

HPLC-CAD 法测定健儿消食口服液中黄芪甲苷的含量

赵春荷

(西峡县产品质量检验检测中心, 河南 西峡 474500)

摘要 目的:建立高效液相色谱-电喷雾检测器法(HPLC-CAD)测定黄芪甲苷的含量,从而改进现行标准含量测定方法。**方法:**采用 ZORBAX SB-C₈ Agilent 液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈-水(35:65)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温室温, 理论板数≥4 000; 电喷雾检测器检测参数: 控制模式 remote (N2000, 1:local0), 雾化管温 25 ℃, 载气(氮气)流速: 4 L·min⁻¹。通过方法学考察, 确认该色谱条件下黄芪甲苷含量测定方法的可行性和可靠性。**结果:**黄芪甲苷在 2.25~101.68 μg·mL⁻¹ 浓度范围内呈良好的线性关系, 重复性试验含量测定平均值为 0.824 mg·mL⁻¹, RSD = 1.35%; 平均回收率为 99.2%, RSD 1.2%; 10 批样品的平均含量为 0.818 mg·mL⁻¹, RSD 为 1.8%。**结论:**经方法学验证, 本法可作为健儿消食口服液质量控制的方法。

关键词:健儿消食口服液; 黄芪甲苷; HPLC-CAD; 含量测定; 验证; 提升

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)01-0099-04

doi: 10.19778/j.chp.2024.01.017

Determination of astragaloside IV in Jianer Xiaoshi oral liquid by HPLC-CAD

ZHAO Chunhe

(Xixia County Product Quality Inspection and Testing Center, Xixia 474500, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC-CAD method to determine the content of astragaloside in Jianer Xiaoshi oral liquid in order to improve the content determination method in the current standard. **Methods:** Agilent ZORBAX SB-C₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted with acetonitrile-water (35:65) as the mobile phase at the flow rate of 1 mL·min⁻¹ by gradient elution. Column temperature was room temperature, and theoretical plate number was ≥4 000. Detection parameters of electrospray detector: control mode remote (N2000, 1:local0), atomizing tube temperature 25 ℃, carrier gas (nitrogen) was at flow rate: 4 L·min⁻¹. The feasibility and reliability of this method for the determination of astragaloside were confirmed by various methods. **Results:** The method showed a good linear relationship in the concentration range of 2.25–101.68 μg·mL⁻¹. RSD of content was 1.35% in repeatability test with average content of 0.824 mg·mL⁻¹. The average recovery rate ($n=3$) was 99.2% with RSD 1.2%, which met the requirements. **Conclusion:** The method verified by methodology can be applied quality control of Jianer Xiaoshi oral liquid method.

Key words: Jianer Xiaoshi oral liquid; astragaloside; HPLC-CAD; content determination; verify; improvement

健儿消食口服液由黄芪、炒白术、陈皮、麦冬、黄芩等提取精制而成, 具有健脾益胃、理气消食的功效, 用于小儿饮食不节损伤脾胃所致的纳呆食少、腹胀腹满、厌食恶食等, 是一种功效优良的中成药^[1],

且副作用较少。原标准中的含量测定指标为黄芩苷,黄芩在本品处方组成中为佐药,并非主要有效成分,无论是从配方组成还是在成品中的相对含量方面,以黄芩苷为含量测定指标不能充分表达药物疗效。方中君药黄芪中黄芪甲苷含量较高,笔者随机抽取了市售5个厂家的健儿消食口服液共10批次样品,通过大量试验改进,选用黄芪甲苷为含量测定指标,用碱水洗脱法提取纯化样品制备^[2-3], HPLC-CAD法进行含量测定,并从多方面考察方法的可行性,论证该色谱条件下含量测定结果的稳定性和可靠性,试验数据得到了满意结果,以黄芪甲苷为含量测定指标可以改进提升原标准中含量测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Dionex Ultimate3000 液相色谱仪(ZORBAX SB-C8 Agilent 液相色谱柱,自动进样器;Dionex ESA Corna ULTRAII 电喷雾式检测器(CAD),超声波清洗器(昆山奥兰克 MDH-20 型)。

1.2 试剂

黄芪甲苷对照品(供含量测定用,中国食品药品检定研究院,批号:110781-202219),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

样品:市售健儿消食口服液,5个厂家共10批次样品(河南A药业、哈尔滨E药业、贵州C制药、苏州B药业、汕头D制药);健儿消食口服液阴性对照样品(缺黄芪原料一味,其它处方量和生产工艺条件与样品相一致,下称阴性对照样品)委托一药厂实验室加工提供。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 ZORBAX SB-C₈ Agilent 液相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相:乙腈-水(35:65),流速 1 mL · min⁻¹,柱温:室温,理论板数不低于 4 000;电喷雾检测器检测参数:控制模式 remote (N2000, 1:local0),雾化管温度:25 °C,载气(氮气)流速:4 L · min⁻¹。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密量取本品 10 mL,加甲醇 25 mL,超声处理 30 min,滤过,残渣加甲醇 10 mL,超声处理 5 min,滤过,用甲醇 5 mL 洗涤残渣,合并滤液与洗液,蒸干,残渣加水 10 mL,40 °C 加热溶解,用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 20 mL,合并提取

液,然后用氨试液洗涤 2 次,每次 30 mL;弃去氨液,正丁醇液蒸干,得残渣;精密量取流动相 10 mL 溶解残渣,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加流动相制成每 mL 含 0.602 mg 的溶液,即得。

2.2.3 阴性对照样品溶液 取阴性对照样品,再按上述“2.2.1”制备方法,制得缺黄芪的阴性对照样品溶液。

2.3 系统适用性及专属性考察

精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照样品溶液各 10 μL,分别按“2.1”项色谱条件进行测定,记录色谱图。供试品色谱中显示与对照品色谱保留时间一致的色谱峰,主峰与相邻色谱峰的分离度大于 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.05 之间;阴性对照色谱在对应的位置无色谱峰,表明阴性无干扰。理论塔板数均大于 4 000,方法专属性良好,色谱系统适用性试验符合含量测定要求。结果见图 1。

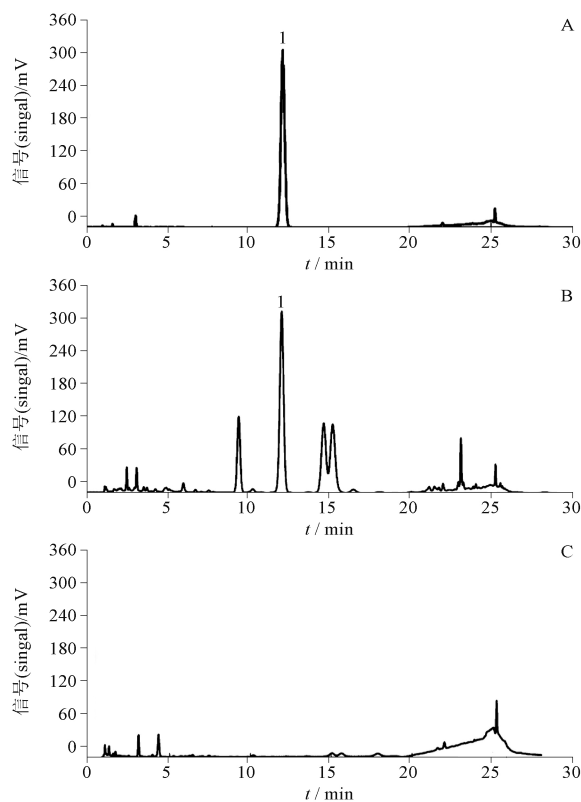


图1 黄芪甲苷对照品溶液(A)供试品溶液(B)阴性样品溶液(C)色谱图

Fig. 1 HPLC-CAD spectrum of astragaloside reference substance solution(A) sample solution(B) negative sample solution (C)

2.4 线性关系考察

精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 4、6、8、10、12、15、20 μ L 依次进样,以进样浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,色谱峰面积为纵坐标作标准曲线图,并进行回归分析得线性关系方程:

$$Y = 1.1485 \times 10^{-3}X + 1.7836 \quad r = 0.9991$$

黄芪甲苷在 2.25 ~ 101.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系,采用两点法进行含量测定。

2.5 精密度考察

精密量取黄芪甲苷对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,连续进样 5 次,测得黄芪甲苷峰面积 RSD = 1.35% ($n = 5$)。

2.6 稳定性试验

另取 2 份样品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,并分别于配制后 0、6、9、15、20、24 h 依法测定,所得黄芪甲苷峰面积 RSD 分别为 1.43%、1.58% ($n = 6$)。结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 样品重复性试验

取同一批样品,分别照“2.2.1”项下方法平行制备 5 份供试品溶液,按照上述色谱条件进行测定,计算黄芪甲苷含量平均值为 0.82 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,

RSD = 1.35% ($n = 5$),结果表明方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

精密量取已知含量(河南灵佑药业,0.828 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的同一样品 3 份各 5 mL,分别精密加入黄芪甲苷对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL,加甲醇 25 mL,超声处理 30 min,滤过,残渣加甲醇 10 mL,超声处理 5 min,滤过,用甲醇 5 mL 洗涤残渣,合并滤液与洗液,蒸干,残渣加水 10 mL,40 $^{\circ}\text{C}$ 加热溶解,用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 20 mL,合并提取液,然后用氨试液洗涤 2 次,每次 30 mL;弃去氨液,正丁醇液蒸干,得残渣;精密量取流动相 10 mL 溶解残渣,摇匀,得供试品溶液,在上述色谱系统条件下测定黄芪甲苷含量,计算平均回收率为 99.21%,RSD 为 1.2%,结果见表 1。

2.9 样品测定

取 10 批不同厂家的健儿消食口服液样品,按“2.2.1”项下方法制得供试品溶液。精密吸取各样品溶液 10 μ L、黄芪甲苷对照品溶液 5 μ L,进样,测定样品溶液中黄芪甲苷峰面积,两点法计算样品中黄芪甲苷的含量。结果测得 10 批样品的平均含量为 0.818 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,RSD 为 1.8%,结果见表 2。

表 1 黄芪甲苷加样回收试验结果

Tab. 1 Recovery of astragaloside IV

取样量 (sample)/mL	样品含量 (content)/mg	加入对照品量 (added)/mg	实测量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
5	0.424	0.301 0	0.719 8	98.3	99.2	1.2
5	0.424	0.301 0	0.723 1	99.4		
5	0.424	0.301 0	0.716 6	97.2		
5	0.424	0.602 0	1.034 2	101.4		
5	0.424	0.602 0	1.021 8	99.3		
5	0.424	0.602 0	1.023 5	99.6		
5	0.424	0.903 0	1.326 9	100.0		
5	0.424	0.903 0	1.309 1	98.2		
5	0.424	0.903 0	1.321 7	99.4		
5	0.424	0.903 0	1.321 7	99.4		

表 2 样品含量测定结果

Tab. 2 Results of sample content determination

厂家 (manufacturer)	批号 (number)	含量 (content)/(mg $\cdot$ mL $^{-1}$)	平均值 average content/mg $\cdot$ mL $^{-1}$	总平均值 (total mean)/mg $\cdot$ mL $^{-1}$	RSD/ %
河南 A 药业	220914	0.785	0.796	0.818	1.8
	221004	0.811			
	221207	0.793			
苏州 B 药业	A22745	0.841	0.837		
	A22318	0.836			

续表 2(Tab. 2 continued)

厂家 (manufacturer)	批号 (number)	含量 (content)/(mg·mL ⁻¹)	平均值 average content/mg·mL ⁻¹	总平均值 (total mean)/mg·mL ⁻¹	RSD/ %
贵州 C 制药	A22612	0.838	0.828		
	210723	0.823			
	220106	0.832			
汕头 D 制药	20210924	0.814	0.814		
哈尔滨 E 药业	220426	0.817	0.817		

3 结论

黄芪甲苷含量测定有较多报道^[46],主要为 HPLC-ELSD 方法。本试验经采用高效液相色谱-电喷雾检测器(CAD)法建立了健儿消食口服液中黄芪甲苷的含量测定方法^[7-9],可为该品种质量控制及方法的提高提供可靠的技术支撑。根据试验结果将健儿消食口服液含量测定的限度值暂定为:每 mL 含黄芪以黄芪甲苷(C41H68O14)计不得少于 0.80 mg。

参考文献

[1] 刘利军,李华年,刘雨华. 赖氨葡锌颗粒加健儿消食口服液佐治小儿腹泻的疗效观察[J]. 现代医院,2016,16(11):1596.
LIU LJ, LI HN, LIU YH. Observation on the curative effect of Ly-amine Gluzine granule plus Jianer Xiaoshi Oral Liquid in the treat-ment of diarrhea in children [J]. Mod Hosp, 2016, 16(11): 1596.

[2] 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.
ZHANG JH, ZHOU J, SONG HQ, *et al.* Investigation on technol-ogy of improving astragaloside in Astragalus herb by alkaline hy-drolysate [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21(11): 2935.

[3] 陈友梅. 中药化学[M]. 山东:山东科学技术出版社,1988:241.
CHEN YM. Chemistry of Traditional Chinese Medicine [M]. Shandong: Shandong Science and Technology Press, 1988:241.

[4] 王晓玲,徐银伍,陈运峰. 健儿消食口服液的质量标准研究[J]. 中国药事 2004,18(10):630.
WANG XL, XU YW, CHEN YF. Study on the quality standard of Jianer Xiaoshi Oral Liquid [J]. Chin Pharm Aff, 2004, 18(10): 630.

[5] 丁如贤,李霞,李一珺,等. 黄芪药材、饮片中黄芪甲苷含量

测定方法的改进[J]. 世界中医药,2013,8(6):669.
DING RX, LI X, LI YJ, *et al.* Improved method for determination of astragaloside in astragali radix [J]. World Chin Med, 2013, 8(6): 669

[6] 孙忠敏. 高效液相色谱法-蒸发光散射检测器法测定健儿消食口服液中黄芪甲苷的含量[C].//中国药学杂志岛津杯第七届全国药物分析优秀论文评选交流会议论文集,2005:154.
SUN ZM. Determination of astragaloside in Jianer Xiaoshi Oral Liquid by high performance liquid chromatography and evaporative Light scattering detector [C].//Proceedings of the 7th National Pharmaceutical Analysis Excellent Papers Selection Exchange Meeting, Chinese Journal of Pharmacy, 2005:154.

[7] 刘兴国;李丽红;李仁勇,等. 新型电喷雾式检测器 CAD 与蒸发光散射检测器 ELSD 用于分析黄芪甲苷的对比研究[C]. 第十一届全国青年药理学工作者最新科研成果交流会议论文集, 2012.
LIU XG, LI LH, LI RY, *et al.* Comparative study of novel elec-trospray detector CAD and evaporative light scattering detector ELSD for the analysis of astragaloside [C]. Proceedings of the 11th National Young Pharmaceutical Workers Latest Scientific Re-search Achievements Exchange Meeting, 2012.

[8] 程巧莺,唐登峰,马临科,等. 基于指纹图谱及多指标成分定量的健儿消食口服液质量评价[J]. 药物分析杂志,2016,12(1):148.
CHENG QY, TANG DF, MA LK, *et al.* Quality evaluation of Jianerxiaoshi mixture by HPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 12(1): 148.

[9] 梁瑾,封士兰,刘小花,等. 黄芪药材的高效液相色谱指纹图谱及主要成分的含量测定方法研究进展[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5):490.
LIANG J, FENG SL, LIU XH, *et al.* Research progress of HPLC fingerprint and the main component determination methods of Ra-dix Astragal [J]. Northwest Pharm J, 2012, 27(5): 490.

(收稿日期:2023-09-28)