

高效液相色谱法测定骨炎灵丸中黄芪甲苷的含量

陈英红^{*}, 黄恩喜, 高 阳, 姜瑞芝
(吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)测定骨炎灵丸中黄芪甲苷的含量的方法。方法: 采用 ODS 色谱柱(C_{18} 5 μ m, 150mm \times 4.6mm, Shimadzu), 以乙腈-水(32: 68)为流动相, 流速为 0.8mL \cdot min⁻¹。ELSD 参数: 漂移管温度为 98.5 $^{\circ}$ C, 载气流速为 2.7L \cdot min⁻¹。结果: 黄芪甲苷的线性范围为 1.416~ 9.44 μ g($r = 0.9996$), 平均回收率($n = 5$)为 97.79% (RSD= 2.37%)。结论: 本方法准确、可靠、重现性好。

[关键词] 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法; 骨炎灵; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)06-0014-02

骨炎灵丸由当归、川芎、黄芪、骨碎补、延胡索等多味中药制成的复方制剂, 具有补气益血, 清热解毒, 消肿止痛之功效。用于骨髓炎, 开放骨折感染及虚入痛疡。黄芪是方中君药, 黄芪甲苷是其主要有效成分。本试验采用 HPLC-ELSD 法对其中黄芪甲苷的含量进行了测定。

1 仪器与试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱仪, Alltech 蒸发光散射检测器; 对照品黄芪甲苷(0781-200311)由中国药品生物制品检定所提供; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水; 三批样品由吉林中研药业提供(批号 050101, 050102, 050103)。阴性对照样品(按处方药味除去被测药材, 其余药味按成药的生产工艺制备的模拟样品)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Shimadzu ODS 柱(C_{18} 5 μ m, 150mm \times 4.6mm, Shimadzu, 岛津); 流动相: 乙腈-水(32: 68); 流速: 0.8 mL \cdot min⁻¹。ELSD 参数: 漂移管温度为 98.5 $^{\circ}$ C, 载气流速为 2.7 L \cdot min⁻¹。

2.2 流动相和 ELSD 参数的选择 曾比较了不同溶剂系统和比例的流动相^[1], 结果以乙腈-水(32: 68)作为流动相分离效果最好。并分别在不同漂移管温度和载气流速下进样, 依照组分峰面积和精密度来选定 ELSD 参数。结果表明, 当漂移管温度为 98.5 $^{\circ}$ C, 载气流速为 2.7 L \cdot min⁻¹时, 组分分离效果最好。其色谱图见图 1, 2, 3。

2.3 线性关系的考察 精密称取黄芪甲苷对照品 11.8mg, 置于 25mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容, 配成 0.472mg \cdot mL⁻¹的对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 1.5 3.0 4.5 6.0 7.5 mL 加甲醇稀释至 10mL。分别精密吸取稀释后溶液和原对照品溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪测定, 进样量分别为 1.416, 2.832, 4.248, 5.664, 7.08, 9.44 μ g。以峰面积的自然对数为纵坐标(Y), 进样微克数的自然对数为横坐标(X),

[收稿日期] 2005-09-15

[通讯作者] 陈英红, Tel: (0431) 6816839; E-mail: Zhongyanjrz@vahoo.com.cn



图 1 黄芪甲苷对照品色谱图 1. 黄芪甲苷

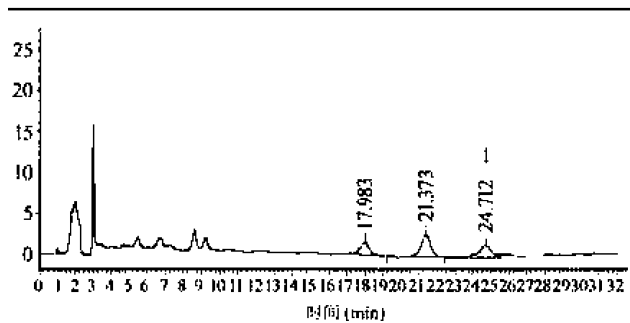


图 2 样品色谱图 1. 黄芪甲苷

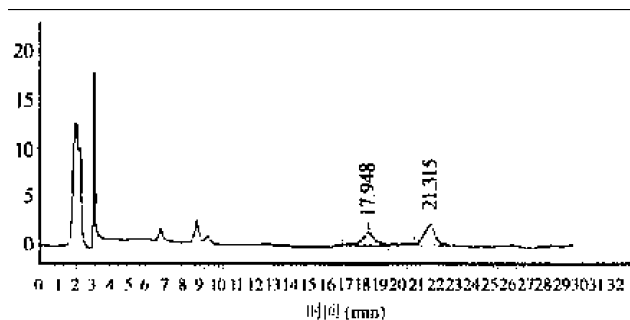


图 3 阴性样品色谱图

绘制黄芪甲苷标准曲线。回归方程为： $Y = 1.531X + 11.004$ ，相关系数 $r = 0.9996$ ($n = 6$)，线性范围为 $1.416 \sim 9.441 \mu\text{g}$ 。

2.4 精密度试验及供试品溶液稳定性试验 取同一供试品溶液，重复进样测定 5 次（每次间隔 1h），结果 RSD 为 1.40% ($n = 5$)，表明供试品溶液在 9h 内稳定性好，且精密度较好。

2.5 重复性试验 分别称取本品同一批号样品 5 份，依法制备 5 份供试品溶液，进行 5 次独立测定，结果 RSD 为 1.23% ($n = 5$)，说明本方法重复性良好。

2.6 回收率试验 在已知含量的样品粉末中，定量加入一定量的黄芪甲苷对照品，依法操作，进样测定，结果见表 1。

2.7 样品测定 取本品 5g，研碎，精密称定，加甲醇 200mL，加热回流 1h，提取液回收溶剂并浓缩至干，残渣加水 10mL，微热使溶解，用水饱和的正丁醇振荡提取 4 次，每次 40mL，合并正丁醇液，用氨试液充

表 1 黄芪甲苷回收率测定结果

编号	加入量 (mg)	样品量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.3500	0.3720	0.7079	96.50		
2	0.3500	0.3850	0.7275	97.85		
3	0.3500	0.3640	0.6958	94.81	97.79	2.37
4	0.3500	0.3700	0.7233	100.93		
5	0.3500	0.3710	0.7169	98.84		

分洗涤 2 次，每次 40mL，弃去氨液，正丁醇液蒸干，残渣加水 5mL 使溶解，放冷，通过 D_{101} 型大孔吸附树脂柱（内径 1.5cm，长 15cm），以水 50mL 洗脱，弃去水液，再用 40% 乙醇 60mL 洗脱，弃去洗脱液，继用 70% 乙醇 80mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，用甲醇溶解并转移至 5mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得供试品溶液。精密吸取对照品溶液 10 μL 、20 μL ，供试品溶液 20 μL ，注入液相色谱仪，测定，以外标两点法对数方程计算黄芪甲苷含量。结果分别为 $0.098 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ （批号：050101）， $0.094 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ （批号：050102）， $0.105 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ （批号：050103）。

3 讨论

1 由于该检测器的检测原理是对雾化粒子的大小和数量产生响应，故其定量计算的方法与紫外检测器不同。本实验表明，不同进样量的自然对数值与峰面积的自然对数值为一条不过原点的直线，因此在含量测定时须随行两个浓度的对照品，进样量和峰面积分别取自然对数后计算含量。

2 选择好 ELSD 的 2 个参数——漂移管温度和雾化气体流速是完成该方法测定的重要条件。本试验参考检测器使用手册推荐值作为起点，逐一改变两者，观测流动相和被检测组分进入检测器时的基线噪音和信号强度，最终确定上述条件。

3 试验中考察了不同来源的黄芪药材的含量，发现黄芪甲苷的含量差异较大，为控制产品质量，保证临床用药安全有效，有必要对药材含量进行监测达标后投料。

4 试验中考察了不同提取方法（甲醇超声、加热回流），不同提取时间（40、60、80min）等提取条件，结果表明用甲醇回流提取 60min 效率最高。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 212, 409.