

HPLC-ELSD 法测定复方天麻蜜环糖肽片中 黄芪甲苷含量

朱燕, 黄义纯, 蓝献泉, 刘旺培

(韶关市食品药品检验所, 广东韶关 512028)

复方天麻蜜环糖肽片是天麻蜜环菌粉和当归黄芪浸膏的混合物, 可用于高血压病、脑血栓、脑动脉硬化等疾病的治疗^[1]。其中的成分黄芪可对心肌细胞释放磷酸二酯酶起到良好抑制效果, 对患者的代谢功能进行改善、消除自由基、提升心肌收缩力和调节血压^[2]。现行质量标准 WA1-XG-006-2002 未对黄芪进行质量控制。本文参考 2015 年版《中国药典》(一部)^[3]、欧洲药典^[4]及文献^[5-9], 采用 HPLC-ELSD 法测定黄芪甲苷的含量, 为制剂质量标准的完善提供依据。

1 仪器与试药

LC-20AT 高效液相色谱仪 (Shimadzu, ELS-DLTL 蒸发光散射检测器, 岛津公司); HT-300BQ 超声仪 (山东济宁恒通超声设备有限公司); AG-135 电子分析天平 (梅特勒

托利多仪器有限公司); 复方天麻蜜环糖肽片 (规格: 0.25g, 山西康欣药业有限公司, 批号: 141201019、151206022、1605070082); 黄芪甲苷对照品 (含量: 93.0%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 110781-201515)。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent C18 柱 (250mm×4.6mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (32:68); 流速: 1.0ml·min⁻¹; 对照品溶液进样 20 μ l, 供试品溶液进样 20 μ l; ELSD 参数: 检测器漂移管温度为 45 $^{\circ}$ C; 氮气吹扫流速为 450kPa; GAIN 值为 5。

2.2 溶液制备

(1) 对照品溶液 精密称取黄芪甲苷对照

(上接第 5 页)

不能合成的必需脂肪酸, 具有重要的保健功能。反式棕榈油酸是蜜环菌油特有的成分, 能预防 II 型糖尿病的作用, 同时它还有助于将血液中的胆固醇和甘油三酯维持在较合理的水平上。

4. 采用不同的抗氧化分析方法, 分析和评价了不同提取方法提取的蜜环菌油的抗氧化活性。试验结果表明: 蜜环菌油有一定的清除 DPPH 自由基的能力, 还具有羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除能力。超声提取的蜜环菌油对 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除能力均优于微波提取品 0.05441g, 置 50ml 量瓶中, 加甲醇至刻度,

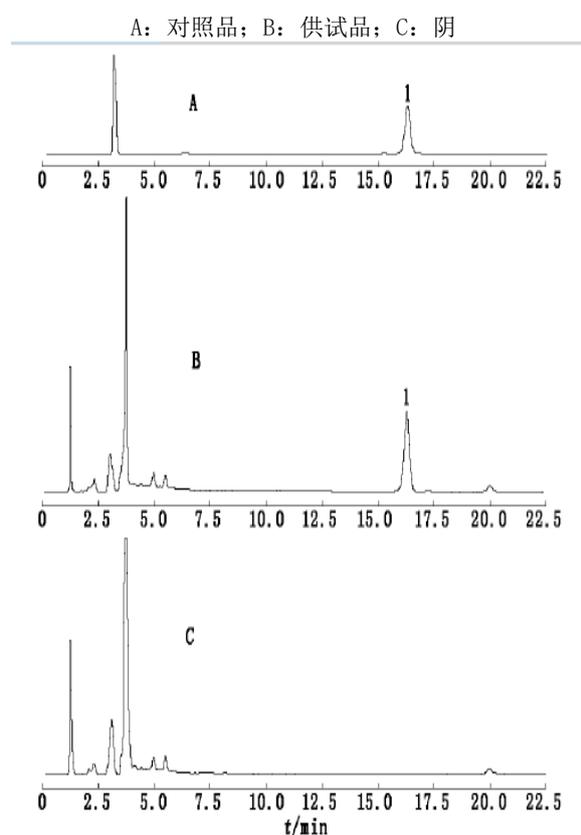
的蜜环菌油。这可能由于超声提取法提取过程中只破坏蜜环菌的细胞壁, 使油脂从细胞中扩散出来而不影响油脂成分。微波提取法在提取的过程中, 由于油脂不同成分吸收微波能力不同, 被加热的程度就不同, 从而使油脂的成分发生改变, 影响了对自由基的清除效果。

总之, 蜜环菌油具有良好的抗氧化物活性, 为蜜环菌油具有的诸多生理活性提供解释。而且, 提取方法以超声波法为佳。

摇匀, 即得 1mg·ml⁻¹ 的对照品贮备溶液。精密

量取对照品贮备溶液 5ml 至 20ml 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

(2) 供试品溶液 取样品(批号: 151206022) 30 片, 除去包衣, 研细, 取约 2.7g, 精密称定, 置碘量瓶中, 精密加入甲醇 25ml, 超声提取 40min (250W, 50kHz), 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20ml 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 30 ml, 合并正丁醇液, 用氨试液溶液洗涤 2 次, 每次 30ml, 弃去氨试液, 收集正丁醇萃取液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 5ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。



性样品; 1: 黄芪甲苷

图 1 复方天麻蜜环糖肽片 HPLC-ELSD 图

2.3.2 线性关系 分别精密量取 2.2 项下对照品贮备溶液 0.5、1.0、2.0、5.0、7.0、10.0ml 至 20ml 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别配制

(3) 阴性样品溶液 按照处方比例, 取缺黄芪的浸膏制备成阴性样品。精密称取阴性样品 0.5g, 按照供试品溶液方法制成阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 密吸取 2.2 项下对照品溶液 5、20 μ l、供试品溶液、阴性样品溶液各 20 μ l 进样, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中, 以保留时间定性, 黄芪甲苷色谱峰与相邻色谱峰达到基线分离, 理论塔板数按黄芪甲苷峰计算不低于 4000, 分离度大于 1.5, 阴性无干扰。色谱图见图 1。

成黄芪甲苷系列对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分别进样 20 μ l, 测定峰面积。以峰面积对数 (logy) 对质量浓度的对数 (logx) 进行线性回归, 得回归方程:

$$\log y = 1.596 \log x + 6.695, \quad r = 0.999 \quad (n = 6)$$

结果表明, 黄芪甲苷质量浓度线性范围为 0.0253~0.5060mg·m⁻¹。

2.3.3 精密度试验 精密吸取 2.2 (1) 项下对照品溶液 20 μ l, 按拟订色谱条件连续进样测定 6 次。结果黄芪甲苷平均峰面积 RSD 为 1.39% (n=6), 明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (批号: 151206022) 20 μ l, 于 0、4、8、12、24h 时进样, 测定峰面积, 计算含量。结果 RSD 为 2.18% (n=5), 表明供试品溶液在 24h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 平行精密称取样品 (批号: 151206022) 共 6 份, 按 2.2 项下制备供试品溶液, 按 2.1 项下方法进样 20 μ l, 测定峰面积, 计算含量。结果每片黄芪甲苷含量为 0.036 mg, RSD 为 2.68% (n=6), 表明方法重复性较好。

2.3.6 加样回收率试验 平行取已知含量的样品 (批号: 151206022) 共 6 份, 测定含量, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芪甲苷加样回收率试验结果

取样量/ g	样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率 /%	x/%	RSD 值 /%
2.7386	0.3599	0.3795	0.7382	99.68	98.99	1.87
2.8023	0.3683	0.3795	0.7306	95.47		
2.6891	0.3534	0.3795	0.7312	99.55		
2.7138	0.3567	0.3795	0.7398	100.95		
2.7056	0.3556	0.3795	0.7317	99.10		
2.6231	0.3448	0.3795	0.7211	99.16		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品 (141201019、151206022、1605070082), 按 2.2 项下制备供试品溶液, 按 2.1 项下方法进样 20 μ l, 测定峰面积, 采用外标二点法对数方程计算含量。样品每片含黄芪甲苷分别为 0.041、0.036、0.039mg。

3 讨论

3.1 HPLC-ELSD 的选择

黄芪甲苷最早一般采用薄层扫描法进行测定, 最近的文献研究为 2011 年^[7], 但操作较复杂, 重现性差, 误差较大。HPLC 法优于 UV 法^[8]。HPLC 法中一般采用 UV 法^[6]和 ELSD 法^[5], 由于黄芪甲苷在紫外区仅有末端 200nm 附近有紫外吸收, 响应值小且不稳定, 样品中含有丰富的多糖、肽类成分, 基质干扰严重影响, ELSD 法是目前无紫外吸收的皂苷类成分比较理想的检测方法, 并被中国和欧洲药典采用。所以采用蒸发光散射检测器测定复方天麻蜜环糖肽片中黄芪甲苷的含量。

3.2 色谱条件

参考药典 ELSD 法的色谱条件^[3], 以乙腈-水 (32 : 68) 为流动相, 进样量: 20 μ l, 流速: 1ml \cdot min⁻¹, 选择 ELSD 参数时, 根据仪器型号以及中药黄芪甲苷检测经验, 选择漂移管温度 60 $^{\circ}$ C、气体压力 30Psi、喷雾器加 60%模式、增益 20 为检测条件, 发现黄芪甲苷峰形较好、杂质分离度高, 故确认采用此检测条件。

3.3 提取方法和洗涤条件

对比样品在两种不同提取方式下黄芪甲苷的提取效率。取 6 份样品, 分别采用索氏提取器加热回流与超声提取两种方法分别制备待测溶液, 检测发现提取效果相当。在满足分析要求的同时, 超声提取法操作更为简便, 故用超声提取法。《中国药典》使用氨试液洗涤样品, 文献记录有用 1% 的氢氧化钠水溶液洗涤样品^[9,10], 本试验比较了氨试液和 1%氢氧化钠水溶液相同条件下的洗涤效果, 发现含量差异很小, 虽然减少氨试液使用, 环境更友好, 但是考虑到方法的成熟性, 最终参照药典方法使用氨试液进行样品洗涤。

综上所述, 该方法操作简便、稳定性好、结果准确, 可用于复方天麻蜜环糖肽片中黄芪甲苷的测定。

参考文献

- [1] 赵金芬. 复方天麻蜜环糖肽片的临床应用[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(8): 33-34
- [2] 张小娟, 王炳华, 王文英, 等. 高血压患者应用复方天麻蜜环糖肽片辅助治疗的临床分析[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(24): 5545-5546
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 302-303
- [4] European Pharmacopoeia[S]. Ph.Eur. 8.8. 2013: 4355
- [5] 刘和平, 彭招华, 张润容, 等. 黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 92-94
- [6] 刘维海, 张小飞, 吕腾, 等. 高效液相色谱法测定肾康分散片干膏中黄芪甲苷含量[J]. 现代中医药, 2016, 36(2): 82-87
- [7] 孔德宪, 刘育强, 赵伯友, 等. 薄层色谱扫描法测定芪黄通秘软胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6): 18-19
- [8] 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
- [9] 滕洪铭. 浅析采用高效液相色谱法测定摩芪口服液中黄芪甲苷含量的方法[J]. 机电信息, 2016, 1(20): 46-49
- [10] 张金红, 周晶, 宋慧琴, 等. 碱水解法提高黄芪药材中黄芪甲苷的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2935-2937

