

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.037

高效液相-蒸发光散射法测定芪归益母膏中黄芪甲苷含量

熊有明¹, 崔虹², 熊学庆¹

(1. 重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404000; 2. 重庆市万州区中医院, 重庆 404000)

摘要:目的 建立测定芪归益母膏中黄芪甲苷含量的高效液相-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(33:67, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测器为蒸发光散射检测器。结果 黄芪甲苷进样量在 0.236~2.362 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999$); 平均回收率为 95.31%, RSD 为 1.18% ($n=9$)。结论 该方法测定结果准确、稳定, 灵敏度高, 重复性好, 可用于该制剂中黄芪甲苷的含量测定。

关键词:芪归益母膏; 黄芪甲苷; 含量测定; 高效液相-蒸发光散射法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)09-0123-03

Determination of Astragaloside IV in Qigui Yimu Cream by HPLC-ELSD

XIONG Youming¹, CUI Hong², XIONG Xueqing¹

(1. Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 404000; 2. Wanzhou District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, China 404000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography evaporative light-scattering detector(HPLC-ELSD) method for the determination of astragaloside IV in Qigui Yimu Cream. **Methods** The chromatographic column Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) the mobile phase was acetonitrile-water(33:67, V/V), and the flow rate was 1.0 mL/min, and the detector was evaporative light-scattering detector. **Results** The astragaloside IV showed good linear relationship in the range of 0.236-2.362 μg($r=0.9999$); the average recovery rate was 95.31%, RSD was 1.18% ($n=9$). **Conclusion** The method is accurate, stability, higher sensitivity and the reproducibility is good, which can be used for the determination of astragaloside IV in Qigui Yimu Cream.

Key words: Qigui Yimu Cream; astragaloside IV; determination; high-performance liquid chromatography evaporative light-scattering detector

芪归益母膏是重庆市万州区中医院研制的医院制剂,由黄芪、当归、益母草、白芍4味中药组方,具有益气养血、调经止痛作用,主要用于治疗月经不调及痛经等症。黄芪为方中君药,味甘,性微温,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌的功效。皂苷类是黄芪的主要活性成分,以黄芪甲苷为代表,为黄芪药材的质量控制指标^[1],具有降压消炎、镇静镇痛作用,能影响血清和肝脏蛋白质合成。该制剂现行质量标准只有鉴别和通则检查项,不能有效控制其质量。为提高芪归益母膏质量的可控性和稳定性,保证临床用药安全,本研究中参照2015年版《中国药典(一部)》及文献[1-6],采用高效液相-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定芪归益母膏中黄芪甲苷的含量,为该制剂的质量控制提供定量检测方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括LC-20AT型输液泵,ELSD-LT II型蒸发光散射检测器,CTO-20A型柱温箱,SIL-20A型自动进样器,LCsolution色谱工作站;XP204型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为0.1 mg);ME215S型电子天平(德国赛多利斯集团,精度为0.01 mg)。

1.2 试药

黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110781-201314,含量为95.8%);芪归益母膏(重庆市万州区中医院供,批号分别为20190605,20190829,20191029);D101型大孔吸附树脂,正丁醇、氨水、乙醇均为分析纯,均购自成都科龙化工试剂厂;乙腈(色谱纯,德国Merck公司);水为纯化水(自制)。

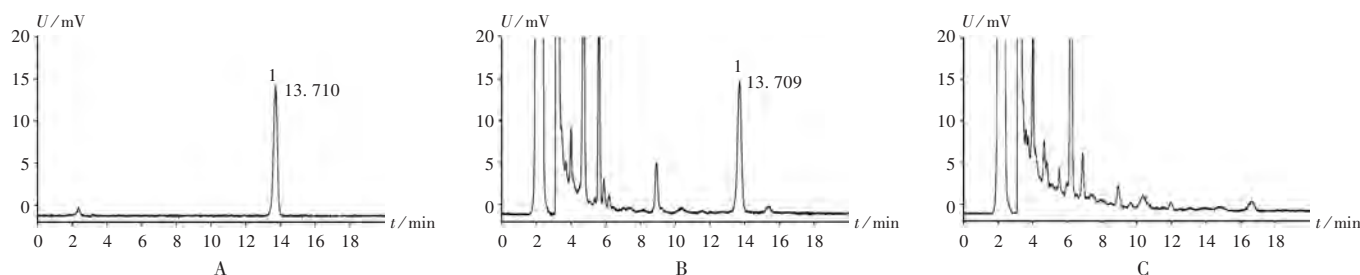
2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2-6]与系统适用性试验

色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(33:67, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:20 μL;蒸发光散射检测器(ELSD)参数:氮气压力为325 kPa,漂移管温度为40℃,增益为6。分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各20 μL,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件测定,色谱图见图1。黄芪甲苷峰理论板数不低于5000,分离度均大于1.5。可见,阴性对照品对黄芪甲苷的测定无干扰,且黄芪甲苷和其他组分可达到基线分离。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取黄芪甲苷对照品10.27 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液3.0 mL,



1. 黄芪甲苷

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

置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液^[1]:取本品 2 g,精密称定,置 250 mL 分液漏斗中,加 20 mL 水溶解,用水饱和正丁醇提取 5 次,每次 20 mL,合并正丁醇,用正丁醇饱和的氨试液洗涤 2 次,每次 40 mL,再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 40 mL,蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,通过 D101 型大孔吸附树脂(内径为 1.2 cm,柱高为 10 cm),以水 30 mL 洗脱,弃去水液,再用 70% 乙醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

阴性对照品溶液:按处方(不含黄芪)及本品工艺制备阴性样品,按供试品溶液项下方法制备,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取黄芪甲苷对照品贮备液 0.6, 1.5, 3.0, 4.0, 6.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 11.81, 29.52, 59.03, 78.71, 118.06 mg/L 的系列对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液各 20 μ L, 注入高效液相色谱仪,按拟定色谱条件进样测定,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.4405X + 6.1011$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在 0.236 ~ 2.362 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取对照品溶液(质量浓度为 59.03 mg/L) 20 μ L, 重复进样 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.89% ($n = 6$),表明仪器精密良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 20190605)样品,依法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样测定。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 0.25% ($n = 7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为 20190605)样品,依法制备供试品溶液,平行 6 份,分别进样测定,计算黄芪甲苷的含量。结果平均含量为 0.210 mg/g, RSD 为 0.82% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品 9 份,精密称定,每份 1 g,置 250 mL 分液漏斗中,以 3 份为 1 组,每组分

别精密加入黄芪甲苷对照品贮备液 0.5, 1.0, 1.5 mL, 依法制备供试品溶液,计算加样回收率。结果见表 1。

表1 黄芪甲苷回收加样试验结果($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.218	0.098	0.311	94.90	95.31	1.18
0.220	0.098	0.312	93.88		
0.219	0.098	0.314	96.94		
0.217	0.197	0.406	95.94		
0.216	0.197	0.402	94.42		
0.222	0.197	0.407	93.91		
0.221	0.295	0.504	95.93		
0.215	0.295	0.496	95.25		
0.224	0.295	0.509	96.61		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,各精密吸取 20 μ L,按拟定色谱条件进样测定。结果批号为 20190605, 20190829, 20191029 的样品中黄芪甲苷平均含量分别为 0.220, 0.210, 0.200 mg/g。

3 讨论

3.1 检测器选择

黄芪甲苷在紫外区只有吸收度很小的末端吸收,灵敏度很差,故参照 2015 年版《中国药典(一部)》方法(蒸发光散射检测法)对芪归益母草膏中黄芪甲苷的含量进行测定。

3.2 供试品提取

供试品经水饱和正丁醇提取后,考察了水洗(正丁醇饱和的水)和碱洗(正丁醇饱和的氨试液)对含量测定的影响。结果表明,碱洗含量明显高于水洗,故选择碱洗。

3.3 流动相选择

考察了甲醇-水,乙腈-水不同体系流动相,结果发现以乙腈-水为流动相时,黄芪甲苷响应度强,峰形好,优化条件后,确定乙腈-水(33:67, V/V)为流动相。

3.4 方法评价

采用 HPLC-ELSD 法测定芪归益母草膏中黄芪甲苷的含量,受主客观因素的干扰较小,准确、简便,重复性好,可作为芪归益母草膏的定量分析方法。该医院制剂临