

HPLC 法测定芪葛颗粒中黄芪甲苷

徐忠坤, 徐海娟, 宋 娟, 萧 伟*

江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定芪葛颗粒中黄芪甲苷的方法。方法 色谱柱: Agilent Zorbax-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (33:67); 柱温: 30 ℃; 体积流量: 1 mL/min; Waters 2420 蒸发光散射检测条件: 漂移管温度: 43 ℃; 雾化器温度: 35 ℃; 氮气压力: 172 kPa。结果 共测 10 批样品, 黄芪甲苷质量分数在 1.10~1.95 mg/袋。结论 本法方便、快速、准确, 可用于测定芪葛颗粒的质量控制。

关键词: 芪葛颗粒; 黄芪甲苷; D₁₀₁ 大孔树脂; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** B **文章编号:** 0253-2670(2011)01-0094-02

Determination of astragaloside in Qige Granula by HPLC

XU Zhong-kun, XU Hai-juan, SONG Juan, XIAO Wei

Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Key words: Qige Granula; astragaloside; D₁₀₁ macroporous resin; HPLC; evaporative light scattering detection

芪葛颗粒是治疗神经根型颈椎病的 6 类中药新药, 处方由黄芪、葛根、桂枝、威灵仙、白芍、菊花等 8 味药组成^[1]。黄芪为方中君药, 黄芪甲苷是该药材的主要有效成分。原质量标准仅仅采用薄层扫描法, 操作繁琐, 影响因素多, 重现性较差。因此本实验参考相关文献报道^[2-5], 采用 HPLC-ELSD 法检测芪葛颗粒中黄芪甲苷, 并进行了方法学考察, 结果表明, 此法精密度、重现性良好, 回收率试验结果符合要求, 测定迅速、准确, 为制定该制剂专属性的质量控制标准提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, Waters 2420 蒸发光散射检测器, Eemper 色谱工作站; D₁₀₁ 大孔吸附树脂柱 (内径 1.5 cm, 长 12 cm)。

芪葛颗粒 (江苏康缘药业股份有限公司, 规格 10 g/袋)、黄芪甲苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0781-200210); 乙腈 (色谱纯), 水 (超纯水), 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent Zorbax-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (33:67); 柱温: 30 ℃;

体积流量: 1 mL/min; Waters 2420 蒸发光散射检测条件: 漂移管温度: 43 ℃; 雾化器温度: 35 ℃; 氮气压力: 172 kPa。在上述条件下, 理论板数以黄芪甲苷峰计算大于 3 000, 分离度、拖尾因子符合规定。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷适量, 精密称定, 加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 1 袋约 10 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加热水 50 mL, 振摇使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次 (60、40、40、40 mL), 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 3 次, 每次 40 mL, 弃去氨液, 回收正丁醇至干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 通过 D₁₀₁ 大孔吸附树脂柱 (内径 1.5 cm, 长 12 cm), 以水 50 mL 洗脱, 弃去水液。再用 40% 乙醇 50 mL 洗脱, 弃去 40% 乙醇洗脱液, 继用 70% 乙醇 150 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 用甲醇溶解并移至 2 mL 量瓶内, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 按处方组成, 取除黄芪外的其余药材和辅料按工艺要求制成缺黄芪的

收稿日期: 2010-08-03

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2009ZX09313-032)

作者简介: 徐忠坤 (1979—), 男, 黑龙江省宁安市人, 工程师, 2003 年毕业于黑龙江中医药大学中药学专业, 现就读于南京中医药大学中药专业研究生进修班, 从事中药新药研发与中药新工艺、新技术研究。Tel: 13812344975 E-mail: hfh1919@sina.com

*通讯作者 萧 伟 E-mail: wzzh-nj@tom.com

阴性样品, 同供试品溶液的制备项下方法制得阴性供试品溶液。

2.3 空白试验

精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液各 5 μ L, 注入高效液相色谱仪, 测定, 结果表明, 阴性供试品对黄芪甲苷峰无干扰。见图 1。

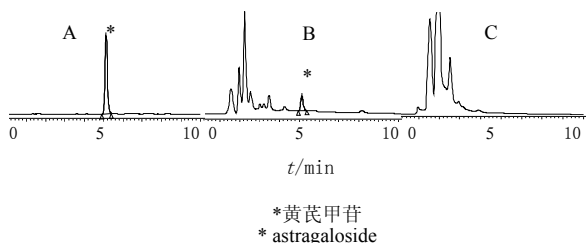


图 1 黄芪甲苷对照品 (A)、芪葛颗粒 (B) 和缺黄芪的阴性样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of astragaloside reference substance (A), Qige Granula (B), and negative sample without *Astragali Radix* (C)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取 1.012 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μ L 注入液相色谱仪, 按照上述色谱条件进行试验。以进样质量的对数为横坐标, 峰面积的对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 1.6904X + 5.7801$, $r = 0.9990$, 结果表明黄芪甲苷在 1.012~10.12 μ g 时进样量的对数与峰面积的对数呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取 1.012 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液 4 μ L, 重复进样 6 次, 测定黄芪甲苷峰面积, 计算, 结果其 RSD 为 2.10%。

2.6 稳定性试验

取本品 (批号 081201) 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 5 μ L 注入液相色谱仪, 测定黄芪甲苷峰面积, 结果 RSD 为 2.17%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验

取本品 (批号 081201) 5 份, 制备供试品溶液, 进行测定, 计算黄芪甲苷的质量分数, 结果表明黄芪甲苷平均质量分数为 1.09 mg/袋, RSD 为 2.19%。

2.8 加样回收率试验

取本品 (批号 081201), 称取 5 份, 每份约 5 g, 精密称定, 分别精密加入 0.58 mg/mL 黄芪甲苷对照品 1 mL, 制备供试品溶液, 进行测定, 计算得平均

加样回收率为 96.89%, RSD 为 1.58%。

2.9 样品测定

取 10 批芪葛颗粒成品, 每批 2 份, 制备供试品溶液。分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 2、5 μ L, 供试品溶液 5 μ L, 注入液相色谱仪, 进行测定。结果见表 1。根据 10 批样品中黄芪甲苷的测定结果, 初步拟定为本品含黄芪甲苷不得低于 1.0 mg/袋。

表 1 芪葛颗粒中黄芪甲苷的测定结果

Table 1 Determination of astragaloside in Qige Granula

批 号	黄芪甲苷/(mg·袋 ⁻¹)
081206	1.11
081207	1.20
081209	1.10
081211	1.81
081213	1.82
081222	1.95
081223	1.26
090105	1.12
090106	1.18
090107	1.14

3 讨论

因为黄芪甲苷仅在紫外区末端 (200 nm 附近) 有弱吸收, 受试剂影响大, 故采用蒸发光散射检测器, 克服黄芪甲苷在紫外检测器上易受干扰的缺陷; 同时本实验采用峰面积的自然对数对质量浓度的自然对数作标准曲线, 线性关系良好。

供试品溶液的制备方法, 一般采用甲醇提取后正丁醇提取再用碱液洗去杂质的方法。笔者经过实验对比考察表明, 加热水振摇使溶解, 用水饱和和正丁醇振摇提取 4 次, 氨水洗涤 3 次, 能较完全地将黄芪甲苷提取出来。

参考文献

- [1] 吴青业, 周恩丽, 付小环, 等. HPLC-ELSD 法测定芪葛口服液 中 黄 芪 甲 苷 [J]. 中 草 药, 2010, 41(8): 1305-1306.
- [2] 刘玮锦, 蔡大可, 刘亮锋, 等. HPLC 测定当归补血片中黄芪甲苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1554-1555.
- [3] 陆 益, 黎远冬, 梁宁生, 等. 高效液相色谱法测定复方华蟾胶囊中黄芪甲苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1773-1777.
- [4] 朱虹云, 徐文峰, 刘帅英. HPLC-ELSD 法测定补血颗粒中黄芪甲苷 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1247-1249.
- [5] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, et al. Effects of astragaloside IV derivative on heart failure in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 48-53.