

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)10-0068-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.10.017



高效液相色谱法测定复方黄芪健脾口服液中黄芪甲苷含量*

王 铮, 吕益涛[△], 蒋倩倩, 滕泽学, 强君丽

(甘肃省白银市药品检验检测中心, 甘肃 白银 730900)

摘要:目的 建立测定复方黄芪健脾口服液中黄芪甲苷含量的高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法。方法 色谱柱为 Agilent 5 HC-C₁₈(2)柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(34:66, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40℃, 进样量为 20 μL, 蒸发光散射器漂移管温度为 40℃, 压缩空气压力为 350 kPa。结果 黄芪甲苷进样量在 0.97~9.70 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 6$, $n=5$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%, 平均加样回收率为 99.78%, RSD 为 0.98% ($n=9$)。结论 该方法操作简便, 结果准确、可靠, 重复性好, 可用于复方黄芪健脾口服液中黄芪甲苷的含量测定。

关键词: 复方黄芪健脾口服液; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器; 黄芪甲苷; 含量测定

Content Determination of Astragaloside IV in Compound Huangqi Jianpi Oral Liquid by HPLC

WANG Zheng, LYU Yitao, JIANG Qianqian, TENG Zexue, QIANG Junli

(Baiyin Municipal Center for Drug Inspection and Testing, Baiyin, Gansu, China 730900)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) method for the content determination of astragaloside IV in Compound Huangqi Jianpi Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was Agilent 5 HC-C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (34:66, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 20 μL. ELSD was adopted, the drift tube temperature was 40℃, and the compressed air pressure was 350 kPa. **Results** The linear range of astragaloside IV was 0.97-9.70 μg ($r=0.999\ 6$, $n=5$). The RSDs of the precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery of astragaloside IV was 99.78% with an RSD of 0.98% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable and repeatable, which can be used for the content determination of astragaloside IV in Compound Huangqi Jianpi Oral Liquid.

Key words: Compound Huangqi Jianpi Oral Liquid; HPLC; ELSD; astragaloside IV; content determination

复方黄芪健脾口服液由黄芪、莱菔子、白术、山楂、山药、桑叶、大枣等药材组方, 有益气固表、健脾消食功效, 对小儿脾胃虚弱引起的反复呼吸道感染、营养性贫血、厌食等病症疗效显著。黄芪甲苷属皂苷类成分, 是制剂中君药黄芪的主要成分, 也是《中国药典》2020年版一部中黄芪中药材的质量控制指标^[1], 具有抗炎、抗肝纤维化、抗氧化、抗哮喘、降血糖、免疫调节、心肌保护等多重作用^[2-3], 因此选取黄芪甲苷含量作为该口服液的质量控制指标。该制剂现行地方标准^[4]所用薄层色谱法已不能有效满足其质量控制, 而《中国药典》2020年版一部收载含黄芪的中药成方制剂质量控制方法均改为高效液相色谱(HPLC)法。本研究中参考药典中黄芪含量测定项下方法及文献^[5-14], 建立了测定复方黄芪健脾口服液中黄芪甲苷含量的高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法, 简化了前处理步骤, 缩短了测定周期, 提高了检验结果的准确度, 可为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪, 包括CTO-10ASVP柱温箱、LC-20AT泵、SIL-20A自动进样器、AA-530空气压缩机、ELSD-LTⅡ蒸发光检测器、CBM-20A控制器(日本Shimadzu公司); PL-FS 80T型数控超声波清洗器(东莞康士洁超声波科技有限公司); XPE-105DU型及EL204-IC型电子天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司, 精度分别为0.01 mg和0.1 mg); HHS-4S型电子恒温不锈钢水浴锅(上海市南阳仪器有限公司)。

1.2 试药

复方黄芪健脾口服液(兰州佛慈制药股份有限公司, 批号分别为20031, 20033, 20048); 黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为110781-202118, 含量96.8%); 大孔吸附树脂D101(上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号为C11417836); 甲醇、乙腈为色

*基金项目: 甘肃省药品科研项目[2020GSMPA023]。

第一作者: 王铮, 男, 大学本科, 工程师, 研究方向为药品检验检测, (电子信箱)1181799978@qq.com。

[△]通信作者: 吕益涛, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品、化妆品检验及实验室管理, (电子信箱)342314378@qq.com。

谱级,无水乙醇、氨水为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent 5 HC - C₁₈(2)柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(34:66, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:40℃;进样量:20 μL;蒸发光散射检测器漂移管温度:40℃;压缩空气压力:350 kPa。

2.2 溶液制备

取黄芪甲苷对照品 12.53 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加 80% 甲醇制成质量浓度为 0.485 2 mg/mL 的对照品溶液。精密量取样品 20 mL,加氨水 20 mL 后摇匀静置 5 min,通过 D101 型大孔吸附树脂(内径为 1.5 cm,柱高为 20 cm),分别用氨试液 100 mL,水 100 mL,40% 乙醇 100 mL 洗脱,弃去洗脱液,用 70% 乙醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加 80% 甲醇溶解,移至 5 mL 容量瓶中,加 80% 甲醇定容,即得供试品溶液。按复方黄芪健脾口服液的处方和工艺制备缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

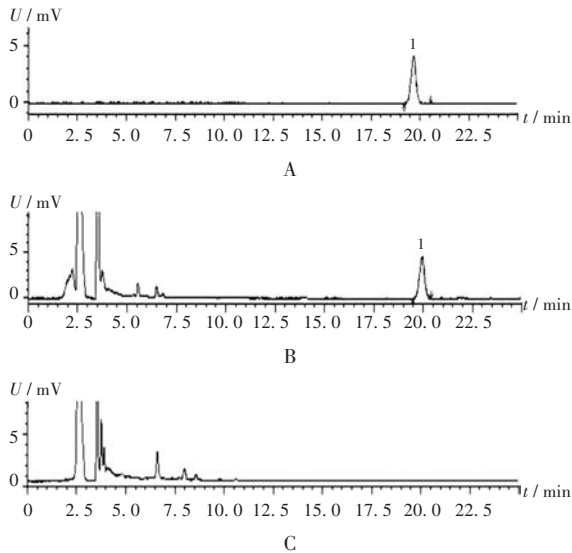
系统适用性试验与专属性试验:取 2.2 项下 3 种溶液各 20 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处出现相应色谱峰,理论板数按黄芪甲苷峰计为 25 870,分离度均大于 1.5,基线分离良好;阴性对照品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。详见图 1。

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下对照品溶液适量,加 80% 甲醇稀释成每 1 mL 中分别含 0.048 5,0.121 3,0.242 6,0.363 9,0.485 2 mg 黄芪甲苷系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以黄芪甲苷进样量(μg)的对数值(X)为横坐标、峰面积的对数值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.5855X + 4.2645$ ($r = 0.9996, n = 5$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在 0.97 ~ 9.70 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限考察:取线性关系考察项下质量浓度为 0.048 5 mg/mL 的对照品溶液适量,加 80% 甲醇倍比稀释,以信噪比(S/N)为 10:1 时待测成分质量浓度为定量限,结果黄芪甲苷的定量限为 3.64 ng/mL。

精密度试验:取 2.2 项下对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 0.56% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,分别在



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

1. Astragaloside IV

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

室温下放置 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.82% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 20031)适量,共 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果黄芪甲苷含量的平均值为 34.50 μg/mL, RSD 为 1.20% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取样品(批号为 20031)10 mL,共 9 份,分别加入质量浓度为 0.485 0 mg/mL 的对照品溶液 0.6, 0.7, 0.8 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表 1。

表1 加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.345 0	0.291 1	0.629 6	97.77		
0.345 0	0.291 1	0.636 2	100.03		
0.345 0	0.291 1	0.635 1	99.66		
0.345 0	0.339 6	0.682 3	99.32		
0.345 0	0.339 6	0.686 6	100.59	99.78	0.98
0.345 0	0.339 6	0.685 2	100.18		
0.345 0	0.388 1	0.731 1	99.48		
0.345 0	0.388 1	0.738 3	101.34		
0.345 0	0.388 1	0.731 8	99.67		

2.4 样品含量测定

取3批样品各20 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。另取3批样品,按现行质量标准中样品前处理方法制备,精密量取样品50 mL,加入水饱和正丁醇30 mL振摇,提取4次,合并正丁醇液,加入氨试液40 mL洗涤2次,弃去氨试液,正丁醇液蒸干,加水5 mL溶解,放冷,通过D101型大孔吸附树脂(内径为1.5 cm,柱高为12 cm),加水50 mL、40%乙醇30 mL洗脱,弃去洗脱液,用70%乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,加甲醇溶解残渣后转移至2 mL容量瓶中,即得供试品溶液^[4],精密吸取4 μ L和8 μ L,再取2.2项下对照品溶液2 μ L和4 μ L,交叉点于同一硅胶G薄层板,以氯仿-甲醇-水(13:6:2, V/V/V)10 $^{\circ}$ C以下设置过夜的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,显色,在530 nm和700 nm波长处测定供试品溶液和对照品溶液吸光度,计算黄芪甲苷含量。结果见表2。可见,HPLC-ELSD法测定的结果精密度更高。现行含量测定标准中规定黄芪甲苷的含量为不得少于20 μ g/mL,由测定结果可知,分析方法的改变对限度标准无影响。

表2 2种方法测定黄芪甲苷含量结果比较($n=3$)

Tab. 2 Results of the content determination of astragaloside IV by two methods ($n=3$)

批号	HPLC-ELSD法		薄层扫描法	
	含量(μ g/mL)	RSD(%)	含量(μ g/mL)	RSD(%)
20031	34.50		28.39	
20033	33.19	1.97	26.44	7.34
20048	34.08		30.62	

3 讨论

3.1 前处理过程优化

黄芪中黄芪甲苷的来源包括黄芪甲苷衍生物的转化及游离的黄芪甲苷,两者总和为黄芪甲苷的总含量。因此,黄芪中黄芪甲苷含量与黄芪甲苷衍生物转化的程度有关,黄芪甲苷衍生物在碱的作用下被水解,转化为游离黄芪甲苷,有利于准确测定黄芪甲苷的含量^[15]。

赖先荣等^[16]采用在供试品中加入NaOH至体积分数为5%,然后加入水饱和正丁醇进行萃取,再依次加5%NaOH溶液、水洗涤供试品,调节正丁醇溶液的酸碱度至中性的方式纯化供试品。贾晓斌等^[17]的研究结果表明,正丁醇萃取法和大孔吸附树脂法纯化后的指纹图谱有一定差异,但黄芪总皂苷得率接近,表明2种纯化方法除去的杂质有一定差异。可知,除杂、纯化过程的关键在于碱化溶液的使用、饱和正丁醇萃取及大孔树脂吸附步骤。

在前处理时加入的氨水或氨试液,可将黄芪醇类

皂苷酯氨解为黄芪甲苷^[18],使得黄芪甲苷从络合态转变为游离态^[19-20]。本研究结果表明,氨水及氨试液洗脱可有效除去复方黄芪健脾口服液中的酸性杂质。由此,设计本试验中直接将氨水与口服液充分混匀后用大孔树脂柱分离,再用氨试液洗脱,与现行含量测定标准(萃取后用碱液对提取物进行洗脱处理)方法相比,省去了萃取这一不稳定步骤,前处理时间8 h缩短至约3 h,不但提高了效率,同时也提高了供试品测定的准确度及精密度。

3.2 检测器选择

制剂现行地方标准中采用了薄层色谱法测定黄芪甲苷含量,步骤烦琐,费时费力,仅供试品前处理就需耗时8 h以上,且测定结果重复性差。ELSD法几乎无流动相溶剂干扰,对被测成分无特定的化学结构要求,尤其适用于黄芪甲苷此类无特定吸收波长,紫外末端吸收的情况,故2015年版《中国药典》以后收录的含中药黄芪的中药成方制剂质量控制方法均改用HPLC法,测定结果准确可靠,重复性好。

3.3 方法评价

本研究中建立的HPLC-ELSD法在前处理时简化了原地方标准中供试品前处理步骤,将氨水直接与口服液混合后进行大孔吸附树脂洗脱,省去了萃取步骤,大幅缩短了测定时间,操作简便,且方法专属性强,精密度高,重复性良好,可用于该产品的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:315-316.
- [2] CHU C, QI LW, LI B, et al. Radix Astragali (Astragalus): Latest Advancements and Trends in Chemistry, Analysis, Pharmacology and Pharmacokinetics [J]. Current Organic Chemistry, 2010, 14(16):1792-1807.
- [3] LI L, HOU XJ, XU RF, et al. Research review on the pharmacological effects of Astragaloside IV [J]. Fundamental and Clinical Pharmacology, 2017, 31(1):17-36.
- [4] WS-5541(B-0541)-2002, 国家药品监督管理局国家药品标准[S].
- [5] 卢伟,孙晓敏,孙佳佳,等. 2种黄芪甲苷含量测定方法的比较[J]. 中医临床研究, 2016, 8(2):43-45.
- [6] 王继明,陈丽娜,杜芳,等. 黄芪甲苷含量测定研究进展[J]. 中医药学报, 2019, 47(2):120-125.
- [7] 王庆学,韩琳. HPLC法测定脑血疏口服液黄芪甲苷的含量[J]. 中国当代医药, 2016, 23(33):137-139.
- [8] 罗丹,罗国安,陈丽,等. HPLC-ELSD测定得力生注射液的黄芪甲苷的含量[J]. 中药与临床, 2014, 5(6):21-23.
- [9] 隆旭红,金文丽. HPLC-ELSD法测定养血饮口服液黄芪甲苷的含量[J]. 卫生职业教育, 2015, 33(16):82-83.
- [10] 陈丽湘,叶贵堂,何孝金. HPLC-ELSD测定升白口服液中