

黄芪注射液定性定量方法的改进

简龙海, 闻宏亮, 夏 晶, 王 柯, 季 申*
(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要:目的 改进黄芪注射液薄层色谱 (TLC) 鉴别方法和黄芪甲苷测定方法。方法 TLC 方法中增加黄芪对照药材和毛蕊异黄酮-7-O- β -D 葡萄糖苷对照品指标。定量测定方法中, 采用高效液相色谱仪-蒸发光散射器 (HPLC-ELSD) 直接测定样品。色谱柱为 C_{18} 色谱柱, 流动相为甲醇-水 (70:30)。结果 可增加黄芪对照药材和毛蕊异黄酮-7-O- β -D 葡萄糖苷对照品两个鉴别对照。黄芪甲苷进样量在 0.404 μ g ~ 16.16 μ g 范围内线性关系良好 ($r = 0.9985$); 平均回收率 ($n = 9$) 为 98.6%, RSD 为 1.9%。结论 该方法专属性强, 灵敏度高, 简便快速, 准确可靠。

关键词: 黄芪注射液; 薄层色谱; 黄芪甲苷; 含量测定; 方法改进

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-4528(2011)10-2018-03

黄芪注射液由黄芪单味药材制备而得, 其现行标准为国家药品监督管理局国家药品标准修订批件 2001ZFB0171 所附质量标准, 标准中有薄层鉴别项和黄芪甲苷含量测定项, 但薄层鉴别项的对照中仅有黄芪甲苷对照品, 无黄芪对照药材; 根据制法, 样品中应有黄酮类成分, 但标准中未鉴别, 故薄层鉴别方法专属性不强。定量测定项中, 现行标准方法采用将供试液蒸干、再用甲醇溶解进行样品的浓缩, 前处理时间较长。关于文献报道的含量测定方法, 大多繁琐、耗时^[1-3], 或者测定批数较少^[4-11], 样品代表性不强, 或者采用末端吸收波长 (205 nm) 测定样品^[12], 灵敏度低。为更专属、快速、灵敏地控制产品质量, 本实验对薄层鉴别项增加黄芪对照药材和毛蕊异黄酮-7-O- β -D 葡萄糖苷对照品, 对黄芪甲苷定量测定项采用 HPLC-ELSD 直接测定法, 并测定 9 个厂家的 246 批样品, 为黄芪注射液质量标准的提高提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Varian 380-LC ELSD (美国 Varian 公司); CAMAG Digis-tore 薄层色谱数码相机成像系统 (瑞士 CAMAG 公司); BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂 黄芪甲苷 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 0781-200210); 黄芪对照药材 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 120974-200407); 毛蕊异黄酮-7-O- β -D 葡萄糖苷 (北京某研究中心提供); 甲醇 (色谱纯, 美国 Merck 公司); 水为纯净水。黄芪注射液 (9 个厂家 246 批)。

2 方法与结果

2.1 鉴别试验

2.1.1 薄层鉴别 (1) 取本品 3 mL, 加水 25 mL, 用水饱和的正丁醇振荡提取 2 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取黄芪对照

药材 2 g, 加水 100 mL, 煎煮 1 h, 4 000 r/min 离心 3 min, 上清液浓缩至 2 mL, 加乙醇 20 mL, 搅匀, 每分钟 4 000 转离心 3 min, 上清液蒸干, 残渣加水 30 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振荡提取 2 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液 30 mL 洗涤 1 次, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。再取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-甲醇-水 (13:7:2) 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显一个相同的蓝色荧光主斑点。再喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 日光下显相同的棕褐色斑点; 紫外光灯 (365 nm) 下显相同的橙黄色荧光斑点。结果见图 1。

2.1.2 薄层鉴别 (2) 取毛蕊异黄酮-7-O- β -D 葡萄糖苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取对照品溶液、2.1 项下的对照药材溶液、2.1 项下的供试品溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以二氯甲烷-甲醇-水 (13:7:2) 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 在与对照药材色谱相应的位置上, 至少显一个相同颜色的斑点。结果见图 2。

2.2 定量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Waters Atlantis dC₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 cm); 流动相为甲醇-水 (70:30); ELSD (蒸发室: 90 $^{\circ}$ C; 雾化室: 50 $^{\circ}$ C; 气流: 1.00 SLM); 体积流量: 1.0 mL/min。理论板数以黄芪甲苷峰计应

收稿日期: 2011-02-21

作者简介: 简龙海 (1978—), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向: 中药分析。Tel: (021) 38839900-26603, E-mail: jianjlh@hotmail.com

* 通信作者: 季 申 (1963—), 女, 主任药师。Tel: (021) 38839900-26601

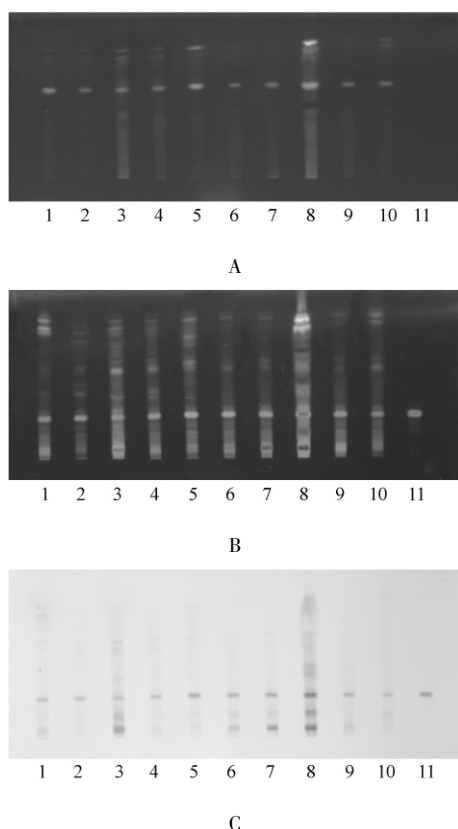


图 1 黄芪注射液的薄层鉴别(1)

A. 置紫外光灯(254 nm)下检视 B. 置紫外光灯(365 nm)下检视 C. 置可见光下检视 1-4. 供试品(生产厂家编号 A-D) 5. 黄芪对照药材 6-10. 供试品(生产厂家编号 E-I) 11. 黄芪甲苷对照品

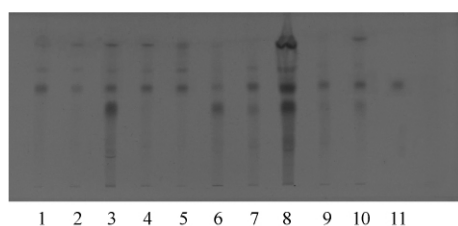


图 2 黄芪注射液的薄层鉴别(2)

1-4. 供试品(生产厂家编号 A-D) 5. 黄芪对照药材 6-10. 供试品(生产厂家编号 E-I) 11. 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品

不低于 15 000。在该色谱条件下,黄芪甲苷与其它成分基线分离,见图 3。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品作为供试品溶液。

2.2.4 测定法 精密吸取对照品溶液 4、8、16 μL,供试品溶液 5~10 μL,注入液相色谱仪,测定,以外标三点法对方程计算,即得。

2.2.5 线性关系考察 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1.01 mg 的溶液,作为对照品溶液(1)。再精密吸取该溶液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每 1 mL 含 0.202 mg 的溶液,作为对照品溶液

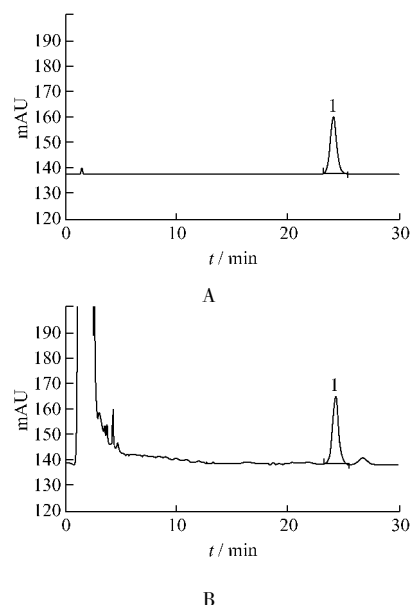


图 3 黄芪甲苷对照品(A)、供试品(B,厂家编号 G) HPLC 色谱图

1. 黄芪甲苷

(2)。分别精密吸取上述对照品溶液(2) 2、4、8、12、16、20 μL 和对照品溶液(1) 8、12、16 μL,各进样测定 2 次,记录峰面积,以进样量的对数值为横坐标,以 2 次测定的峰面积平均值的对数值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $Y = 1.205 X + 9.097$, $r = 0.9985$,结果表明:进样量在 0.404 ~ 16.16 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液(2) 2、10 μL 和对照品溶液(1) 16 μL,各连续重复进样 6 次,记录峰面积,计算峰面积的 RSD,结果 RSD 分别为 2.1%、1.7%、1.3%,表明系统精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品(厂家 A,批号 0810082),平行制备 6 份供试品溶液,分别进样 10 μL,记录峰面积,计算黄芪甲苷含量的 RSD,结果 RSD 为 1.9%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液(厂家 A,批号 0810082),分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定黄芪甲苷的含量,计算含量 RSD,结果为 2.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 回收率试验 取同一批样品(厂家 A,批号 0810082,含量为 0.15 mg/mL),精密吸取 1 mL,置 2 mL 量瓶中,一式 9 份,以 3 份为 1 组,分别精密加入黄芪甲苷对照品溶液(1) 120、150、180 μL,加水至刻度,摇匀,各进样 10 μL,记录峰面积,计算加样回收率及其 RSD,结果回收率平均值为 98.6%,RSD 为 1.9%。

2.2.10 改进方法与原方法测得结果的比较 取厂家 A~I 的样品,分别按改进方法和原方法进行测定,结果无明显差异(见表 1)。

2.2.11 样品测定 取厂家 A~I 的样品,按改进方法进行测定,并计算各个厂家不同批号的样品中黄芪甲苷含量的平均值和 RSD,结果见表 2。

表 1 黄芪注射液中黄芪甲苷测定结果比较

生产厂家 编号	批号	改进方法测得 /(mg/mL)	原方法测得 /(mg/mL)
A	200910564	0.149	0.150
B	20090203	0.101	0.103
C	090204	0.106	0.105
D	2009030401	0.156	0.170
E	0811291	0.131	0.126
F	09011952	0.237	0.250
G	090302	0.372	0.367
H	09012352	0.170	0.176
I	080414	0.169	0.181

表 2 黄芪注射液中黄芪甲苷测定结果 ($n = 246$)

生产厂家编号	批数	黄芪甲苷平均 值/(mg/mL)	RSD/%
A	59	0.140	9.8
B	20	0.114	16
C	9	0.148	14
D	26	0.194	24
E	53	0.127	16
F	15	0.219	21
G	11	0.486	22
H	35	0.152	17
I	18	0.159	23

3 讨 论

3.1 薄层鉴别 (1) 增加了黄芪对照药材和毛蕊异黄酮-7- O - β -D 葡萄糖苷对照品的鉴别,增强了方法专属性。(2) 将展开剂中三氯甲烷改为二氯甲烷,降低了毒性。

3.2 含量测定

3.2.1 色谱柱的考察 分别取 3 种色谱柱 [柱①: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 cm), 柱②: Waters Atlantis dC₁₈ 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 cm), 柱③: Dikma Kromasil C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 cm)] 进行分析,结果均峰形良好、无干扰。

3.2.2 流动相的考察 采用色谱柱②,分别以甲醇-水(68:32)、甲醇-水(70:30)、甲醇-水(72:28)、甲醇-水(73:27)、甲醇-水(75:25)为流动相进行测定,结果除厂家 G 样品外,其余厂家样品中黄芪甲苷峰均峰形良好,无干扰。厂家 G 样品在流动相含甲醇量为 68% ~ 72% 之间时,黄芪甲苷峰

与相邻峰分离度良好,在含甲醇量大于 73% 时,分离度差。该结果可能与厂家 G 在样品的制备工艺中加入聚山梨酯 80 有关。聚山梨酯 80 具有增溶作用,故厂家 G 样品中成分多、含量高。在薄层鉴别结果中亦可看到类似结果。

3.2.3 柱温和流速的考察 采用色谱柱②,流动相为甲醇-水(70:30),分别在柱温 25、30、35 $^{\circ}$ C 体积流量为 0.8、1.0、1.2 mL/min 时进样测定,结果均峰形良好、无干扰。

3.2.4 ELSD 参数的选择 ELSD 参数主要有蒸发室温度、雾化室温度、气体流速。分别对上述 3 种参数的数值大小进行摸索,结果在蒸发室 90 $^{\circ}$ C、雾化室 50 $^{\circ}$ C、气流 1.00 SLM 时,黄芪甲苷峰响应最高,重现性最好。

3.2.5 不同仪器的考察 分别以 Agilent 1100 HPLC-380 ELSD 和 Waters 2996 HPLC-2420 ELSD 进行测定,结果黄芪甲苷峰均峰形良好、无干扰。

参考文献:

- [1] 朱德领,毛黎静,杨根元. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(8): 778-779.
- [2] 鄢立新,唐卫文,付铁军,等. 不同厂家产黄芪注射液中黄芪甲苷的含量考察 [J]. 中成药, 2004, 26(8): 626-628.
- [3] 王 辰,侯连兵,刘 婵. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 中药材, 2006, 29(6): 618-619.
- [4] 钱广生,刘三康,李章万. HPLC 测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 华西药理学杂志, 2002, 17(1): 41-42.
- [5] 邵晓霞,王国团,方一清. 高效液相色谱法测定黄芪注射液中黄芪甲苷含量 [J]. 新疆医学, 2009, 39: 129-130.
- [6] 路 玫,蒙大平. 反相高效液相色谱法测定黄芪注射液中黄芪甲苷含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(4): 212-213.
- [7] 吴 江. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 青海师专学报: 教育科学, 2006, (5): 75-76.
- [8] 钱广生,刘三康,李章万. HPLC 测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 华西药理学杂志, 2002, 17(1): 41-42.
- [9] 李永吉,管庆霞,关延彬,等. HPLC 与比色法测定复方黄芪注射液中总皂苷与黄芪甲苷含量 [J]. 黑龙江医药, 2004, 17(1): 1-2.
- [10] 葛春丽. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量 [J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(14): 143-144.
- [11] 郭成华. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定黄芪注射液中黄芪甲苷含量 [J]. 上海医药, 2001, 22(2): 83-84.
- [12] 姜翠敏,黄蓓琳,王洪泉,等. 四种黄芪注射液中黄芪甲苷含量比较 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(6): 472-475.