

图 1 羟基红花黄色素 A 对照品(A)和注射用红花黄色素(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of hydroxy safflower yellow A reference substance (A) and Safflower Yellow Injection

羟基红花黄色素 A 极性较强,强酸性,具有亲水性,根据反相离子对 HPLC 理论,可采用含有四丁基氢氧化铵离子的流动相,羟基红花黄色素 A 在流动相中与四丁基氢氧化铵离子生成不带电荷的中性离子,增加了非极性固定相中的溶解度,使分配系数增加,改善分离效果。加入磷酸盐是采用离子抑制色谱法,加入磷酸盐是作为抑制剂,调节 pH 值,抑制组分的分离,增加中性分子存在的几率。

在乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钾溶液-10%四丁基氢氧化铵溶液(170:800:15)为流动相,用磷酸调 pH 时,当 pH 5.5 时,图谱分离比较好。

乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液-10%四丁基氢氧化铵溶液(170:800:15)为流动相,用磷酸调 pH 5.5 时,改变磷酸二氢钾的浓度。当磷酸二氢钾为 0.05 mol/L 时,图谱分离比较好。

当 10%四丁基氢氧化铵溶液为 20 mL 时,图谱分离比较好。

采用乙腈作为有机调节剂,流动相的黏度较低,有利于色谱分析。乙腈比例降低,各组分的保留均增加。乙腈比例变化对主峰的保留影响最大,乙腈比例由 17%降至 12%,主峰的保留时间由 11 min 增至 58 min。在本色谱系统中,为同时兼顾色谱选择性和分析时间等因素,乙腈比例定为 17%。

本实验所采用的流动相具有足够的缓冲容量,在线性范围测定过程中,羟基红花黄色素 A 的色谱峰形不随其变化而变化,色谱峰形均正常。

References:

[1] Zhu M, Guo Z X. Determination of the safflower yellow A in *Carthamin tinctorius* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2000, 23 (8): 458-459.
 [2] Yang X J, Wu G R, Wang Y. Studies of extraction methods of utility portion in *Carthamus tinctorius* [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2005, 28 (1): 45-47.
 [3] Zhao M B, Deng X L, Wang Y L, et al. Determination of hydroxy safflower yellow A in *Carthamus tinctorius* L. by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2003, 21 (6): 593-595.

薄层扫描法测定胃康胶囊中人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁

马莉¹, 唐健元¹, 李祖伦¹, 肖小河², 廖庆文³, 冯少华²

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039; 3. 湖南中医学院, 湖南 长沙 410007)

胃康胶囊为临床经验方,由人参、藿香、白扁豆、甘草等中药组成,具有补脾益胃、化湿浊、和止呕的作用,临床用于治疗小儿脾虚湿蕴之吐泄不止,不思饮食。方中以人参为君药,人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 均为其特征的有效成分。为保证成品质量,本实验建立了双波长薄层扫描法测定胃康胶囊中人参

皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的测定方法。

1 仪器与试剂

瑞士 CAMAG TLC Scanner—3; 瑞士 CAMAG ATS-4 自动点样机;恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司);AE163 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);高效硅胶 G 薄层板(青岛

收稿日期:2005-07-24

作者简介:马莉(1977—),女,四川崇州人,助理研究员,在读博士,研究方向为中药学。

Tel: (010) 63246736 E-mail: marytjy66@yahoo.com.cn

海洋化工厂); 人参皂苷 Rb₁ 对照品(批号 704—2000115)、人参皂苷 Rg₁ 对照品(批号 0703—9611)均购自中国药品生物制品检定所; 试剂均为分析纯; 实验药材均购自四川成都五块石中药材市场, 经成都中医药大学鉴定教研室鉴定, 符合《中国药典》要求。胃康胶囊(规格为 0.3 g/粒, 自制)。

2 方法与结果

2.1 测定条件

2.1.1 扫描条件: 双波长扫描法; $\lambda_s=540\text{ nm}$, $\lambda_R=700\text{ nm}$; 狭缝: $6.00\text{ nm}\times 0.45\text{ mm}$; $SX=3$; 扫描速度: 20 mm/s 。

2.1.2 色谱条件: 展开剂: 氯仿-甲醇-水(13:7:2); 显色剂: 10% 硫酸乙醇溶液。

2.2 对照溶液的制备: 精密称取 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥至恒重的人参皂苷 Rb₁ 对照品 10.1 mg、Rg₁ 对照品 10.2 mg, 加甲醇溶解定容至 10 mL, 制成含人参皂苷 Rb₁ (1.01 mg/mL)、人参皂苷 Rg₁ (1.02 mg/mL) 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取胃康胶囊去囊壳内容物 1.0 g, 置具塞三角瓶中, 加甲醇 30 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 滤液水浴挥干, 残渣分别加水 20 mL, 正丁醇溶液 15 mL 溶解, 定量转移至分液漏斗中, 静置分层, 分取正丁醇提取液, 水层继续用水饱和和正丁醇萃取, 合并提取液, 用浓氨试液洗涤 2 次, 弃去下层液, 减压回收正丁醇, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.4 扫描波长的选择: 取对照品溶液 3 μL , 点于硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(13:7:2)下层液为展开剂, $10\text{ }^\circ\text{C}$ 以下展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, $105\text{ }^\circ\text{C}$ 显色约 5 min, 封板, 采用钨灯在人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 斑点中心, $400\sim 700\text{ nm}$ 波长内进行扫描。结果人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对照品斑点均在 540 nm 处有最大吸收, 故选择扫描波长 $\lambda=540\text{ nm}$ 。

2.5 标准曲线的制备: 精密吸取上述对照品溶液 1、2、3、4、5 μL , 分别点于同一硅胶 G 板上, 以氯仿-甲醇-水(13:7:2)下层液为展开剂, $10\text{ }^\circ\text{C}$ 以下展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, $105\text{ }^\circ\text{C}$ 显色约 5 min, 封板, 按上述条件测定。以峰面积对进样量进行回归, 得回归方程: 人参皂苷 Rb₁: $Y=1278.9 X+66.699$ ($r=0.9996$); 人参皂苷 Rg₁: $Y=3795.4 X+109.58$ ($r=0.9995$), 人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁ 在 $1.0\sim 5.0\text{ }\mu\text{g}$, 均有良好的线性关系。

2.6 阴性干扰的考察: 取缺人参的处方, 按工艺制成阴性制剂, 按供试品溶液的制备方法操作, 制备缺人参阴性对照。取供试品溶液、对照品溶液及缺人参阴性对照, 分别点于同一硅胶 G 板上, 展开, 显色, 540 nm 下薄层扫描。结果缺人参阴性对照在人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对照品斑点相应位置无斑点, 扫描图谱无干扰。

2.7 精密度考察

2.7.1 同板精密度试验: 精密吸取人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对照品溶液, 在同一硅胶 G 薄层板上点 5 点, 每点 2 μL , 展开, 晾干, 显色, 扫描, 测定峰面积积分值, 结果 RSD 分别为 2.51% 和 3.04%。

2.7.2 异板精密度试验: 精密吸取人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对照品溶液 2 μL , 在 5 块薄层板上点样, 展开, 晾干, 显色, 扫描, 测定峰面积积分值, 结果 RSD 分别为 3.01% 和 2.97%。

2.8 稳定性试验: 吸取供试品溶液 3 μL , 对照品溶液 2、4 μL 交叉点样, 展开, 取出, 晾干、显色、封板, 每 30 min 扫描 1 次, 扫描 5 次, 测定峰面积积分值, 结果人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 的 RSD 分别为 3.15% 和 2.97%。

2.9 重现性试验: 取同一批号样品(批号 040616), 精密称取 5 份, 制备供试品溶液, 测定, 结果人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 的质量分数的 RSD 分别为 3.12% 和 2.75%。

2.10 加样回收率试验: 精密称取批号为 040616 的样品 5 份, 每份约 0.5 g, 分别加入 2 mL 人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的混合对照品溶液(人参皂苷 Rb₁: 1.406 mg/mL, 人参皂苷 Rg₁: 1.980 mg/mL), 制备供试品溶液, 点样 3 μL , 对照品溶液 2、4 μL 交叉点样, 测定峰面积, 计算回收率。结果人参皂苷 Rb₁ 的平均回收率为 99.672%, RSD 为 2.39% ($n=5$), 人参皂苷 Rg₁ 的平均回收率为 100.606%, RSD 为 3.74% ($n=5$)。

2.11 样品测定: 取胃康胶囊成品 3 批, 各 3 份, 每份约 1.0 g, 制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液、阴性对照各 3 μL , 对照品溶液 2、4 μL 交叉点样, 展开, 取出, 晾干, 显色, 封板, 测定峰面积积分值, 按外标两点法计算, 结果见表 1。胃康胶囊质量控制指标为: 人参皂苷 Rb₁ 应不少于 1.50 mg/粒, 人参皂苷 Rg₁ 应不少于 2.00 mg/粒。

3 讨论

薄层扫描法测定人参皂苷的文献报道较多, 常用的展开系统有氯仿-正丁醇-甲醇-水(20:40:

表 1 胃康胶囊中的人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{g1} (n=3)

Table 1 Results of determination for ginsenosides R_{b1} and R_{g1} in Weikang Capsules (n=3)

批号	人参皂苷 R _{b1} / (mg · 粒 ⁻¹)	RSD / %	人参皂苷 R _{g1} / (mg · 粒 ⁻¹)	RSD / %
040614	2.01	2.43	2.57	1.98
040616	1.98	1.94	2.60	2.01
040618	1.96	1.58	2.58	2.00

10 : 20); 正丁醇-醋酸乙酯-水 (4 : 1 : 5); 氯仿-醋

酸乙酯-甲醇-水 (15 : 40 : 22 : 10); 氯仿-甲醇-水 (13 : 7 : 2)。在胃康胶囊测定方法研究过程中, 发现展开系统氯仿-甲醇-水 (13 : 7 : 2) 较氯仿-醋酸乙酯-甲醇-水 (15 : 40 : 22 : 10) 分离效果更好, 斑点更圆整, 所以选用该系统为分离条件。

薄层显色过程中, 显色剂 10% 硫酸乙醇溶液的用量不可过大, 以免扫描时背景颜色过深, 影响实验结果。

HPLC-ELSD 法测定益气糖康胶囊中黄芪甲苷

向 静¹, 陈 勇^{1*}, 熊富良², 王玉巧²

(1. 湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062;

2. 湖北省中药现代化工程技术研究中心, 湖北 武汉 430052)

益气糖康胶囊由绞股蓝、黄芪、葛根等组成, 具有益气养阴、温阳活血等作用, 主要用于气阴两虚症糖尿病的辅助治疗。黄芪为方中君药, 其主要成分有皂苷、多糖、氨基酸等, 具有促进免疫反应等活性。为了有效控制益气糖康胶囊中黄芪甲苷的内在质量, 本实验参考有关文献报道^[1,2], 采用 HPLC-ELSD 测定法对本制剂中黄芪甲苷进行了测定。

1 实验材料

1.1 仪器: 日本岛津 10A 高效液相色谱仪; HW-2000 色谱工作站 (2.11 版); SEDEX75 型 ELSD 检测仪。

1.2 药品: 益气糖康胶囊 (武汉健民科研所提供, 批号分别为 20040701、20040702、20040703); 黄芪甲苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0781-9807); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromasil-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C, 甲醇-水 (80 : 20) 为流动相; 体积流量为 1.0 mL/min; ELSD 条件: 漂移管温度 40 °C, 氮气压为 3.5 × 10⁵ Pa。理论塔板数以黄芪甲苷峰计不低于 3 000, 色谱图见图 1。

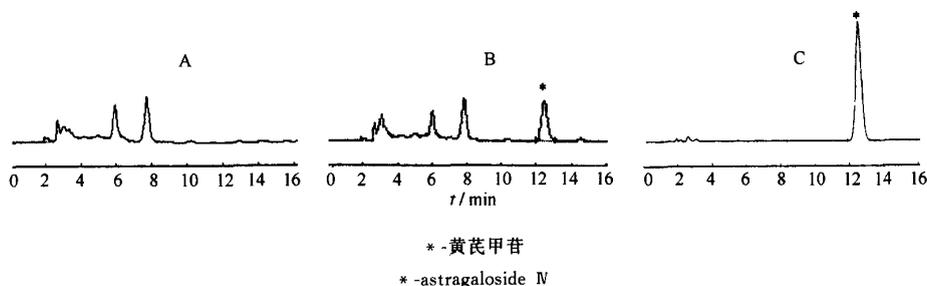


图 1 阴性样品(A)、益气糖康胶囊(B)和黄芪甲苷对照品(C)的 HPLC 图

Fig.1 HPLC Chromatograms of negative sample (A), Yiqi Tangkang Capsules (B), and astragaloside IV reference substance (C)

2.2 供试品溶液的制备: 取益气糖康胶囊约 5 g 研细, 精密称定后加甲醇溶液 50 mL 超声提取 1 h, 滤过并将滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使之溶解, 用水饱和的正丁醇振荡萃取 3 次 (每次 25 mL), 合并正

丁醇提取液, 接着用氨试液洗涤两次 (每次 25 mL), 弃去氨溶液, 将正丁醇溶液蒸干, 残渣加热水 10 mL 溶解, 放冷后通过 D-101 大孔吸附树脂柱 (内径 1.5 cm, 长 12 cm), 用 80 mL 水淋洗树脂柱并弃去淋洗