

• 药品质量控制 •

高效液相-蒸发光散射法测定 复方黄芪凝胶中黄芪甲苷的含量*

林智成, 刘妙娜, 张立冬, 严书超, 尹春萍
(华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030)

[摘要] 目的 建立复方黄芪凝胶中黄芪甲苷的含量测定方法。方法 采用高效液相-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法。固定相: Welch-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(46: 54), 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃。蒸发光散射检测器检测参数: 漂移管温度 98℃, 载气为氮气, 流速 2.7 L·min⁻¹。结果 黄芪甲苷在 4.24~8.48 μg范围内与峰面积成良好的线性关系($r=0.9992$), 平均回收率为 101.57%, RSD为 2.17% ($n=6$)。结论 该检测方法可靠、准确、重现性好, 适用复方黄芪凝胶中黄芪甲苷的含量测定。

[关键词] 黄芪凝胶, 复方; 黄芪甲苷; 高效液相-蒸发光散射

[中图分类号] R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)04-0455-03

Determination of Astragaloside IV in the Gel Compound of Astragaloside by HPLC-ELSD

LIN Zhicheng LIU Miaona ZHANG Lidong YAN Shuchao YIN Chunping (School of Pharmacy, Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 China)

ABSTRACT Objective To establish a method for determining the concentration of astragaloside IV in the gel compound of astragaloside. **Methods** The HPLC-ELSD was used, with the analytical column: Welch-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); the mobile phase: acetonitrile-water (46: 54); the flow rate: 0.5 mL·min⁻¹; the column temperature: 30℃. The detecting parameters were that the temperature of drift tube for ELSD was 105℃ and the flow rate of N₂ was 2.7 L·min⁻¹.

Results The calibration curve was linear over the range of 4.24~8.48 μg ($r=0.9992$). The average recovery was 101.57%, and RSD was 2.17% ($n=6$). **Conclusion** The proposed method could be used in the quantitative analysis of astragaloside IV in the gel compound of astragaloside and the method is convenient, economical and accurate with a good reproducibility.

KEY WORDS Gel compound of astragaloside; Astragaloside IV; HPLC-ELSD

黄芪具有补气固表, 利尿托毒, 排脓, 敛疮生肌等功能。黄芪为复方黄芪凝胶的君药, 主要含苷类物质。研究表明黄芪总苷具有免疫调节、抗炎降压、镇静镇痛、保肝、护心、清除多种自由基等作用^[1]。其主要成分为黄芪甲苷, 目前, 黄芪甲苷测定方法有薄层扫描法^[2]、比色法^[3], 但误差较大。又由于皂苷为一类极性较大, 结构复杂的化合物, 它只在紫外末端有吸收, 若采用紫外检测末端吸收法(波长 200~210 nm), 则

有干扰峰, 无法使用。因此, 笔者采用蒸发光散射检测仪(ELSD)作为检测手段, 利用高效液相色谱(HPLC)法测定复方黄芪凝胶中黄芪甲苷的含量。结果显示本法准确、可靠、可重复性好, 可用于复方黄芪凝胶的质量控制^[4]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪 Agilent 1100 (四元泵、自动进样器、柱温箱), Alltech ELSD 2000 型蒸发光散射检测器, Chemstation system 化学工作站, TCQ-250 型超声波清洗器。

1.2 试剂 黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所提供), 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 复方黄芪凝胶为自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Welch-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(46: 54); 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃, 进样量: 20 μL; ELSD 参数: 漂

[收稿日期] 2007-06-25

[基金项目] * 湖北省科技厅攻关计划重点资助项目(基金编号: 2005AA302B05)

[作者简介] 林智成(1979-), 男, 广东中山人, 在读硕士, 主要从事中药新药开发研究。电话: (0) 13477066083 E-mail: zslz@yahoo.com.cn

[通讯作者] 尹春萍(1965-), 女, 湖北武汉人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生药学及新药开发研究。电话: 027-83692733

移管温度为 98 ℃, 载气为氮气, 流量为 2.7 L·min⁻¹。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 5.31 mg, 加甲醇配制成 0.531 mg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取复方黄芪凝胶约 15 mL, 精密量取, 置索氏提取器中, 加甲醇 40 mL, 超声 30 min, 充分溶解, 再加甲醇适量, 加热回流 4 h, 提取液回收溶剂并浓缩至干, 残渣加水 10 mL, 微热使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液充分洗涤 2 次, 每次 40 mL, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 残渣加水 5 mL 使溶解, 放冷, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱 (1.5 cm × 12.0 cm), 以纯化水 50 mL 洗脱, 弃去水液, 再用 40% 乙醇 30 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 继用 70% 乙醇 80 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液作为供试品溶液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取除黄芪以外的其他所有药材, 按复方黄芪凝胶制备工艺制备阴性提取物, 再按“2.2.2”项下的方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性实验 分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 20 μL, 以上述条件考察, 记录色谱图。结果表明黄芪甲苷峰保留时间为 8.3 min, 在供试品色谱中主峰与相邻峰分离度良好, 阴性对照溶液在此处无任何色谱峰, 对供试品溶液测定无任何干扰。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mL 置 1 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。吸取 20 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积的自然对数为纵坐标, 以进样量的自然对数为横坐标作线性回归, 得回归方程为: $Y = 1.0091X + 13.5130$, $r = 0.9992$ 。线性范围 4.24 ~ 8.48 μg。

2.5 精密度实验 精密吸取上述对照品溶液 20 μL, 重复进样 5 次, 按上述色谱条件测定黄芪甲苷峰面积, 计算日内精密度, 结果表明测得 5 次峰面积 RSD 为 0.72%。

2.6 稳定性实验 精密吸取上述对照品溶液, 分别在 0, 1, 4, 8, 12 h 进样 5 次, 记录峰面积值, 其 RSD 为 1.14%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性实验 取上述同一样品 5 份, 各 15 mL, 按“2.2.2”项的制备方法, 平行制备 5 份样品, 按照上述色谱条件进行测定, 计算黄芪甲苷含量为 1.93, 1.85, 1.87, 1.92, 1.89 mg·g⁻¹, RSD 为 1.77%。结果

表明, 测定方法的重复性良好。

2.8 回收率实验 回收率实验采取加样回收法, 取已知含量的同一样品 6 份, 各 15 mL, 精密量取, 分别精密加入黄芪甲苷 0.053 mg, 按“2.2.2”项制备方法及以上色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。实验结果表明, 黄芪甲苷平均加样回收率在 98% ~ 103%, 加样回收率良好。

表 1 黄芪甲苷加样回收率测定结果

样品中所含 的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收 率 / %	RSD / %
0.062	0.053	0.116	101.89		
0.062	0.053	0.117	103.77		
0.062	0.053	0.116	101.89	101.57	2.17
0.062	0.053	0.114	98.11		
0.062	0.053	0.117	103.77		
0.062	0.053	0.115	100.00		

2.9 样品含量测定 按“2.2.2”制备项下的方法, 测定了 3 批样品, 结果见表 2。

表 2 3 批样品黄芪甲苷含量测定结果 n = 3

样品批号	含量 / (mg·g ⁻¹)	RSD / %
040025	1.93	1.22
040027	1.85	1.13
040028	2.11	1.09

3 讨论

本研究中供试品溶液的制备采用甲醇回流处理, 目的是将黄芪中的其他皂苷类物质水解为黄芪甲苷。

黄芪甲苷的紫外末端吸收较差 ($\lambda_{max} = 200.8 \text{ nm}$), 如果用紫外检测, 受试剂影响很大, 检测效果不佳。ELSD 检测器为质量型检测器, 不受外部环境干扰, 试剂在检测器中全部蒸发, 不干扰检测, 灵敏度高, 稳定性和重现性好, 且操作方便, 是检测黄芪甲苷的一种新型、有效的分析方法。

笔者在供试品溶液制备时, 考察不同种溶媒甲醇、乙醇及水提取。结果显示甲醇的提取率较高, 而且提取的杂质较少。供试品提取方法的选择实验中曾对是否通过 D101 型大孔吸附树脂柱洗脱两种方法进行对比。结果不通过 D101 型大孔吸附树脂柱洗脱虽较简便, 但制出的供试品溶液较黏稠, 颜色深, 不利于检测。用 D101 型大孔吸附树脂柱洗脱过程, 能有效地去除残留在溶液中多糖、色素、树脂及其他大部分极性较黄芪甲苷大的成分, 使溶液中杂质成分减少。用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过后进样, 二法测得含量几无差别, 但前者杂质峰明显多于后者, 说明在用水及 40% 乙醇洗脱过程中, 黄芪甲苷无损耗。故选择通过 D101 型大孔吸附树脂柱洗脱方法。

采用 ELSD 测定黄芪甲苷含量时,其峰面积值与对照品浓度的线性关系不太理想,而将峰面积与对照品浓度值分别取自然对数后可得到理想的线性关系,即对照品峰面积积分值与进样量均取自然对数后列出线性方程,将供试品峰面积积分值取对数后代入方程求得进样量的自然对数,再换算成供试品的含量即可。同样取常用对数与取自然对数的线性关系比较接近。这种现象与 ELSD 检测器的检测机制一致^[5,6]。

为了获得最高灵敏度,需要调节 ELSD 的检测器的载气压力、雾化温度和蒸发温度这 3 个重要的参数。通过实验发现,在 $2.7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的体积流量条件下,设定 $17.926 \times 10 \text{ Pa}$ 的载气压力、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的雾化温度和 $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 的蒸发温度可以获得最大的检测灵敏度。当载气压力较低时,会因喷出的雾滴不均匀产生色谱峰顶端尖刺的现象;而载气压力较低,则会因为雾滴的粒度过小,使灵敏度降低;温度过低时,流动相的蒸发会不完全,直接由蒸发管流出,导致检测信号较低;温度过高,

则会使形成的微粒大小不均匀,导致精密度较差。另外,设置衰减值为 3 可以使信号的响应较高,且基线的噪音不会对检测产生任何影响。

[参考文献]

- [1] 王辰,侯连兵. 黄芪新剂型的临床应用 [J]. 医药导报, 2006 25(6): 526-527
- [2] 鲁静,王宝琴. 黄芪甲苷的薄层扫描法测定 [J]. 中成药, 1992 14(6): 34
- [3] 陆一心. 黄芪甲苷定量方法的研究 [J]. 中成药, 1996 18(2): 38-39
- [4] 齐菲,侯连兵. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定因宁片中黄芪甲苷的含量 [J]. 医药导报, 2006 25(11): 1197-1198
- [5] STOCKWELL P B. A light scattering detector for liquid chromatography [J]. *Am Lab* 1991, (8): 19
- [6] 冯埃生,邹汉法,汪海林,等. 影响高效液相色谱-挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察 [J]. 药物分析杂志, 1996 16(6): 414

动态浊度法定量检查注射用乙酰谷酰胺的内毒素含量

刘毅萍¹,何建平²

(1 杭州市药品检验所, 310014; 2 浙江省绍兴市第二人民医院药剂科, 312000)

[摘要] 目的 应用动态浊度法实验定量测定注射用乙酰谷酰胺中细菌内毒素含量。方法 用 $0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内毒素标准品溶液作标准曲线。结果 通过对样品进行干扰预实验,筛选出注射用乙酰谷酰胺最佳的检测浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 进行正式干扰实验。样品中定量添加内毒素 $0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 回收率为 $50\% \sim 200\%$ 。结论 浊度法实验可有效检查注射用乙酰谷酰胺中的内毒素含量。

[关键词] 注射用乙酰谷酰胺; 浊度法实验; 细菌内毒素; 干扰实验

[中图分类号] R927.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)04-0457-02

注射用乙酰谷酰胺为脑功能改善药,用于肝性脑病、偏瘫、神经外科手术引起的昏迷、瘫痪及智力减退、记忆力障碍等。注射用乙酰谷酰胺的细菌内毒素凝胶法已有报道^[1],而定量检查(动态浊度法)方法,笔者未见文献报道。定量法实验较家兔法和细菌内毒素凝胶法,可提供更灵敏准确的内毒素定量检测方法。笔者依照《中华人民共和国药典》2005年版附录收载的细菌内毒素检查法应用指导原则及附录中有关检查方法^[2],采用动态浊度法建立注射用乙酰谷酰胺细菌内毒素检查方法。

1 材料与仪器

细菌内毒素检查用水(批号: 0505170, 湛江安度斯生物有限公司); 鲎试剂(批号: 040629, 湛江安度斯生物有限公司); 细菌内毒素工作标准品(中国药品生物制品检定所提供, 批号:

2005-6, 效价: 每支 100 EU); 注射用乙酰谷酰胺(浙江金华康恩贝生物制药公司提供, 批号: 021015, 021018, 021021, 3 批样品均经热原和细菌内毒素凝胶法检查合格)。BET-32B 型细菌内毒素测定仪(天津大学无线电厂)。

2 方法与结果

2.1 细菌内毒素限值(L)的确定 按公式 $L = K M$ 确定, K 为按规定的给药途径, 人用每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量, 注射剂 K 为 $5 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; M 为人用每千克体重每小时最大剂量, 人均体重按 60 kg 计算, 根据注射用乙酰谷酰胺成人临床用量为每日 $100 \sim 600 \text{ mg}$ 即最大用量为 600 mg 注射时间按 1 h 计, $M = 600 \text{ mg} / (60 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1})$, 限值 $L = K M = 5 / (600 / 60) = 0.5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。最大有效稀释倍数(MVD) = $L P / \lambda$ (动态浊度法实验: λ 为标准曲线最低点浓度, 本实验中 $\lambda = 0.031 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, P: 样品原溶液浓度 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $MVD = 645$)。

2.2 标准曲线制作及可靠性 用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品稀释, 使其最终内毒素浓度分别为 $0.5,$

[收稿日期] 2007-09-20

[作者简介] 刘毅萍(1967-), 女, 浙江杭州人, 副主任药师, 学士, 从事药品不良反应监测工作。电话: 0571-85463895 E-mail liuyip006@hznc.com