

HPLC-ELSD法测定妇安栓剂中黄芪甲苷的含量

宋敏*(资阳市第一人民医院药剂科,四川资阳 641300)

中图分类号 R283.62*3;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0647-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.24

摘要 目的:建立测定妇安栓剂中黄芪甲苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法。色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(32:68, V/V),流速为0.8 ml/min,柱温为30 ℃,蒸发温度为100 ℃,氮气流速为2.0 L/min。结果:黄芪甲苷进样量在2.65~26.50 μg范围内的对数值与峰面积积分值的对数值呈良好的线性关系($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率为99.38%,RSD=1.60%($n=9$)。结论:该方法简便、灵敏、重复性好,可用于妇安栓剂的质量控制。

关键词 妇安栓剂;黄芪甲苷;高效液相色谱-蒸发光散射检测器法;含量测定

Content Determination of Astragaloside in Fuan Suppositories by HPLC-ELSD

SONG Min(Dept. of Pharmacy, Ziyang First People's Hospital, Sichuan Ziyang 641300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of astragaloside in Fuan suppositories. METHODS: HPLC-ELSD was adopted. The determination was performed on Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (32:68, V/V) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was set at 30 ℃, and evaporation temperature was 100 ℃. The flow rate of nitrogen was 2.0 L/min. RESULTS: The linear range of astragaloside was 2.65-26.50 μg($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; average recovery was 99.38% (RSD=1.60%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and reproducibility. It can be used for the quality control for Fuan suppositories.

KEYWORDS Fuan suppositories; Astragaloside; HPLC-ELSD; Content determination

妇安栓剂来源于某院临床经验方,由黄芪、蒲公英、败酱草等10味药材经提取制备而成,临床用于治疗子宫内异位症。方中以黄芪为君药,发挥益气养血、培元固本的作用。药理研究表明,黄芪具有心肌保护^[1]、降血糖^[2]、抗肝纤维化^[3]等作用。黄芪甲苷是黄芪中的主要有效化学成分,故笔者采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法^[4]测定妇安栓剂中黄芪甲苷的含量,旨在为该制剂的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪、Empower色谱工作站(美国Waters公司);2000型ELSD(美国Alltech公司);KQ-50B型超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司,频率:40 kHz,功率:50 W);AEG-45SM型电子天平(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

妇安栓剂(重庆市荣昌县中医院制剂,批号:100401、100501、100601);黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:1781-201017);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(32:68, V/V);流速:0.8 ml/min;柱温:30 ℃;ELSD蒸发温度:100 ℃;载气:氮气;载气流速:2.0 L/min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品5.3 mg,置10 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得每1 ml

含黄芪甲苷0.53 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品1粒,精密称定,加热熔化,加入硅胶(100~200目)10 g趁热搅拌均匀,加甲醇100 ml超声30 min,冰浴冷却10 min,取出,放至室温,摇匀,滤过,滤液蒸干,残渣加水30 ml分数次微热使溶解,置分液漏斗中,用水饱和的正丁醇振摇提取4次,每次40 ml,合并正丁醇液,用氨试液洗涤3次,每次30 ml,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加水10 ml使溶解,放冷,通过D101型大孔吸附树脂(内径:1.5 cm,长:12 cm),以水70 ml洗脱,弃去水液,再用40%乙醇40 ml洗脱,弃去40%乙醇洗脱液,继用70%乙醇150 ml洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇使溶解并转移至5 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按样品制备方法制得缺黄芪的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制得阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 将供试品溶液、黄芪甲苷对照品溶液与缺黄芪的阴性对照溶液分别注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果表明,黄芪甲苷对照品与供试品中黄芪甲苷色谱峰保留时间一致,阴性对照在黄芪甲苷色谱峰位置处无相应峰出现,说明阴性对照无干扰。色谱见图1。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液(0.53 mg/ml)5、7、10、15、20、25、50 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以黄芪甲苷进样量的对数值($\lg c$)为横坐标,峰面积积分值的对数值($\lg A$)为纵坐标,进行线性回归,得黄芪甲苷的回归方程为 $\lg A = 1.8827 \lg c + 5.0699$ ($r=0.9999$, $n=7$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在2.65~

*主管药师,硕士。研究方向:临床药学、医院药事管理。E-mail: songmin327@qq.com

26.50 μg 范围内的对数值与峰面积积分值的对数值呈良好的线性关系。

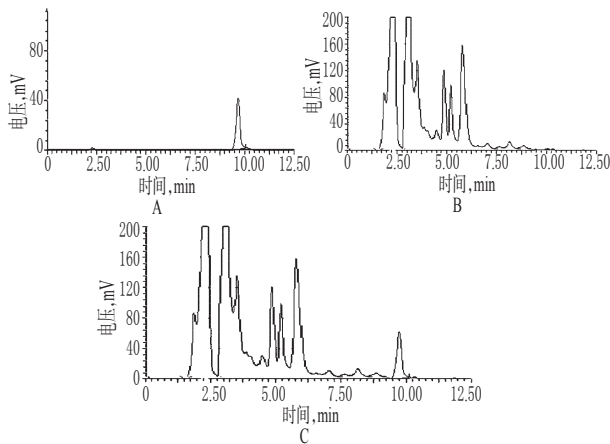


图1 高效液相色谱图

A. 黄芪甲苷对照品; B. 阴性对照; C. 供试品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. astragaloside control; B. negative control; C. test sample

2.3.3 精密度试验 取黄芪甲苷对照品溶液(0.53 mg/ml)10 μl , 按上述色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果显示, $\text{RSD}=0.48\%$ ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液(0.53 mg/ml)与同一供试品溶液各10 μl , 分别于0、1、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, 对照品溶液和供试品溶液对应的RSD分别为0.94%和1.46% (n 均为7), 表明对照品溶液和供试品溶液均在24 h内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一批样品适量, 按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果显示, 每粒妇安栓剂中平均含黄芪甲苷3.427 7 mg, $\text{RSD}=2.33\%$ ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批已知含量的样品(黄芪甲苷含量: 3.424 5 mg/粒)9份, 各0.5 g, 精密称定, 每3份为一组, 分别精密加入黄芪甲苷对照品溶液(0.53 mg/ml)0.8、1.0、1.2 ml, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test($n=9$)

编号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.502 1	0.636 8	0.509 0	1.146 5	100.13		
2	0.500 1	0.634 3	0.507 0	1.132 0	98.16		
3	0.503 2	0.638 2	0.511 0	1.137 3	97.67		
4	0.534 5	0.677 9	0.678 0	1.350 3	99.17		
5	0.508 1	0.644 4	0.644 0	1.278 9	98.53	99.38	1.60
6	0.507 5	0.643 7	0.644 0	1.272 6	97.65		
7	0.505 3	0.640 9	0.769 0	1.417 7	101.01		
8	0.502 3	0.637 1	0.765 0	1.419 8	102.32		
9	0.504 6	0.640 0	0.768 0	1.406 5	99.81		

2.4 样品含量测定

取3批样品各适量, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积计算样品中黄芪甲苷的含量, 结果见表2。

3 讨论

黄芪甲苷为皂苷类成分, 紫外吸收波数较低, 用紫外检测

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

样品批号	黄芪甲苷含量, mg/粒	\bar{x} , mg/粒
100401	3.432 1	
	3.414 5	3.425 4
	3.429 8	
100501	3.432 3	
	3.428 7	3.429 3
	3.426 8	
100601	3.414 2	
	3.453 6	3.429 6
	3.421 0	

器检测时干扰很大, 无法正常检测。ELSD为质量型通用检测器, 与检测物质性质无关^[5-6]。经试验得出, ELSD用于黄芪甲苷的含量测定, 重复性、稳定性、灵敏度均能符合含量测定的要求。

根据文献报道^[7-9], 笔者先后对色谱柱(迪马 C_8 柱、Phenomenex C_{18} 柱)、流动相[甲醇-水(80:20, V/V)、甲醇-水(70:30, V/V)、甲醇-水(75:25, V/V)、乙腈-水(38:62, V/V)、乙腈-水(32:68, V/V)], 蒸发光蒸发温度、流动相流速及载气流速进行了试验研究, 拟定了色谱峰分离度好、保留时间适宜, 且阴性对照无干扰的最优色谱条件。

ELSD的检测效果与载气流速、漂移管温度两个基本参数有关。在ELSD检测过程中, 当载气流速太低时, 雾化后的样品易聚集形成微液滴, 影响检测; 当载气流速太快时, 不利于样品的分离。漂移管温度太低时, 溶剂挥发不够完全, 造成基线不平; 温度太高时, 可能造成样品的挥发, 影响检测结果。本试验的最终优化条件: 流动相为乙腈-水(32:68, V/V), 流速为0.8 ml/min, 柱温为30 $^{\circ}\text{C}$, 蒸发光蒸发温度为100 $^{\circ}\text{C}$, 载气(氮气)流速为2.0 L/min。

综上, 本方法快速、简便、灵敏, 结果稳定、可靠、重复性好, 可用于妇安栓剂的质量控制。

参考文献

- [1] 汪明辉, 李双杰. 黄芪甲苷抗氧化机制对病毒性心肌炎保护作用的研究[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(10): 825.
- [2] 谢春英. 黄芪甲苷降血糖作用的实验研究[J]. 中药材, 2010, 33(8): 1 319.
- [3] 王登妮, 徐军全, 宋维芳, 等. 黄芪对肝纤维化的防治作用[J]. 中国医药导报, 2010, 7(9): 15.
- [4] 张开莲, 凌立新, 杨思进. HPLC-ELSD法测定心安颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(24): 1 884.
- [5] 刘鹏, 周军. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定花芪通脉颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 医药导报, 2006, 25(11): 1 197.
- [6] 王光忠, 胡克. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定静心胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(9): 1 065.
- [7] 肖佳尚, 朱涛. HPLC-ELSD法测定芪红胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(2): 138.
- [8] 单玉, 董晓茜, 张振秋, 等. HPLC-ELSD测定黄芪苦参药对提取物中黄芪甲苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(1): 187.
- [9] 符乃光, 苏玉严. HPLC-ELSD法测定黄芪甲苷的实验研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(6): 1 306.

(收稿日期: 2013-10-09 修回日期: 2014-01-08)