

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.12.009

高效液相色谱法测定肝精补血素口服液中党参炔苷含量

张 宪, 李 岳[△]

(北京市药品检验所·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立测定肝精补血素口服液中党参炔苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 醋酸(22:78, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 267 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 党参炔苷进样量在 37.72~565.80 ng($r=0.9995$)范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 96.52%, RSD 为 1.60% ($n=6$), 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%。结论 该方法操作简便、准确, 精密度、稳定性、重复性均良好, 可用于测定肝精补血素口服液中党参炔苷的含量。

关键词:肝精补血素口服液; 党参炔苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)12-0032-03

Content Determination of Lobetyolin in Ganjing Buxuesu Oral Liquid by HPLC

ZHANG Xian, LI Yue

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of lobetyolin in Ganjing Buxuesu Oral Liquid. **Methods** The chromatography column was Agilent C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.4% acetic acid(22:78, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 267 nm, the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μL. **Results** The lobetyolin showed good linearity in the range of 37.72-565.80 ng($r=0.9995$), the average recovery rate was 96.52%, RSD was 1.60% ($n=6$). RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%. **Conclusion** The method is simple and accurate, it has good precision, stability and repeatability, which can be used for the content determination of lobetyolin in Ganjing Buxuesu Oral Liquid.

Key words: Ganjing Buxuesu Oral Liquid; lobetyolin; HPLC; content determination

肝精补血素口服液由党参、枸杞子、肝精膏、枸橼酸铁铵、维生素 B₁ 等组方, 质量标准收录于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第十三册)》中, 临床主要用于缺铁性贫血的治疗, 具有补肝肾、强筋骨的作用^[1-2]。方中党参为君药, 具有补益脾胃、养血生津的作用^[3]。但原质量标准较简单, 未对其进行质量控制。党参的主要药效活性成分为党参炔苷和党参多糖^[4-6], 本研究中参考药典党参药材鉴别项下党参炔苷的鉴别^[7-8]和相关报道^[9-11], 建立高效液相色谱(HPLC)法测定肝精补血素口服液中党参炔苷的含量, 为该制剂质量标准的修订和改进提供试验依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪, 包括全自动进样器, Agilent Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司); ME403 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

肝精补血素口服液(开封康诺药业有限公司, 批号分别为 H17012, H18031, H18061, 规格为每支 10 mL); 党参炔苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111732-201107, 含量≥98%); 大孔树脂 D101(国药集

团化学试剂公司, 批号为 30266071); 乙腈为色谱纯, 甲醇、醋酸、磷酸、乙醇、正丁醇均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4% 醋酸(22:78, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 267 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

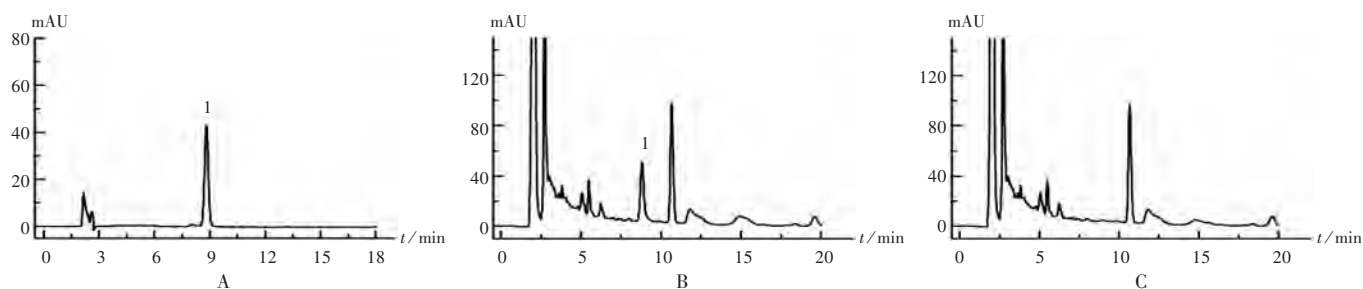
对照品溶液: 称取对照品 9.43 mg, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 作为对照品贮备溶液; 精密吸取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 即得对照品溶液(每 1 mL 含党参炔苷 37.72 μg)。

供试品溶液: 精密量取样品 20 mL, 置分液漏斗中, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 5 mL 使溶解, 过大孔树脂柱(高 12 cm, 内径 1.5 cm), 用水 50 mL 洗脱, 弃去水液, 用 30% 乙醇 50 mL 洗脱, 弃去 30% 乙醇洗脱液, 再用 50% 乙醇 100 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 按样品处方工艺制备缺党参药材的阴性样品, 同供试品溶液制备方法制备, 即得。

第一作者: 张宪, 男, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事中药和保健食品检测工作, (电子信箱) zhangxian@bidc.org.cn。

[△]通信作者: 李岳, 男, 主管药师, 主要从事中药活性成分分析工作, (电话) 010-83221212(电子信箱) iloveloheh@sina.com。



1. 党参炔苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。理论板数按党参炔苷峰计应不低于8000,分离度均大于1.5,基线分离良好。

线性关系考察:分别精密量取对照品溶液1,2,5,10,15 μL 。按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以党参炔苷进样量(X, ng)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.5863X + 6.9253$, $r = 0.9995$ ($n = 5$)。结果表明,党参炔苷进样量在37.72 ~ 565.80 ng范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取对照品贮备液适量,按拟订色谱条件以不同进样体积连续进样测定6次,记录峰面积。结果进样1 μL 时的RSD为3.12% ($n = 6$),进样5 μL 时的RSD为1.35% ($n = 6$),进样15 μL 时的RSD为0.83% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批号为H18031)适量,分别于室温下放置0,1,2,4,8,12,24 h时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.24% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:称取样品(批号为H18031)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果的RSD为1.05% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为H18031)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的党参炔苷对照品溶液,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,平行3次,记录峰面积,计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 供试品制备方法选择

预试验中采用3种方法制备供试品溶液:1)精密量

表1 党参炔苷加样回收试验结果($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.111 20	0.113 16	0.219 20	95.44	96.52	1.60
0.111 20	0.113 16	0.220 10	96.24		
0.111 20	0.113 16	0.218 70	95.00		
0.111 20	0.113 16	0.219 60	95.79		
0.111 20	0.113 16	0.221 50	97.47		
0.111 20	0.113 16	0.223 40	99.15		

表2 样品中党参炔苷含量测定结果(g/L , $n = 3$)

批号	含量		
	1	2	$\bar{X}$
H17012	0.011 1	0.011 3	0.011 2
H18031	0.011 1	0.010 9	0.011 0
H18061	0.010 5	0.011 1	0.010 8

取样品20 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加甲醇25 mL,超声30 min,滤过,精密吸取滤液3 mL,加甲醇定容至25 mL,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。
2)精密量取样品20 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,过大孔树脂柱,用水50 mL洗脱后,再用30%乙醇50 mL洗脱,弃去洗脱液,继续用50%乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液蒸干,残渣用甲醇定容至5 mL,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。
3)精密量取样品20 mL,置分液漏斗中,用水饱和的正丁醇萃取3次,每次30 mL正丁醇液蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,过大孔树脂柱,用水50 mL洗脱后,再用30%乙醇50 mL洗脱,弃去洗脱液,继续用50%乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液蒸干,用甲醇溶解并定容至5 mL,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。结果发现,第3种方法适用于本试验中的含量测定,因党参炔苷属皂苷类化合物,需要采用正丁醇提取才可提取完全,直接超声方法虽可测得,但党参炔苷峰面积较小,而直接过大孔树脂柱,党参炔苷无色谱峰出现。

3.2 流动相和检测波长选择

预试验中分别采用乙腈-水,乙腈-0.4%醋酸,甲醇-0.5%磷酸溶液作为流动相进行考察,结果发现,以