

HPLC-ELSD 法测定补中益气膏中黄芪甲苷的含量

★ 尧梅香 李诒光 王伟兰 郭勇 (江中药业股份有限公司 南昌 330096)

关键词:补中益气膏;黄芪甲苷;高效液相色谱法;蒸发光散射检测器

中图分类号:R 284.1 文献标识码:B

补中益气膏,功能补中益气,升阳举陷。用于脾胃虚弱,中气下陷,体倦乏力,食后腹胀,久泻,脱肛,子宫脱垂。黄芪在处方中为君药,用量最大,其有效成分为黄芪甲苷,具有较好的水溶性,而本品为水提工艺。因此拟建立本品的黄芪甲苷含量测定方法。通过方法学研究,HPLC-ELSD 法测定本品中黄芪甲苷的含量,具有准确度高、重现性好、专属性强、快捷简便等特点,可用于控制本品的内在质量。

1 仪器、试药及试剂

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-10ATvp);检测器(美国 Alltech ELSD-2000);KQ-100E 医用超声波

品溶液在 24 小时内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批号样品 6 份,精密称定,照正文中含量测定方法依法平行测定,结果穿心莲内酯平均含量为 8.707 mg/g, *RSD* 为 1.23%;脱水穿心莲内酯平均含量为 34.295 mg/g, *RSD* 为 1.71%。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的本品(批号:20050202),研细,精密称取适量,分别精密加入穿心莲内酯对照品、脱水穿心莲内酯对照品适量,照正文中含量测定方法测定,计算,结果穿心莲内酯平均回收率为 98.97%, *RSD* 为 1.34%;脱水穿心莲内酯平均回收率为 101.56%, *RSD* 为 1.62%。

2.8 阴性干扰试验 分别取穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果在选定的色谱条件下,供试品中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯与其它组分分离较好,阴性对照在相应的位置处无干扰峰。

清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ZFQ85A 旋转蒸发器(上海医械专机厂);黄芪甲苷对照品(批号为 078-200210)购自中国药品与生物制品检定所,补中益气膏(批号为:040201、040202、040203、040301、040401、040402);乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: C_{18} 4.6 mm × 250 mm, 5 μ m, 流动相:乙腈-水(35:65),流速:1.0 mL/min,柱温:室温,ELSD 漂移管温度 99.3 $^{\circ}$ C,空气流速 2.7 l/min,理论板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 5 000。

2.9 样品测定 取样品 3 批,依法测定含量,结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 /mg·片⁻¹

样品批号	穿心莲内酯含量	脱水穿心莲内酯含量	穿心莲总内酯含量	穿心莲总内酯平均含量
20050401	2.737	7.849	10.586	0.590
	2.718	7.876	10.594	
20050402	2.831	8.555	11.386	1.402
	2.895	8.523	11.418	
20050403	2.865	8.497	11.362	1.353
	2.826	8.518	11.344	

3 讨论

样品前处理时,对不同超声处理时间进行了比较,结果表明超声处理 30 分钟已提取完全,因此确定超声提取时间为 30 分钟。

《中国药典》2005 年版一部穿心莲药材含量测定项下穿心莲内酯检测波长为 225 nm,脱水穿心莲内酯为检测波长 254 nm,考虑到 225 nm 靠近末端吸收,干扰较大,故选择 254 nm 作为本品检测波长。

(收稿日期:2009-04-20 责任编辑:曹征)

3 方法与结果

3.1 供试品溶液制备

取本品约 25 g,精密称定,加甲醇 150 mL,摇匀,回流提取 4 小时,提取滤液,残渣用少量甲醇洗涤,合并滤液,回收甲醇至干,残渣加水 60 mL 超声使溶解,水溶液加水饱和正丁醇振摇提取 8 次,每次 50 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗 3 次,每次 100 mL,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

3.2 对照品溶液的制备

精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇溶解稀释制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,即得。

3.3 测定法

分别精密吸取对照品溶液 5、10、15、20 μL ,供试品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,测定,计算,即得。

3.4 样品制备方法的研究

3.4.1 回流时间考察 取本品四份,每份约 25 g,精密称定,分别加甲醇 150 mL,摇匀,第 1、2 份回流提取 4 小时,第 3、4 份回流提取 5 小时,其余步骤照 3.1 项操作,结果表明:回流 4 小时已提取完全,参考药典中黄芪的测定方法^[1]和文献^[2],确定提取时间为 4 小时。

3.4.2 正丁醇提取次数考察 取本品 6 份,每份约 25 g,精密称定,分别加甲醇 150 mL,摇匀,回流提取 4 小时,提取滤液,残渣用少量甲醇洗涤,合并滤液且回收甲醇至干,残渣加水 60 mL 超声使溶解,水溶液用水饱和正丁醇振摇提取,第 1、2 份提取 6 次,每次 50 mL,第 3、4 份提取 8 次,每次 50 mL,第 5、6 份提取 10 次,每次 50 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗 3 次,每次 100 mL,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。结果表明,正丁醇提取 8 次已完全,因此选择用正丁醇提取 8 次。

3.5 含量测定方法学研究

3.5.1 线性关系和线性范围的考察 精密称取黄芪甲苷对照品约 9 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,精密吸取 3、5、10、15、20、25、30、35 μL 进样。按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积的积分值的自然对数为纵坐标,以黄芪甲苷量的自然对数为横坐标作图,绘制标准曲线。结果表明黄芪甲苷在 1.269 ~ 14.805 μg 范围内,具有良好的线性关系。

3.5.2 精密度考察 精密吸取上述对照品溶液 20 μL ,连续进样 5 次,测定峰面积,*RSD* 为 1.72%,精密度良好。

3.5.3 稳定性考察 取本品 25 g,精密称定,按“供试品溶液制备”项下方法制成样品,分别放置 0、2、4、8、12 小时后,精密吸取 20 μL 进样,测定峰面积,*RSD* 为 3.47%,供试品在 12 小时内稳定。

3.5.4 重现性考察 取同一批号本品 5 份,按“供试品溶液制备”项下方法制成样品,并按“测定法”项下方法测定。5 次测定结果 *RSD* 为 0.6%,重现性良好。

3.5.5 回收率考察 采用加样回收法测定。取已知含量的样品,分别添加黄芪甲苷对照品,按上述色谱条件测定。得回收率平均值为 98.68%,*RSD* 为 1.17%,本方法回收率良好。

3.5.6 空白干扰试验 按工艺制备不含黄芪药材的阴性样品,按供试品溶液的制备方法制备,作为阴性对照品溶液。结果在对照品黄芪甲苷峰的出峰位置无吸收峰,证明其他药材对黄芪甲苷峰无干扰。

3.6 样品的测定

取 6 批中试样品,依法测定,结果见表 1。

表 1 样品测定结果 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	成品黄芪甲苷含量
040201	0.0484
040202	0.0501
040203	0.0492
040301	0.0324
040401	0.0299
040402	0.0305

4 讨论

考虑到本品中含有大量蜂蜜,曾采用硅藻土进行分散和吸附杂质。实验证明,加硅藻土与不加硅藻土对样品中黄芪含量的测定没有影响,为操作方便,实验过程中未加硅藻土。

本实验还对样品加乙醚洗涤进行了研究,结果发现不加乙醚对主峰没有影响,其他峰变化不大,加乙醚洗涤过的样品测定的含量偏低,所以,选择不加乙醚洗涤除杂。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005 年版)[S]. 北京: 化学工业出版社, 112.
- [2] 田南卉, 杨国红, 方颖, 等. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定黄芪和制剂中黄芪甲苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 199.

(收稿日期: 2009-02-23 责任编辑: 曹征)