

HPLC法测定生血宝合剂中黄芪甲苷的含量

常中飞^{1*}, 孙华燕², 胡秀敏^{3#}(1.首都医科大学石景山教学医院/北京市石景山医院肿瘤科, 北京 100043; 2.解放军总医院制剂室, 北京 100853; 3.北京市石景山区食品药品安全监控中心, 北京 100043)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)40-3822-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.40.25

摘要 目的:建立测定生血宝合剂中黄芪甲苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax SBC₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸(35:65, V/V),检测波长为203 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为25 ℃,进样量为20 μl。结果:黄芪甲苷检测质量浓度在0.99~9.90 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 6$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.2%;平均加样回收率为101.1%,RSD=1.86%($n=9$)。结论:该方法简便可靠、专属性强、重复性好,可用于生血宝合剂的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;生血宝合剂;黄芪甲苷;含量测定

Content Determination of Astragaloside IV in Shengxuebao Mixture by HPLC

CHANG Zhong-fei¹, SUN Hua-yan², HU Xiu-min³(1.Dept. of Oncology, Beijing Shijianshan Hospital, Shijingshan Teaching Hospital of Capital Medical University, Beijing 100043, China; 2.Dept. of Pharmaceutical Preparation, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 3.Beijing Shijingshan District Food and Drug Safety Monitoring Center, Beijing 100043, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of astragaloside IV in Shengxuebao mixture. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Zorbax SBC₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphate acid (35:65, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 203 nm, and the column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: The liner range of astragaloside IV were 0.99-9.90 μg/ml ($r=0.999\ 6$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.2%. The average recovery was 101.1% (RSD=1.86%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, specific and reproducible, and can be used for the quality control of Shengxuebao mixture.

KEYWORDS HPLC; Shengxuebao mixture; Astragaloside IV; Content determination

生血宝合剂是由何首乌(制)、女贞子、桑葚、黄芪、白芍、狗脊、墨旱莲等多味中药加工制成的补益类中成药,具有养肝肾、益气血的功效,临床主要用于治疗各种原因所致的贫血、恶性肿瘤化疗后所致白细胞减少、神疲乏力、腰膝酸软、头晕耳鸣、心悸、气短、失眠、咽干、纳差食少等,且疗效显著^[1]。黄芪是生血宝合剂中的主要成分,现代药理研究显示其具有促进机体代谢,抗疲劳,改善贫血,增强和调节机体免疫功能等作用^[2-3]。黄芪甲苷是方中黄芪的主要有效成分,而现有的制剂标准中并未对黄芪甲苷的含量作质量控制。为此,笔者以高效液相色谱(HPLC)法测定生血宝合剂中黄芪甲苷的含量,为制定更严格的生血宝合剂质量标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪,包含G1322A型脱气机、G1314A型四元梯度泵、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1314B紫外检测器(美国Agilent公司);KQ5200型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP211D天平(美国Sartorius公司)。

* 主治医师,博士。研究方向:中西医结合、临床肿瘤。电话:010-88689439。E-mail:changshiyou2006@126.com

通信作者:主管药师,博士。研究方向:中药质量标准。电话:010-68662702。E-mail:huxiumin1981@126.com

1.2 药品与试剂

黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110781-200613);生血宝合剂(清华德人西安幸福制药有限公司,批号:130708、130912、121125);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax SBC₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸(35:65, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;进样量:20 μl;检测波长:203 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的黄芪甲苷对照品9.90 mg,置于10 ml量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取生血宝合剂10 ml,加入用水饱和的正丁醇提取3次,每次20 ml,合并正丁醇提取液后,用氨试液充分洗涤3次,每次30 ml,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣置于10 ml量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm孔径微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方比例制备不含黄芪的生血宝合剂阴性样品,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制成阴

性溶液。

2.3 阴性溶液干扰试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性溶液各20 μl,分别注入HPLC仪,记录色谱图,详见图1。由图1可知,供试品溶液与对照品溶液在对应的位置上具有相同的色谱峰,阴性溶液在对应的位置上无色谱峰,表明在该色谱条件下阴性溶液对黄芪甲苷含量测定无干扰。

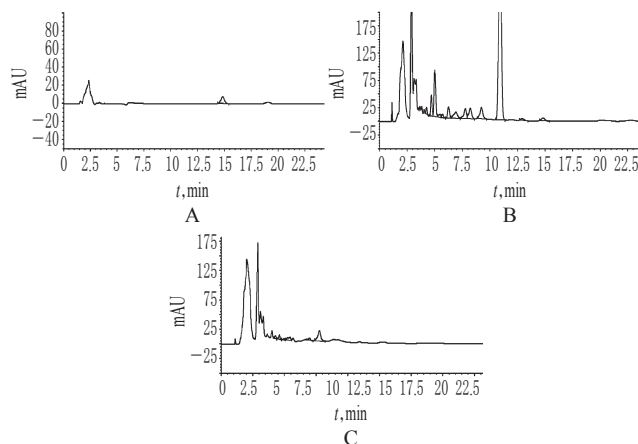


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性溶液

Fig 1 HPLC chromatograms

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

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 ml,置于不同的2 ml量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀。取上述系列浓度溶液各20 μl,注入HPLC仪,记录色谱图。以检测质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.9114x+0.4055$ ($r=0.9996$)。结果表明,黄芪甲苷检测质量浓度在0.99~9.90 μg/ml范围内与峰面积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取“2.4”项下对照品溶液取样量为0.4 ml的稀释溶液20 μl,连续进样6次,测定峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的RSD=0.19%,表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密量取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:130912)适量,分别于放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样,测定峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的RSD=1.2%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:130912)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,测定峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的RSD=0.94%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取生血宝合剂样品(批号为:130912)5.0 ml,共9份,置于不同的25 ml量瓶中,分别加入一定量的黄芪甲苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取3批生血宝合剂样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积,按外标法计算含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

待测成分	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄芪甲苷	0.632 2	0.504 9	1.139	100.4	101.1	1.86
	0.644 4	0.514 8	1.147	97.6		
	0.658 5	0.514 8	1.184	102.2		
	0.632 2	0.632 7	1.285	103.1		
	0.632 2	0.643 5	1.281	100.9		
	0.644 4	0.632 7	1.270	98.9		
	0.644 4	0.851 4	1.511	101.7		
	0.658 5	0.851 4	1.527	102.0		
	0.658 5	0.861 3	1.547	103.2		

表2 样品含量测定结果(μg/g, n=9)

Tab 2 Results of content determination of samples(μg/g, n=9)

批号	黄芪甲苷
130708	135.6
130912	131.7
121125	135.2

3 讨论

3.1 流动相的选择

参考相关文献^[4-5],笔者曾采用了不同比例的乙腈-磷酸作为流动相。结果发现,随着流动相中乙腈的增多,黄芪甲苷的保留时间不断延长,峰形不佳;而随着流动相中乙腈的减少,黄芪甲苷与相邻杂质峰的分离度不断减小,当乙腈与磷酸比例为35:65时,黄芪甲苷的峰形较好,且与相邻杂质峰能达到较好的分离,保留时间较短。故选择乙腈-0.05%磷酸(35:65, V/V)为流动相。

3.2 检测波长的选择

取黄芪甲苷对照品溶液在200~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描,结果发现,黄芪甲苷在203 nm波长处有最大吸收,且吸收稳定,基线较好,待测成分与杂质分离度较好,对测定无干扰。故选择203 nm为本试验的检测波长。

3.3 常用的检测方法

目前,黄芪甲苷的含量测定通常采用薄层扫描法、紫外分光光度法、HPLC法和荧光法等^[4-13],其中HPLC法可以以紫外-可见分光光度计^[4-5]和蒸发光散射检测器^[9-11]检测。本研究使用的色谱系统,可得到良好的峰形,且主峰与其相邻色谱峰的分离度良好,保留时间在12 min左右,主峰无拖尾现象。

综上所述,本方法简便可靠、专属性强、重复性好,可用于生血宝合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 王红英,周楠,侯静静,等.生血宝合剂对环磷酰胺所致小鼠白细胞减少症的影响[J].西北药学杂志,2012,27(1):45.
- [2] 张小平.血宝合剂治疗小儿缺铁性贫血76例[J].陕西中医,1999,20(7):305.
- [3] 孙豪栋,庞晓斌,李继扬.黄芪甲苷生物活性研究进展[J].中国药房,2011,22(7):657.
- [4] 桑明敏,何亦溪.高效液相色谱法测定补元合剂中黄芪甲

HPLC法同时测定感冒止咳颗粒中绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量

柴鑫莉*, 陈 蕾, 舒金富(衢州市食品药品检验所, 浙江衢州 324000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)40-3824-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.40.26

摘要 目的:建立同时测定感冒止咳颗粒中绿原酸、葛根素和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-pH2.6磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为327 nm(0~9 min)、250 nm(9.1~15 min)、280 nm(15.1~30 min),柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:绿原酸、葛根素和黄芩苷的检测质量浓度分别在3.7~37.5, 7.8~78.4, 15.6~155.8 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤3.41%;平均加样回收率分别为98.9%、100.6%、101.6%,RSD分别为1.51%、1.34%、2.69%($n=9$)。结论:该方法简便、快速、重复性好,可用于感冒止咳颗粒的质量控制。

关键词 高效液相色谱;感冒止咳颗粒;绿原酸;葛根素;黄芩苷

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Puerarin and Baicalin in Ganmao Zhike Granules by HPLC

CHAI Xin-li, CHEN Lei, SHU Jin-fu (Quzhou Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Quzhou 324000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, puerarin and baicalin in Ganmao zhike granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-pH2.6 phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detective wavelength was set at 327nm (0-9 min), 250 nm (9-15 min), 280 nm(15-30 min); the column temperature was at 25℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear ranges were 3.7-37.5 μg/ml for chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 7.8-78.4 μg/ml for puerarin ($r=0.999\ 9$) and 15.6-155.8 μg/ml for baicalin ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.41%. The average recoveries were 98.9% (RSD=1.51%, $n=9$), 100.6% (RSD=1.34%, $n=9$) and 101.6% (RSD=2.69%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and repeatable, which can be used for the quality control of Ganmao zhike granules.

KEYWORDS HPLC; Ganmao zhike granules; Chlorogenic acid; Puerarin; Baicalin

感冒止咳颗粒是由柴胡、山银花、葛根、青蒿、连翘、黄芩、桔梗、苦杏仁提取物与薄荷脑制成的颗粒制剂^[1],具有解表清热、止咳化痰之功效,常用于外感风热所致的感冒发热、头痛鼻塞、伤风咳嗽、喉咙肿痛等。山银花、葛根和黄芩均为感冒

止咳颗粒的主药,其有效成分分别为绿原酸、葛根素和黄芩苷。目前,关于感冒止咳颗粒成分的定性和定量分析的报道较多,但仅为单一的测定某一种成分,如测定绿原酸^[2-4]、葛根素^[5-7]、黄芩苷^[8-9]、连翘苷^[10-11]。为了更全面的保障感冒止咳颗

- 苷含量[J].浙江临床医学,2014,16(6):997.
- [5] 宋成英,封加福.HPLC同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):115.
- [6] 于维萍,孙萍.糖肾康颗粒中黄芪甲苷的含量测定[J].中国药师,2007,10(10):993.
- [7] 梁瑞雪,张新军,贾元印,等.薄层扫描法测定尘肺清颗粒中黄芪甲苷的含量[J].时珍国医国药,2006,17(9):1 689.
- [8] 王俊,冷湘静,高锦彪.HPLC同时测定参坤养血颗粒中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、丹参素和党参炔苷[J].中国药师,2014,17(7):1 138.

- [9] 冯传平,杨惠,狄庆锋,等.HPLC-ELSD法测定补肾温肺合剂中黄芪甲苷的含量[J].中国药师,2014,17(2):322.
- [10] 庞兴寿,牟晓莹.HPLC-ELSD法测定芪血通络片中黄芪甲苷的含量[J].中国药师,2011,14(2):279.
- [11] 陈晓虎.HPLC-ELSD测定补中益气颗粒中黄芪甲苷含量[J].中国现代中药,2014,16(3):229.
- [12] 邹龙,刘辉,李仲秋,等.HPLC测定补阳还五汤总苷中黄芪甲苷和芍药苷的含量[J].湖南中医药大学学报,2012,32(5):39.
- [13] 林晓莲,林丽君,张尚斌.高效液相色谱法测定复方黄连液中黄芪甲苷的含量[J].长春中医药大学学报,2010,26(1):128.

* 工程师,硕士。研究方向:药物检测。电话:0570-8358022。E-mail:chaixinli1982@gmail.com

(收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-08-28)