

高效液相色谱法测定葛根芩连微丸中葛根素的含量

吴昭晖, 谭晓梅, 罗佳波(第一军医大学中医系中药新药研究重点实验室, 广州 510515)

摘要: 色谱条件: 以 ODS 柱为分析柱, 柱温为室温, 流动相甲醇-乙腈-水(12: 8: 80), 检测波长为 250nm, 外标法计算含量。理论塔板数以葛根素峰计算不低于 2300。葛根素浓度在 20~ 90 μ g/ml 与色谱峰面积呈线性关系, 回归方程: $Y = 36.8862x - 2.2899$; $r = 0.9999$, 平均回收率 98.74%, $RSD 2.06\%$ ($n = 4$)。

关键词: HPLC; 葛根芩连微丸; 葛根素

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005- 9903(1999)06-0010-02

Determination of Puerarin in Gegen Qinlian Weiwan by HPLC

WU Zhao-hui, TAN Xiao-mei, LUO Jia-bo

(Key Laboratory of Research of TCM and New Drug of The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

Abstract: Chromatographic conditions were: ODS column; column temperature, room temperature; mobile phase, CH₃OH-CH₃CN-H₂O(12: 8: 80); flow rate, 0.8ml/min; detected at 250nm. The contents of Puerarin were calculated by external standard method. The number of theoretical plates calculated for Puerarin peak was no less than 2300. The standard curve

was linear in the concentration range of 20~ 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the correlation coefficient was 0.9999. The average recovery and the relative standard deviation were 98.74% and 2.06% ($n=4$) respectively.

Key words: HPLC; gegen qinlian weiwan; puerarin

葛根芩连微丸是由葛根、黄芩、黄连、甘草制成。收载于中国药典 1995 年版一部^[1]。功能解肌清热, 止泻止痢。其中葛根为方中君药, 而葛根素是葛根的主要有效成分, 具有多种药理作用^[2,3]。因此, 测定葛根素含量, 对控制产品质量, 确保临床疗效, 具有重要意义^[4]。1995 年版中国药典只以性状、鉴别、检查、盐酸小檗碱含量测定等项目评价葛根芩连微丸的质量, 未建立葛根素的含量测定方法。本文以葛根素为质量控制指标, 建立了高效液相色谱法测定葛根芩连微丸中葛根素含量的方法, 该法操作简便, 结果准确, 具有良好的重现性。

1 仪器与试剂

仪器: 美国惠普 HP-1100 高效液相色谱仪(检测器: G1315A 紫外-可见光二极管阵列检测器); 试剂: 甲醇、乙腈(均为色谱纯); 对照品: 葛根素(供含量测定用, 纯度 99.25%), (中国药品生物制品检定所, 批号 0752-9806); 样品: 葛根芩连微丸(柳州市中药厂, 批号 970905, 970808, 980923); 对照品储备液: 精密称取葛根素对照品 11mg 置于 25ml 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件 ODS 柱(5 μm , 250mm \times 4mm); 流动相: 甲醇-乙腈-水(12: 8: 80); 柱温为室温; 检测波长为 250nm; 流速为 0.8ml/min。

2.2 可行性试验 取葛根素对照品储备液适量, 用甲醇稀释成合适浓度的葛根素对照品溶液, 自动进样 5 μl , 经紫外全波长扫描, 二极管阵列检测器检测, 得三维液相色谱图。由三维谱图可知, 葛根素峰的最大吸收波长

为 250nm, 故检测波长选用 250nm。

按处方配比制备不含葛根的葛根芩连微丸阴性样品。称取葛根芩连微丸样品及相当量阴性样品, 按样品测定项下方法分别进行提取。然后分别取葛根素对照品溶液、葛根芩连微丸样品溶液、不含葛根的葛根芩连微丸阴性样品溶液, 自动进样 5 μl , 打印色谱图, 结果见图 1~ 3。由图可知, 葛根素峰的保留时间约为 10min; 阴性样品在葛根素峰处无假阳性峰, 即葛根芩连微丸中其它成分对葛根素含量测定没有影响。理论塔板数以葛根素峰计为 2554。

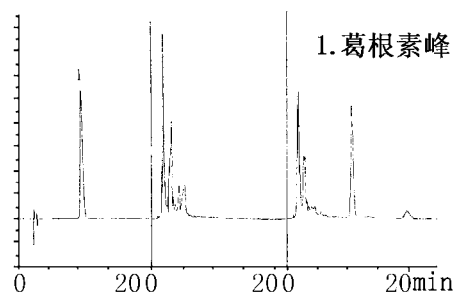


图 1 葛根素对照品色谱图 图 2 葛根芩连微丸阴性样品色谱图 图 3 葛根芩连微丸样品色谱图

2.3 线性关系考察 分别精密量取葛根素对照品储备液 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00ml 置于 5ml 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。各溶液分别置自动进样器中进样, 每一浓度进样 2 次, 每次进样 5 μl , 记录峰面积。以峰面积均值对进样浓度进行回归处理, 得线性回归方程: $Y = 36.8862x - 2.2899$; $r = 0.9999$ 。结果表明: 葛根素浓度在 20~ 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 峰面积与进样浓度呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 取葛根素对照品溶液, 重复自动进样 5 次。结果峰面积均值为 775.3, RSD 为 1.79% ($n=5$)。

取葛根芩连微丸样品溶液,重复自动进样5次。结果峰面积均值为1221.6, *RSD* 为2.10% ($n=5$)。

2.5 加样回收率试验 按样品测定项下方法,精密称取同一批葛根芩连微丸细粉6份,其中4份分别加入葛根素对照品储备液3ml。另外2份作空白。按样品测定项下方法操作,依法测定,结果见表1。

表1 回收率测定结果

序号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	<i>RSD</i> (%)
1	2.441	1.356	3.800	100.22		
2	2.441	1.356	3.745	96.16		
3	2.441	1.356	3.771	98.08	98.74	2.06
4	2.441	1.356	3.804	100.51		

2.6 样品测定 取葛根芩连微丸6袋(1g/袋),研细。取其细粉约0.3g,置100ml具塞三角烧瓶中,精密加入甲醇50ml,称定,水浴加热回流提取1h,放冷至室温,精密称量下用甲醇补足损失的重量,摇匀,过滤。取续滤液,用0.45 μ m微孔滤膜过滤,进样5 μ l,记录色谱峰面积,外标法计算含量。结果见表2。

表2 样品测定结果($n=3$)

样品批号	葛根素含量(mg/g)	<i>RSD</i> (%)
980923	7.65	2.01
970905	7.28	1.98
970808	7.46	2.20

3 讨论

3.1 采用对葛根素溶解性能好的甲醇为提取溶剂,分别用水浴回流提取0.5, 1, 1.5h。结果表明,以水浴回流提取1h可提取完全。

3.2 采用本法测定葛根芩连微丸中葛根素含量具有操作简便、重现性好、结果准确等优点,可为葛根芩连微丸质量标准的改进提供葛根素含量测定方法,并可为其它含葛根的复方制剂制定质量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典(一部)[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1995. 610~ 611
- [2] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1995. 626
- [3] 范书铎, 邓丽华, 梁强, 等. 葛根素对发热兔解热作用的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 1991(4): 250~ 252
- [4] 谭生健, 邱夏, 李光慧, 等. RP-HPLC测定葛根芩连片中葛根素的含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(12): 732~ 733

(收稿日期: 1999-06-14)