

HPLC-ELSD 法测定参麦注射液中薯蓣皂苷元

罗晓玲, 邵 青, 瞿海斌*, 程翼宇

(浙江大学药学院 中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310027)

参麦注射液由红参和麦冬提取制成, 具有益气固脱、养阴生津、生脉等功能, 用于休克、冠心病、病毒性心肌炎、慢性肺心病、粒细胞减少症。能提高肿瘤病人的免疫机能, 与化疗药合用时, 有一定的增效减毒作用^[1]。《中国药典》2005 年版一部中参麦注射液的质量标准以人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 为指标。皂苷类成分是麦冬中的主要活性成分之一, 具有多种生理活性^[2]。对总皂苷的分析会受到糖类等大极性物质的干扰, 而薯蓣皂苷元是麦冬中皂苷的主要母核之一, 因此本实验采用 HPLC-ELSD 法对参麦注射液酸水解后产生的薯蓣皂苷元进行测定, 为参麦注射液的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪 (Agilent 公司), Alltech 2000 型 ELSD 检测器 (美国奥泰公司), AE240 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), Buchi 旋转蒸发仪 (Buchi 公司)。

乙腈、甲醇 (Merck 公司, 色谱纯), 水为纯水, 其余试剂均为分析纯试剂; 薯蓣皂苷元对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号 1539-200001; 参麦注射液由正大青春宝药业有限公司提供。缺麦冬的阴性对照为按照正大青春宝药业有限公司的制剂工艺自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Agilent Zorbax SB C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (90 : 10); 体积流量: 0.7 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; ELSD 漂移管温度: 85 $^{\circ}$ C; 氮气流量: 1.5 L/min; 进样量: 20 μ L。

2.2 供试品溶液制备: 取参麦注射液 6 mL, 加 10% H_2SO_4 溶液 10 mL、石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) 20 mL, 置 80 $^{\circ}$ C 水浴回流水解 1 h, 转入分液漏斗中, 石油醚萃取。分取石油醚层, 水层加石油醚 20 mL 回流水解 30 min, 重复以上操作两次。合并石油醚层, 用 2 mol/L 碳酸钠溶液 15 mL 洗涤一次, 分取石油醚层,

50 $^{\circ}$ C 减压浓缩至干。残渣置 1 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 并加至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。同法制备缺麦冬的阴性对照溶液。

2.3 对照品溶液的制备: 取薯蓣皂苷元对照品约 6 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品储备液。精密吸取薯蓣皂苷元储备液 1 mL 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得 25.0 μ g/mL 薯蓣皂苷元对照品溶液。

2.4 线性关系考察: 精密吸取薯蓣皂苷元对照品溶液 5、10、20、30、40、50 μ L, 进样测定薯蓣皂苷元的峰面积, 以进样量质量的对数对峰面积的对数进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1.59 X + 3.28$, $r = 0.9984$ 。结果表明, 薯蓣皂苷元在 0.125~1.25 μ g 内呈良好的线性关系。

2.5 专属性试验: 精密吸取缺麦冬的阴性对照溶液、参麦注射液进样测定, 缺麦冬的阴性对照溶液、薯蓣皂苷元对照品溶液和参麦注射液供试品溶液的色谱图见图 1, 结果表明参麦注射液中其他成分对薯蓣皂苷元的测定无干扰。

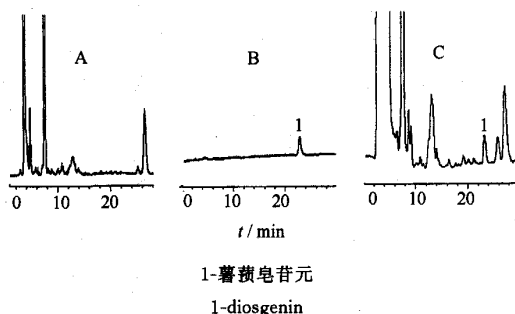


图 1 阴性对照溶液(A)、薯蓣皂苷元对照品溶液(B)和参麦注射液供试品溶液(C)的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig.1 HPLC-ELSD Chromatograms of negative sample (A), diosgenin reference substance (B), and Shenmai Injection (C)

2.6 精密度试验: 精密吸取薯蓣皂苷元对照品溶液连续进样 6 次, 分别测峰面积, 结果其 RSD 为

收稿日期: 2006-10-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2005CB523402)

作者简介: 罗晓玲 (1982—), 女, 浙江杭州人, 硕士研究生, 研究方向为药物分析及中药单体的代谢组学研究。

Tel: (0571)88207096 E-mail: zjuxiaoling@126.com

* 通讯作者: 瞿海斌 Tel: (0571)87952509

2.61%。

2.7 重现性试验:分别平行取批号为0506171参麦注射液6份,制备供试品溶液,进样测定,结果薯蓣皂苷元质量浓度的RSD为2.53%。

2.8 稳定性试验:取同一供试品溶液(批号为0506171),分别在0、2、4、6、8 h进样测定,结果薯蓣皂苷元质量浓度的RSD为3.20%,表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.9 加样回收率试验:精密量取批号为0506171的样品3 mL,6份,分别精密加入薯蓣皂苷元对照品11.27 μg ,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果平均加样回收率为101.5%,RSD为3.12%。

2.10 样品测定:取不同批号参麦注射液,制备供试品溶液,进样测定,利用标准曲线法计算质量浓度,结果见表1。

表1 参麦注射液中薯蓣皂苷元的测定结果($n=2$)

Table 1 Determination of diosgenin in Shenmai Injection ($n=2$)

批号	薯蓣皂苷元/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
0506171	3.93
0512102	4.63
0512071	4.19
0512082	4.18
0511293	3.01

3 讨论

薯蓣皂苷元无紫外特征吸收,无法使用紫外检测器检测。ELSD为通用检测器,其信号响应与被测物的质量成正比,而不依赖于被测物的光学特性,它对无紫外吸收或仅有紫外末端吸收的物质如糖类、皂苷类、甾类等均有较好响应,故选ELSD为检测器。

水解用酸种类选择:本试验考察相同浓度盐酸和硫酸溶液的水解效果,发现虽盐酸水解较温和,但所需时间较长,且水解不易完全,所以选用硫酸水解法。

硫酸浓度考察:在其他条件相同情况下,分别考察

体积分数为5%、10%、15%、20%硫酸对水解的影响,发现10%硫酸水解所得薯蓣皂苷元的质量浓度最高,并且体积分数过大时薯蓣皂苷元的质量浓度下降。

水解时间及方式考察:据文献报道^[3~4],利用两相水解法可以避免皂苷元脱水,在较短时间内水解较完全,增加得率,故选择两相水解法水解。考察10%硫酸连续水解1、1.5、2 h及分次水解1、0.5、0.5 h对结果的影响,发现分次水解时水解得到的薯蓣皂苷元质量浓度最高,再增加水解时间和次数,薯蓣皂苷元的质量浓度不再增加。

色谱条件优化:实验考察了甲醇-水、乙腈-水作为流动相系统,发现甲醇-水(90:10)作为流动相时的分离效果较好。比较了20、30、40 $^{\circ}\text{C}$ 的柱温,发现柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ 时既不影响分离,又可以缩短时间,较为理想。

ELSD参数优化:比较了80、85、90 $^{\circ}\text{C}$ 漂移管温度及1、1.5、2 L/min氮气体积流量,发现漂移管温度为85 $^{\circ}\text{C}$,氮气体积流量为1.5 L/min时,ELSD响应较好,且基线噪音也相对较小,所以选择漂移管温度为85 $^{\circ}\text{C}$,氮气体积流量为1.5 L/min。

References:

- [1] Long X, Wan L Y. Defference between Shengmai Injection and Shenmai Injection [J]. *Tradit Chin Med J* (中医药通报), 2004, 3 (4): 42-43.
- [2] Lin X, Zhou Q F, Xu D S. Research progress of the pharmacological actions of *Ophiopogon* root [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2004, 38 (6): 59-611.
- [3] Dou S H, Xia C D, Fu T J, et al. Studies on hydrolysis conditions of total saponins in *Dioscorea nipponica* Makino [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22 (9): 608-610.
- [4] Wang J, Chen J, Yang K D, et al. Study on the production condition of extraction in combination hydrolysis in situation for isolating diosgenin [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28 (10): 934-937.

欢迎订阅《中草药》杂志 2001—2006 年增刊

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家科技部同意,我部从1996年起,每年出版增刊一册。

2001年第32卷增刊 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程,我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。共收载论文140多篇。

2002年第33卷增刊 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容,收载论文107篇。

2003年第34卷增刊 包括中药创新药物开发的思路和方法;中药现代化研究;有关中药知识产权保护和中药专利的申请等内容,共收载论文176篇。

2004年第35卷增刊 以“新技术在中药现代化中的应用”为主要内容,共收载论文120篇。

2005年第36卷增刊 以中药现代化和中药走向国际等热点为主要内容,共收载论文150余篇。

2006年第37卷增刊 以药理会议专栏及中药现代化和国际化,包括药材资源种植和可持续利用、提取工艺技术、质量控制、疗效评价、中药理论和中药产业管理现代化等方面内容,共收载论文135篇,摘要88篇。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强,欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行,邮局订阅《中草药》不含增刊,但能提供订阅凭证者,购买增刊7折优惠,款到寄刊。