

HPLC法测定竺黄喷雾剂中黄芪甲苷的含量^Δ

江霞*,刘纪青[#](深圳市中医院,广东深圳 518033)

中图分类号 R283.61;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2170-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.20

摘要 目的:建立测定竺黄喷雾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 C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(32:68, V/V,用磷酸调pH=3),流速为1.0 ml/min,检测波长为200 nm。结果:黄芪甲苷的进样量在1.0~10.0 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为99.80%,RSD=1.89%($n=6$)。结论:该方法简便、准确、重复性好、回收率高,可用于竺黄喷雾剂中黄芪甲苷的含量测定。
关键词 竺黄喷雾剂;黄芪甲苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Astragaloside IV in Zhuhuang Spray by HPLC

JIANG Xia, LIU Ji-qing(Shenzhen Hospital of TCM, Guangdong Shenzhen 518033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of astragaloside IV in Zhuhuang spray. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Zorbax C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water(32:68, V/V, pH adjusted to 3 with phosphoric acid) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 200 nm. RESULTS: The linear range of astragaloside IV were 1.0-10.0 μg($r=0.999\ 8$) with average recovery of 99.80%(RSD=1.89%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible with good recovery rate, and it can be used for the content determination of astragaloside IV in Zhuhuang spray.

KEY WORDS Zhuhuang spray; Astragaloside IV; HPLC; Content determination

竺黄喷雾剂是深圳市中医院的院内制剂,由天竺黄、黄芪、鱼腥草、木香、薄荷、两面针等组成,功能主治为清热化痰、通络利咽,用于治疗急、慢性咽炎,急、慢性喉炎与急、慢性扁桃体炎,疗效较好。黄芪为竺黄喷雾剂的主要药味之一。现代药理研究表明,黄芪能增强体液免疫功能,并具有广谱的抗病毒作用,可以降低炎症递质水平,促进病毒诱生和自身诱生干扰素的能力,能防止流感病毒的侵犯,对水疱性口腔溃疡病毒、辛德毕斯病毒、柯萨奇病毒均有较好的对抗作用^[1-2]。黄芪含有多种化学成分,如皂苷类、黄酮类、多糖类等,其中黄芪甲苷为黄芪的主要成分之一,也是含黄芪的复方制剂质量检定的指标成分,结构为三萜皂苷。因此,本试验采用高效液相色谱(HPLC)法测定竺黄喷雾剂中黄芪甲苷的含量,以用于竺黄喷雾剂的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括LC-10AT型泵、SPD-10A型紫外检测器(日本岛津公司);N2000型色谱工作站(浙江大学);BP 211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ5200DE型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

^Δ 基金项目:深圳市科技计划资助项目(No.201103388)

* 主管中药师。研究方向:中药调剂、中药鉴定、制剂质量标准。电话:0755-88359666-3306

[#] 通信作者:主任中药师。研究方向:中药制剂质量标准。电话:0755-88359666-3165。E-mail:liuqing5710@sina.com

1.2 药品与试剂

竺黄喷雾剂(批号:20120706、20120707、20120708)及缺黄芪的阴性样品均由深圳市中医院制剂室提供;黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号:110781-2001112);乙腈(色谱纯,美国天地公司);其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(32:68, V/V,用磷酸调pH=3);流速:1.0 ml/min;检测波长:200 nm;柱温:室温;灵敏度:0.1 AUFS。在该色谱条件下,黄芪甲苷的保留时间约为18 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定黄芪甲苷对照品5 mg,置于10 ml量瓶中,加乙腈-水(32:68, V/V)溶解并稀释至刻度,制备成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取本品^[3]20 ml,用水饱和的正丁醇振摇提取4次,每次25 ml,合并正丁醇提取液,用水洗涤2次,每次15 ml,弃去水液,正丁醇层用无水硫酸钠脱水,滤过,滤液置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解转移至2 ml量瓶中并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取除黄芪外的其他处方量药材,按制备工艺制备缺黄芪的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 标准曲线的制备

精密吸取对照品溶液2、5、10、15、20 μl ,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得黄芪甲苷的回归方程为 $y=1.308\ 9x+6.372\ 7$ ($r=0.999\ 8, n=5$)。结果表明,黄芪甲苷的进样量在1.0~10.0 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 专属性试验

分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明,阴性对照在黄芪甲苷色谱峰相同保留时间处无对应色谱峰出现,表明阴性对照对供试品的含量测定无干扰。色谱见图1。

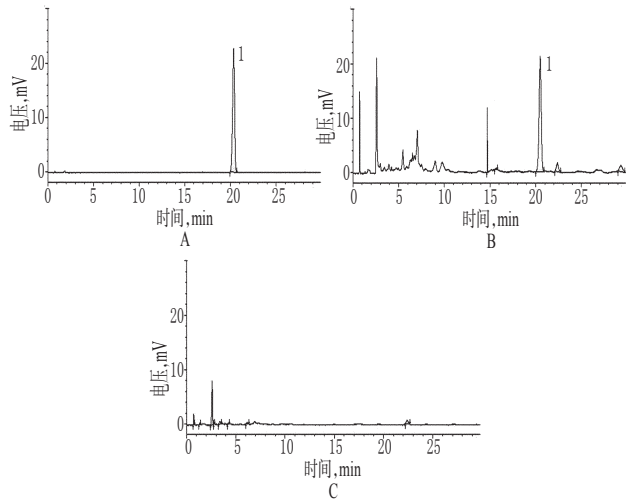


图1 高效液相色谱图

A. 黄芪甲苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 黄芪甲苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. astragaloside IV control; B. test sample; C. negative control; 1. astragaloside IV

2.5 精密度试验

取对照品溶液适量,连续进样6次,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果, $RSD=1.25\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20110901)适量,按上述色谱条件分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果, $RSD=1.42\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密量取同一批(批号:20110901)样品20 ml,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,样品中黄芪甲苷的平均质量浓度为0.254 3 mg/ml, $RSD=1.83\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的同一批(批号:20110901)竺黄喷雾剂,共6份,每份10 ml,分别加入0.5 mg/ml的对照品溶液5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量和加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

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

序号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$, %	RSD, %
1	2.574 9	2.500 0	5.034 1	98.37		
2	2.550 9	2.500 0	5.064 1	100.53		
3	2.624 6	2.500 0	5.106 8	99.29	99.80	1.89
4	2.517 8	2.500 0	5.004 1	99.45		
5	2.541 3	2.500 0	5.078 6	101.49		
6	2.583 7	2.500 0	5.075 9	99.69		

2.9 样品含量测定

取3批竺黄喷雾剂样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照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质量浓度,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(mg/ml, $n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples (mg/ml, $n=3$)

批号	黄芪甲苷质量浓度	$\bar{x}$
20110901	0.260 9	
20110902	0.270 5	0.264 9
20110903	0.263 2	

3 讨论

黄芪含有十几种皂苷类成分,以黄芪甲苷含量最高,黄芪甲苷为其主要有效成分^[4]。因此,笔者选其作为质控指标,采用HPLC法测定竺黄喷雾剂中黄芪甲苷的含量,并参照2010年版《中国药典》黄芪项下的提取方法^[2],有效地去除了其他皂苷的干扰。

笔者参考相关文献^[9],采用乙腈-水(50:50, V/V)为流动相对黄芪甲苷进行含量测定,但发现主峰与其他组分色谱峰的分离效果不很理想。后经反复试验,确定以乙腈-水(32:68, V/V)为流动相,所得供试品色谱峰峰形良好,保留时间适中,与其他组分能达到基线分离,且分离度好。

取黄芪甲苷对照品适量,以乙腈-水(32:68, V/V)溶解,在150~300 nm 波长范围内进行紫外扫描。结果表明,波长越长,噪声越小,但灵敏度也随之降低。综合这两个因素,最终选择200 nm为检测波长。

综上,本方法简便、准确、重复性好、回收率高,可用于竺黄喷雾剂中黄芪甲苷的含量测定。

参考文献

[1] 史婉璐,王红秋.黄芪化学成分及药理作用综述[J].黑龙江科技信息,2012(15):52.
[2] 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,2010:283.
[3] 潘涛,文晓柯,欧阳波,等.胎乐颗粒中黄芪甲苷的提取工艺研究[J].中国医药导报,2012,9(7):170.
[4] 宋平顺,卫玉玲,赵建邦,等.HPLC-ELSD测定黄参胶囊中黄芪甲苷的含量[J].中成药,2008,30(4):附5.
[5] 许保海,臧琛,张宏伟.3种方法制备的胃肠复原汤中黄芪甲苷含量的比较[J].中国药房,2012,23(15):1 411.

(收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-04-16)