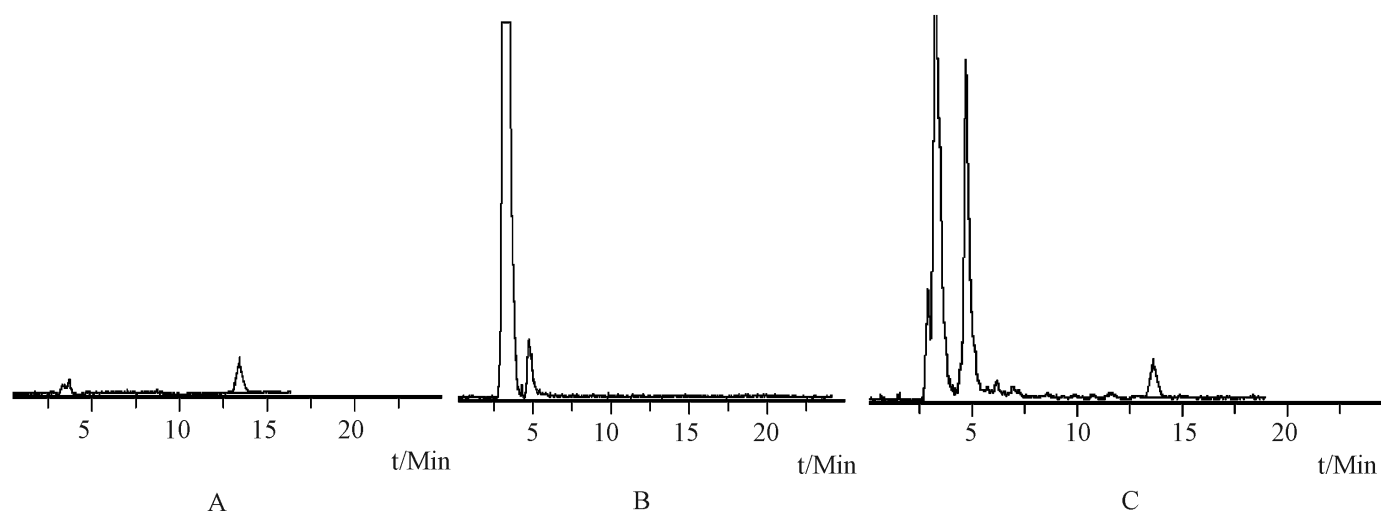


图 1 排氡片 HPLC 中黄芪甲苷色谱图

A. 黄芪甲苷对照品 B. 阴性对照 C. 供试品溶液

2.3 线性关系的考察 精密称取在五氧化二磷干燥器中干燥至恒重的黄芪甲苷 2.04 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈溶解并定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得(黄芪甲苷 0.0816 mg·mL⁻¹)。分别精密吸取

上述对照品溶液 5, 8, 10, 13, 15, 20, 30 μL 注入液相色谱仪, 测定。以峰面积 Log 值为纵坐标(Y), 进样量 Log(μg) 为横坐标(X) 做回归计算, 回归方程为: $Y = 4.79 \times 10^{-1} X + 4.7993$, ($r=0.9999$, $n=7$), 结果

表明, 黄芪甲苷在 0.41 ~2.45 μg 范围内, 呈现良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取浓度为 0.0816 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芪甲苷对照品溶液 10 μL , 连续测定 6 次, 记录峰面积, 计算得 RSD 为 0.35%。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 20070810), 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 为 0.35%。试验结果表明, 在制备后 12 h 内供试品溶液稳定。

2.6 重复性试验 取 6 份样品(批号 20070810), 平行操作, 依法测定, 测定黄芪甲苷的含量, 平均含量为 0.282 $\text{mg}/\text{片}$, RSD 为 0.18%。

2.7 加样回收率试验 取本品已知准确含量的样品(批号 20070810) 1.75 g, 精密称定 6 份, 分别置 250 mL 锥形瓶中, 加入黄芪甲苷对照品溶液(0.204 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 2 mL, 按供试品溶液的制备方法制得供试品溶液, 依法测定, 计算回收率, 测定结果见表 1。

表 1 回收率试验 ($n=6$)

No.	称样量 /g	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	羧 /%	RSD /%
1	1.763 2	0.416 2	0.408	0.823 8	99.90		
2	1.756 6	0.414 6	0.408	0.822 5	99.98		
3	1.758 4	0.415 0	0.408	0.822 9	99.98		
4	1.760 3	0.415 5	0.408	0.824 6	100.27	100.04	0.13
5	1.757 2	0.414 8	0.408	0.822 7	99.98		
6	1.761 2	0.415 7	0.408	0.824 2	100.12		

试验结果表明, 黄芪甲苷的加样回收率在 95% ~105% 范围内, RSD 为 0.13%, 加样回收良好。

2.8 检测限试验 将黄芪甲苷对照品溶液进行稀释, 在信噪比为 3:1 时, 确定其最低检测限, 其最低检测限为 0.041 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.9 样品测定 称取 3 批样品, 按供试品溶液制备方法溶解, 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 按照外标法计算测定 3 批排氚片中黄芪甲苷的含量, 测定结果分别为 0.283, 0.282, 0.284 $\text{mg}/\text{片}$, 见表 2。

试验结果表明, 3 批样品中黄芪甲苷测定平均值为 0.283 $\text{mg}/\text{片}$, 根据限度要求, 确定每片含黄芪以黄芪甲苷计不少于 0.226 mg 。

表 2 3 批排氚片中黄芪甲苷含量测定 ($n=3$) $\text{mg}/\text{片}$

No.	1	2	3	X
20070802	0.283	0.283	0.283	0.283
20070810	0.281	0.282	0.282	0.282
20070815	0.284	0.284	0.285	0.284

3 讨论

在供试品溶液制备提取中, 对超声提取时间分别考察 20, 30, 40, 50, 60 min, 试验结果表明样品用甲醇为溶剂, 提取时间为 30 min, 提取效果较好。

参考文献中有关黄芪甲苷的含量测定方法有薄层扫描法^[1-2], 紫外检测 HPLC 法^[3]。黄芪甲苷成分为紫外检测末端吸收部分, 误差大, 因此选用 2005 年药典一部^[4]对黄芪药材的含量测定方法, 采用蒸发光散射检测器对本方中黄芪进行含量测定。

流动相分别, 选用乙腈-水(40:60); 乙腈-水(35:65); 乙腈-水(32:68); 当选用乙腈-水(32:68) 时保留时间合适, 峰形较好, 达到与基线分离。且阴性对照无干扰, 故选用乙腈-水(32:68)。

通过本实验表明, 采用高效液相-蒸发光散射检测器法测定黄芪中黄芪甲苷的含量, 简便, 准确, 可靠, 重复性好, 本方法适用于本品中黄芪甲苷的含量测定。

[参考文献]

[1] 梁瑞雪, 张新军, 贾元印, 等. 薄层扫描法测定尘肺颗粒中黄芪甲苷含量[J]. 时针国医国药, 2006, 17(9): 1689.

[2] 辛艳茹, 刘丽宏, 马萍, 等. TLC 法测定排氚片中黄芪甲苷的含量[J]. 解放军药学报, 2008, 24(3): 258.

[3] 阎汝南, 王静竹, 刘舒平, 等. HPLC 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(7): 398.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 212.