

HPLC法测定芪黄胶囊中青藤碱的含量^Δ

阳 勇^{1*}, 罗维早¹, 梁旭明¹, 秦伟瀚¹, 卿大双^{1,2}, 王德江^{1,2}, 王 颖^{3#}(1.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2.成都中医药大学药学院, 成都 610072; 3.重庆市中医院药剂科, 重庆 400021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4243-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.23

摘要 目的:建立测定芪黄胶囊中青藤碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welch Ultimate AQ-C₁₈,流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为264 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:青藤碱检测进样量线性范围为0.200 3~10.016 0 μg($r=0.999 8$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;加样回收率为98.80%~100.94%,RSD为0.79%($n=6$)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于芪黄胶囊中青藤碱的含量测定。

关键词 芪黄胶囊;青藤碱;含量;高效液相色谱法

Content Determination of Sinomenine in Qihuang Capsule by HPLC

YANG Yong¹, LUO Wei-zao¹, LIANG Xu-ming¹, QIN Wei-han¹, QING Da-shuang^{1,2}, WANG De-jiang^{1,2}, WANG Ying³(1.Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2.College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 3.Dept. of Pharmacy, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of sinomenine in Qihuang capsule. METHODS: HPLC was performed on the column of welch C₁₈-AQ with mobile phase of methanol-phosphate buffer (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 264 nm, column temperature was 30 ℃ and volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range of sinomenine was 0.200 3-10.016 0 μg($r=0.999 8$), RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.0%, recovery was 98.80%-100.94% (RSD=0.79%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the content determination of sinomenine in Qihuang capsule.

KEYWORDS Qihuang capsule; Sinomenine; Content; HPLC

芪黄胶囊由黄芪、青风藤、匙羹藤叶等药材制备而成,具有补气养阴、活血化瘀之功效,用于中医辨证属糖尿病肾病气阴两虚兼血瘀证候者^[1-3]。现代药理学研究表明,青藤碱具有免疫抑制作用^[4],并且对糖尿病肾病具有确切的防治作用^[5-7]。本研究对芪黄胶囊中青藤碱所含青藤碱进行了含量测定,并对其含量限度标准进行了探索。

1 材料

1.1 仪器

DGU-20A型高效液相色谱(HPLC)仪(包括SPD-M20A型二极管阵列检测器)、AUW220D型十万分之一电子天平(日本岛津公司);KQ250DB型数控超声波清洗器(巩义市予华仪器有限公司);Anke TGL-160G型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

芪黄胶囊(山东凤凰制药股份有限公司,批号:2010-1、2010-2、2010-3、2012-1,规格:0.38 g/粒);青藤碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0774-200206,纯度>98%);甲醇

为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Welch Ultimate AQ-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-磷酸盐缓冲液(B,含0.02 mol/L的磷酸二氢钾溶液,用磷酸调pH至3.0),梯度洗脱(0~25 min, 10.0%→25.0% A; 25~28 min, 25.0%→75.0% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:264 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数以青藤碱峰计应不少于5 000,分离度>2.0,各成分基线分离良好,详见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取青藤碱对照品适量,加50%乙醇制成每1 ml含0.1 mg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品内容物0.50 g,置于25 ml量瓶中,加50%乙醇溶解,超声(功率:250 W,频率:100 kHz)提取30 min,放冷,再加50%乙醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 制备缺青风藤的阴性样品,精密称取0.50 g,按“2.2.2”项下方法操作,即得。

2.3 线性关系考察

精密称取青藤碱对照品适量,制成质量浓度为1 001.60 μg/ml的对照品贮备液。精密量取上述贮备液倍比(50、25、10、5、2.5、1.25、1倍)稀释制得不同质量浓度的对照品系列溶

Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2013ZX091011108);重庆市卫生局中医药科技项目(No.ZY20132071)

* 助理研究员,硕士。研究方向:中药新药开发、药物代谢。E-mail: yangychem@126.com

通信作者:主管中药师。研究方向:中药学。电话:023-89029031

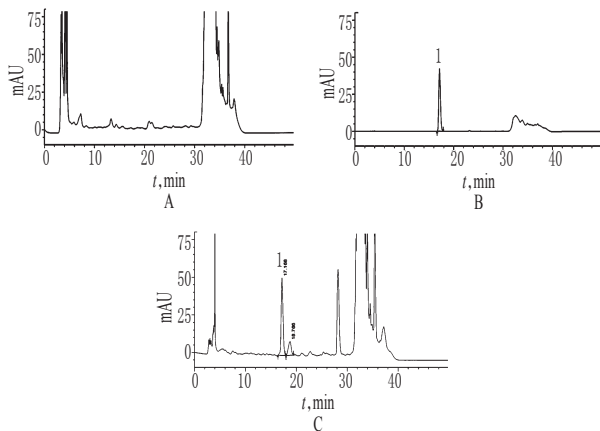


图1 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 对照品; C. 供试品; 1. 青藤碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative control; B. reference substance; C. test sample; 1. sinomenine
液。精密吸取上述对照品系列溶液各 10 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以青藤碱进样量(x , μ g)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 5\,264.521\,8x - 19\,721.237\,8$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明, 青藤碱检测进样量线性范围为 0.200 3~10.016 0 μ g。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定, 记录峰面积。结果, 青藤碱峰面积的 RSD 为 0.07% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号: 2010-1)适量, 分别于放置 0、2、4、6、8、12、18、24 h 时进样测定, 记录峰面积。结果, 青藤碱峰面积的 RSD 为 0.18% ($n = 8$), 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号: 2010-1)适量, 共 5 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 青藤碱峰面积的 RSD 为 0.26% ($n = 5$), 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取样品(批号: 2010-1)适量, 共 6 份, 分别加入适量对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Results of recovery test ($n = 6$)

称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.245 3	1.802 4	1.730 2	3.511 8	98.80		
0.246 3	1.809 7	1.730 2	3.523 5	99.05		
0.252 2	1.853 1	1.730 2	3.599 5	100.94	99.56	0.79
0.249 5	1.833 3	1.730 2	3.563 1	99.98		
0.251 6	1.848 1	1.730 2	3.563 7	99.12		
0.244 7	1.798 0	1.730 2	3.519 2	99.48		

2.8 样品含量测定

取 4 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“2.1”项下色谱条件进样测定并计算青藤碱含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n = 3$)

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

批号	青藤碱含量, mg/粒
2010-1	2.79
2010-2	2.80
2010-3	2.81
2012-1	2.83

根据上述 4 批样品测定结果, 同时考虑到不同产地、不同采收季节对青风藤药材中青藤碱含量影响的波动, 暂定本品每粒含青藤碱不得少于 1.5 mg。

3 讨论

芪黄胶囊原质量标准只针对黄芪中黄芪甲苷的含量进行测定, 为了进一步完善本品的质量标准, 本研究对青风藤中青藤碱的含量进行了测定, 并进行了方法学考察。

供试品溶液制备方法在参考文献[8]的基础上, 分别用水、乙醇、25%乙醇、50%乙醇、75%乙醇、95%乙醇、甲醇、25%甲醇、50%甲醇进行了样品提取考察, 并经 HPLC 法检测不同提取溶剂的提取效果。结果, 不同溶剂提取含量结果差异很大, 以 50%乙醇为提取溶剂时效果最好。

预试验中, 先后采用了 Phenomenex C₁₈、Agilent C₁₈、Welch Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱, 结果该 3 种色谱柱效果均较好。

参照 2010 年版《中国药典》(一部)青风藤项下含量测定方法中的波长及根据二极管阵列检测器紫外扫描试验结果, 确定检测波长为 264 nm。

流动相曾选择乙腈-0.4%甲酸(10:90, V/V)、甲醇-0.4%甲酸(15:85, V/V)、甲醇-磷酸盐缓冲液, 并结合梯度与等度洗脱的方法进行考察。结果表明, 等度洗脱条件下, 色谱峰峰形较差, 分离度不好; 梯度洗脱条件下, 以甲醇-0.4%甲酸系统色谱峰峰形较好。进一步对甲醇-磷酸盐缓冲液系统进行梯度变换考察, 最终选定了本研究中设定的流动相系统, 该条件所得色谱峰分离度好, 保留时间适宜, 且阴性对照无干扰。

综上所述, 本方法简便、准确、重复性好, 可用于芪黄胶囊中青藤碱的含量测定。

参考文献

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J MED*, 2010, 362(12):1 090.
- [2] 梁旭明, 钟国跃, 张小梅, 等. 芪黄胶囊质量控制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(3):331.
- [3] 梁旭明, 唐耀书, 张小梅. 薄层扫描法测定芪黄胶囊剂中黄芪甲苷的含量[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(1):22.
- [4] 朱士龙, 陈迪钊, 李勇, 等. 青藤碱最新研究进展[J]. *吉林大学学报: 自然科学版*, 2011, 41(5):95.
- [5] 尹金凤, 周阳, 沈江山. 青藤碱对糖尿病肾病大鼠肾脏 MCP-1 表达的影响[J]. *江西医药*, 2012, 47(3):195.
- [6] 周阳, 刘德华. 青藤碱对糖尿病大鼠肾脏 TGF- β 1 表达的影响[J]. *南昌大学学报: 医学版*, 2009, 49(4):52.
- [7] 吴志茹, 程彤, 贾志芳, 等. 盐酸青藤碱治疗 IgA 肾病的临床观察[J]. *临床荟萃*, 2008, 23(24):1 792.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:181.

(收稿日期: 2015-04-29 修回日期: 2015-08-06)

(编辑: 张 静)