

参茯益气安神合剂中黄芪甲苷的含量测定

李建芳^{1*}, 黄劲通²

(1. 广西北海食品药品检验所, 广西 北海 536000;
2. 广西恒拓集团仁盛制药有限公司, 广西 上思 535500)

[摘要] 目的:建立 HPLC-ELSD 法测定参茯益气安神合剂中黄芪甲苷的含量方法。方法:采用 Applo C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(36:64), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, ELSD 参数为漂移管温度 80 ℃, 气体流速 2.0 L·min⁻¹。结果:黄芪甲苷在 2.032~12.192 μg 峰面积积分值自然对数与进样量自然对数有良好的线性关系($r=0.9999$), 平均加样回收率为 98.42%, RSD 1.36%。结论:该法操作简单、结果准确, 重复性好, 可用于参茯益气合剂的质量控制。

[关键词] 参茯益气安神合剂; 蒸发光散射器; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0102-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090102

Determination of Astragaloside IV in Shenfu Yiqi Anshen Mixture
by HPLC-ELSD

LI Jian-fang^{1*}, HUANG Jing-tong²

(1. Institute for Food and Drug Control of Guangxi, Beihai 536000, China;
2. Guangxi Constant Rensheng Extension Group Pharmaceutical Co., LTD, Shangsi 535500, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-ELSD method for the determination of astragaloside IV in Shenfu Yiqi Anshen Mixture. **Method:** HPLC-ELSD was used to determine astragaloside IV in Shenfuyiqi Anshen Mixture. The separation was performed on Applo C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mixture of acetonitrile-water (36:64) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and coloume temperature at 30 ℃. The temperature of drift tube was 80 ℃ and zhe carrier flow was 2 L·min⁻¹. **Results:** The linear ranges of astragaloside IV was 2.032-12.192 μg ($r=0.9999$), with the average recovery rate were of 98.42%, RSD was 1.36%. **Conclusion:** The methods is simple, accurate, reproducible and it can used for the quality control of Shenfu Yiqi Anshen mixture.

[Key words] Shenfu Yiqi Anshen mixture; HPLC; ELSD; astragaloside IV; contents determination

参茯益气安神合剂由党参、黄芪、茯苓、甘草、当归、川芎等 13 味中药组成, 收载于国家药品标准^[1], 具有益气健脾、养心安神的功效, 临床用于心脾两虚所致的心悸怔忡、失眠健忘、头晕眼花、面色萎黄、食少倦怠等症。黄芪是方中君药, 黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分之一, 黄芪及制剂中多以黄芪甲苷作为质量控制指标, 现行质量标准采用薄层扫描法测定其含量, 操作繁琐, 结果重复性差, 误差大。为了

更好的控制该产品的质量, 保证临床疗效的稳定性, 本实验参考有关文献^[2-4], 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法测定参茯益气安神合剂中黄芪甲苷的含量, 为进一步控制产品质量提供了依据。

1 仪器与试剂

美国 Alltech 高效液相色谱仪(426HPCPump 泵, 7725i 进样阀, AlltechELSD3300ES 检测器, CShrom Plus 色谱工作站), AB265-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多)。

黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110781-200613), 乙腈为色谱纯, 水为超纯水,

[收稿日期] 20130313(006)

[通讯作者] * 李建芳, 主管药师, 从事药品快检方法研究, Tel: 0779-6803596, E-mail: 408607525@qq.com

其他试剂均为分析纯,参茯益气安神合剂(广西河丰药业有限责任公司,批号 110601,110701,110801)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Applo C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(36:64),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,ELSD 参数漂移管温度 80 ℃,气体流速 2.0 L·min⁻¹,进样量 20 μL。理论板数按黄芪甲苷峰计算不低于 4 000。

2.2 溶液的制备

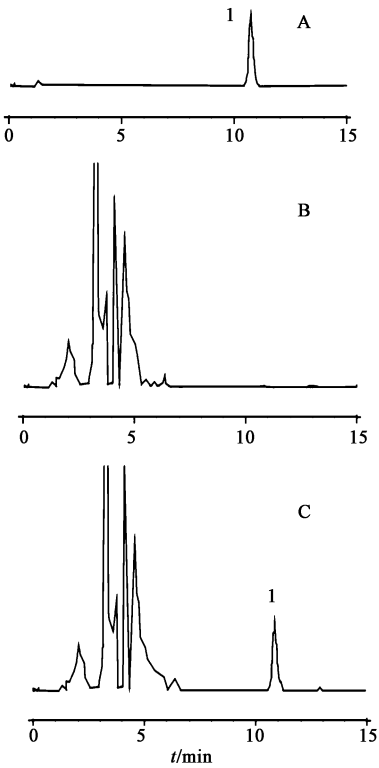
2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取五氧化二磷减压干燥至恒重的黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.25 mg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品适量,混匀,精密量取 50 mL,置分液漏斗中,用水饱和的正丁醇提取 4 次,每次 50 mL,合并正丁醇提取液,用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 50 mL,弃去氢氧化钠溶液,正丁醇液用水洗涤 2 次,每次 50 mL,弃去水液,正丁醇液置水浴上蒸干,残渣用甲醇适量使溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得^[5-6]。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方量称取除黄芪外的其余药材,按制备工艺制成缺黄芪的阴性样品,取适量,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液 10, 20 μL,供试品溶液、阴性对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,按照上述色谱条件测定,结果供试品溶液色谱图中,均有与黄芪甲苷保留时间相同的色谱峰,且与相邻的杂质峰能完全分离,峰形较好;阴性对照溶液在与黄芪甲苷相同保留时间处未见明显色谱峰,表明阴性对照无干扰,见图 1。

2.4 线性关系考察 精密称取黄芪甲苷对照品 25.40 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。分别精密吸取以上对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成不同质量浓度的对照品溶液,按上述色谱条件分别进样 20 μL,测定峰面积,以进样量(μg)自然对数为横坐标,峰面积积分值自然对数为纵坐标进行线性回归,回归方程为 $Y=1.31X+12.59$ ($r=0.9999$)。结果表明,黄芪甲苷在 2.032~12.192 μg 峰面积积分值自然对数与进样量自然对数线性关系良好。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照品;1. 黄芪甲苷

图 1 参茯益气安神合剂 HPLC

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,连续进样 6 次,每次 20 μL,测定峰面积,结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.45%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0,4,8,12,24 h 精密吸取 20 μL,注入液相色谱仪,依法测定,结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.75%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批号样品共 6 份,精密量取 50 mL,分别按供试品溶液制备方法制备并测定,结果黄芪甲苷的平均含量为 10.64 mg·L⁻¹,RSD 1.77%,表明本法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的同一批样品(批号 110601)25 mL,共 6 份,分别精密加入一定量黄芪甲苷对照品(以溶液的形式加入),按供试品溶液制备方法制备溶液并测定含量,计算回收率,结果见表 1。

2.9 样品测定 取 3 批参茯益气安神合剂样品(批号为 110601,110701,110801),按供试品溶液制备方法制备溶液 6 份,每批平行 2 份,分别精密吸取对照品溶液 10,20 μL,供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,结果分别为 10.46, 10.96,10.96 mg·L⁻¹。

表 1 黄芪甲苷加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.266	0.25	0.510 3	98.90	98.42	1.36
0.266	0.25	0.501 7	97.23		
0.266	0.25	0.520 2	100.81		
0.266	0.25	0.502 4	97.36		
0.266	0.25	0.508 0	98.45		
0.266	0.25	0.504 5	97.77		

3 讨论

3.1 测定方法的选择 复方制剂中黄芪甲苷的含量测定方法,有分光光度法、薄层色谱扫描法、高效液相色谱法等^[7]。参芪益气安神合剂现行标准采用薄层色谱扫描法,该方法操作繁琐,且薄层扫描法受薄层厚度、均匀度、薄层展开环境、显色条件等诸多因素的影响,结果误差大(可达 3%),重复性差,生产过程较难控制产品的质量;而采用高效液相色谱法测定时,由于黄芪甲苷在紫外-可见光下为末端吸收,紫外检测器对于末端吸收强度较弱,其他杂质干扰大,很难达到基线分离;蒸发光散射检测器是近年来逐步应用在色谱方面的通用型质量检测器,对末端吸收或无紫外吸收的皂苷类化合物具有较高的检测灵敏度,稳定性和重复性良好,在黄芪及其制剂的含量测定中应用日益增加,因此本实验选择蒸发光散射器进行定量分析。

3.2 流动相的选择 曾采用甲醇-四氢呋喃-0.2%三乙胺水溶液(90:6:4)^[8]、甲醇-水(75:25)、乙腈-水(32:68)^[3]、乙腈-水(36:64)作为流动相,分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定,考察出峰时间和色谱分离情况,结果流动相 A、B 出峰时间均过早,流动相 A 分离度小于 1.5,流动相 B 谱图出现杂质峰较多,样品中的其他成分对黄芪甲苷峰的干扰明显,流动相 C 分离度 > 1.5,理论塔板数大于 5 000,但其出峰时间过晚,超过 20 min,分析时间长,溶剂用量大,而流动相 D 的出峰时间为 10 min 左右,各成分的分离情况较好,所测得黄芪甲苷峰形良好,理论塔板数及分离度均能达到实验要求,分离效果最佳,综合考虑,选择乙腈-水(36:64)作为本实验的流动相。

3.3 供试品溶液制备方法的考察 考察了甲醇索氏回流提取、甲醇超声提取、水饱和正丁醇萃取 3 种方法,结果表明,索氏回流提取,超声提取得到的成分比较复杂,对黄芪甲苷峰干扰明显,分离度差,且

含量均偏低,不利于分析,水饱和正丁醇萃取法制备黄芪甲苷含量最高,峰形良好,且与其他成分达到基线分离,杂质相对较少,且方法简便,且为了考察氨试液洗涤和 1% 氢氧化钠溶液洗涤正丁醇两种方法对供试液中黄芪甲苷含量的影响,在制备供试品溶液过程中曾采用氨试液洗涤正丁醇,结果样品谱图中黄芪甲苷干扰峰较多,而改用 1% 氢氧化钠溶液洗涤后结果较满意,综合考虑,确定采用水饱和正丁醇萃取、1% 氢氧化钠溶液洗脱除去杂质后用甲醇定容的方法,作为本实验供试品溶液制备方法。

3.4 漂移管参数考察 蒸发光散射检测器的漂移管温度和载气流速是影响检测灵敏度的两个关键参数,本实验对漂移管温度及载气流速进行考察,在载气压力固定的条件下,温度从 65 ~ 95 ℃,每隔 3 ℃ 进样 1 次,观察其信噪比,结果漂移管温度 80 ℃ 时,黄芪甲苷有较低的信噪比和较高的信号响应值,可以获得最大的检测灵敏度,且载气流速对峰保留时间、峰形均有一定的影响,流速越大,响应值越小,综合各因素考虑,确定漂移管温度为 80 ℃,载气流速为 2.0 L·min⁻¹。

实验比对结果及方法学考察结果表明,采用 HPLC-ELCD 法测定参芪益气安神合剂中黄芪甲苷含量与薄层扫描法测定的结果基本一致,不受其他成分干扰,方法简单,灵敏度高,结果准确可靠,重复性好,可用于参芪益气安神合剂的质量控制。

[参考文献]

[1] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[S]. WS-5635(B-0635)-2002.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:283.

[3] 张莲珠. HPLC 测定黄芪甲苷概况[J]. 中成药, 2005, 27(5):587.

[4] 颜晓航. 黄芪及其制剂中黄芪甲苷含量测定方法研究进展[J]. 安徽医药, 2006, 10(12):953.

[5] 吴玉强,罗轶. HPLC-ELSD 测定复方扶芳藤合剂中黄芪甲苷[J]. 中草药, 2006, 37(9):1353.

[6] 唐德智,莫迎. 小儿健脾开胃合剂中黄芪甲苷的含量测定[J]. 中国药业, 2010, 19(6):22.

[7] 欧阳春华. 黄芪甲苷含量测定几种常用方法的比较[J]. 中国现代药物应用, 2009, 15(3):139.

[8] 钱芳,刘志辉,陆超,刘媛媛,等. HPLC 测定抗心衰颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(7):910.

[责任编辑 顾雪竹]