

反相高效液相色谱法快速测定五味安神颗粒中葛根素的含量

赵绪元¹, 胡领¹, 肖岚¹, 姚金成², 李焕德¹ (1. 中南大学湘雅二医院药剂科, 湖南 长沙 410011; 2. 湖南中医学院, 湖南 长沙 410007)

摘要:目的 建立五味安神颗粒中葛根素的含量测定方法。方法 RP-HPLC 色谱法, ODS C₁₈柱, 4.6 mm × 150 mm (5 μm); 流动相: 甲醇-水 (35: 65), 内含 0.01% 醋酸; 检测波长: 252 nm; 流速: 1.2 mL · min⁻¹。结果 色谱分离良好, 在 0.02 ~ 0.64 μg 范围内成线性关系, $Y = 39443X + 2477.6$, $r = 0.9999$, 平均回收率为 97.3 %, RSD 为 1.58 %。结论 本方法简单、快速、准确, 适合该制剂快速定量分析。

关键词: 五味安神颗粒; 反相高效液相色谱法; 葛根素; 含量测定

The determination of puerarin in Wuweianshen granules by reversed phase high performance liquid chromatography

ZHAO Xu-yuan¹, HU Ling¹, XIAO Lan¹, YAO Jin-cheng², LI Huan-de¹ (1. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China; 2. Hunan college of TCM, Changsha 410007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of puerarin in Wuweianshen granules containing puerariae radix. **METHOD** RP-HPLC, ODS column, methanol : H₂O (35: 65) containing 0.01% acetic acid as mobile phase at a flow-rate of 1.2 mL · min⁻¹, and detected at 252 nm. **RESULTS** Puerarin was eluted within 5 min without interference with co-existing components, the detection limits was 0.01 μg ~ 0.32 μg ($r = 0.9999$), the average recovery was 97.3 % with RSD = 1.58 %. **CONCLUSION** This method is simple and accurate, it is suitable for the quality control of the preparation.

KEY WORDS: Wuweianshen granules ; RP-HPLC; puerarin ; quantification

五味安神颗粒由葛根、甘草等药组成, 对心虚肝郁所至的神经衰弱和更年期综合征有良效。市售品经近两年的跟踪评价, 疗效稳定, 质量可靠。曾用薄层扫描法成功测定了该制剂中葛根素含量, 但操作较繁琐, 分析时间较长, 不适合制剂快速测定, 为此尝试用 HPLC 法测定该制剂中葛根素含量。葛根是方中君药, 葛根素是方中主要有效成分之一。为了有效控制该制剂的质量, 以葛根素为定量指标, 采用 RP-HPLC 色谱法分离测定其含量, 结果表明, 方法简便, 回收率高, 重现性好, 适用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

LC-10A 液相色谱仪系统 (含 LC-10ATVP 泵, LC-10Ai 泵, SPD-10AVP 检测器, CTO-10A 柱温箱, SCL-10AVP 系统控制器, Class-vp 工作站); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其它试剂为分析纯; 葛根素对照品 (购自中国药品生物制品检定所 0752-9806); 五味安神颗粒 (长沙泰宝制药, 批号 030710, 030907, 031201, 040425, 040612, 葛根经湖南省药品检验所

杨友良鉴定为豆科植物野葛)

2 含量测定

2.1 色谱条件

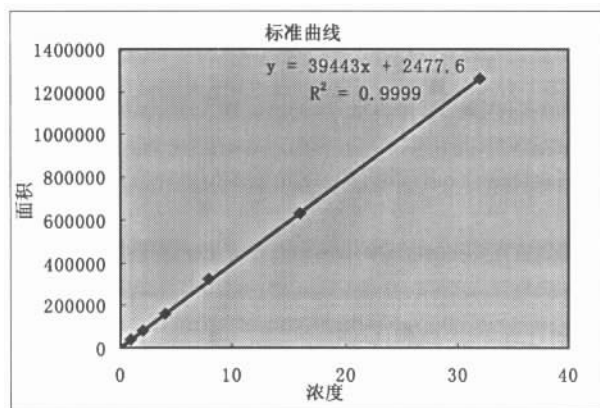
4.6 mm × 150 mm ODS 不锈钢柱 (5 μm); 流动相: 甲醇-水 (35: 65), 内含 0.01% 醋酸, 流速 1.2 mL · min⁻¹; 检测波长 252 nm; 柱温 35℃, 灵敏度 0.05 AUS。

2.2 标准曲线

精密称取葛根素对照品 10 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为储备液。精密量取储备液 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mL 分别于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得含葛根素 1, 2, 4, 8, 16, 32 μg⁻¹ 的对照品溶液。分别取 20 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以进样量对峰面积进行线性回归, 得回归方程: $Y = 39443X + 2477.6$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.02 ~ 0.64 μg。

2.3 精密度试验

取浓度为 8 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液 20 μL 连续进样 5



次,峰面积平均值为315722,RSD为0.81%。取同一批五味安神供试品溶液连续进样5次,每次20 μ L,测定峰面积,其平均值487388.9,RSD为1.26%,批间RSD为1.47%。

2.4 回收率试验

取已知含量的五味安神颗粒(批号031201,含量16.8 mg $\cdot$ g $^{-1}$)6份,每份约0.3g,换算成加入葛根素的量,分别加入1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的对照品溶液3 mL,照样品测定项下方法操作,计算回收率。结果其平均回收率为97.3%,RSD为1.58%,见表1。

表1 加样回收率试验结果($n = 6$)

Tab 1 Results of the recovery assay($n = 6$)

取样中葛根素量(mg)	添加葛根素量(mg)	测得葛根素量(mg)	回收率(%)	$\bar{x} \pm s$ (%)	RSD(%)
5.022	3	7.912	96.3	97.3	1.58
5.312	3	8.212	96.7		
5.187	3	8.059	95.7		
4.598	3	7.501	96.8		
4.741	3	7.725	99.5		
5.104	3	8.075	99.0		

2.5 稳定性试验

取同一批样品适量,制成供试品溶液,分别于0、1、2、4、8、24h进样,每次20 μ L,记录峰面积,结果平均峰面积315720,RSD=1.17%。

2.6 空白试验

按处方配比制成缺葛根的空白制剂,按样品测定项下的色谱条件测试,结果无干扰。

2.7 样品测定条件

2.7.1 提取溶媒的选择 采用超声处理提取,对甲醇、70%乙醇、80%乙醇3种溶媒提取效果进行考察。精密称取样品约0.3g,分别加入上述3种溶媒50 mL,精密称定,静置30 min后超声处理,放至室温。加原溶媒至原重,摇匀,过滤,弃去初滤液。取续滤液5 mL至25 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,进样20 μ L,依法测定,结果见表2。

表2 提取溶媒选择试验($n = 3$)

Tab 2 The selective test for the agent of extractive solvent($n = 3$)

溶媒	葛根素含量(mg $\cdot$ g $^{-1}$)			$\bar{x} \pm s$ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)	RSD(%)
70%乙醇	16.7	16.9	17.1	16.9	0.96
80%乙醇	16.0	16.6	16.3	16.3	1.84
甲醇	16.3	16.4	16.6	16.4	1.37

上述数据经统计分析,组间差异有显著性($P < 0.05$),故选择甲醇为提取溶媒。

2.7.2 提取时间考察 对超声提取5,15,25 min进行考察,其它操作同上,结果见表3。

表3 超声时间考察($n = 3$)

Tab 3 Observation on the time of ultrasonic waves($n = 3$)

处理时间(min)	葛根素含量(mg $\cdot$ g $^{-1}$)	RSD(%)
5	15.7	0.64
15	16.8	1.72
30	17.0	1.80

上述数据经统计分析,15min,30min与5min比较差异显著性($P < 0.05$),15min与30min比较差异无显著性($P > 0.05$),故以15min作为提取时间。

2.7.3 样品测定结果 将五味安神颗粒研成细粉,精密称取0.3g,置50 mL容量瓶中,加甲醇50 mL,精密称重,超声处理15 min,放至室温。补充甲醇至原重,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,弃去初滤液。取续滤液5 mL至25 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,进样20 μ L,外标法测定含量,结果见表4。

表4 样品测定结果($n = 5$)

批号	葛根素含量(mg $\cdot$ g $^{-1}$)			$\bar{x} \pm s$ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)	RSD(%)
	1	2	3		
030710	16.7	16.5	17.1	16.8	1.82
030907	15.7	15.4	15.5	15.5	0.98
031201	17.2	17.2	16.9	17.1	1.01
040425	16.8	16.5	16.9	16.7	1.24
040612	15.9	16.0	16.3	16.1	1.29

3 讨论

文献报道的葛根素含量测定方法有薄层色谱法^[1,2]、HPLC法^[3,4]。我们用薄层扫描法测定葛根素含量,也获得了比较稳定的结果,但操作过程相对较繁琐。本文尝试用RP-HPLC法控制该制剂中葛根素含量,试验中进行流动相的选择,发现流动相中加入少量冰醋酸对改善峰形有很大作用。由于葛根素分子中有2个酚羟基,易电离,在未加冰醋酸前,葛根素峰明显拖尾,色谱保留时间不稳定;加入少量冰醋酸可抑制酚羟基的电离,使得色谱峰型变得尖锐,分离效果好,色谱保留时间稳定。因此试验中在流动相中加入少量冰醋酸以改善峰型和稳定色谱保留时间。另外在实验中经紫外光谱扫描获得葛根素的最大吸收波长在252nm处,与文献报道基本一致。

本实验采用反相高效液相色谱法测定五味安神颗粒中葛根素的含量,被测组分的分离较好,颗粒中的其它成分不形成干扰,且方法操作简便,结果准确,重现性好,灵敏度高,可作为实际生产中质量控制的方法。

参考文献

- [1] 黄丽丹. 降脂冲剂的质量标准研究[J]. 中成药, 1999, 21(7): 345.
- [2] 阎雪生, 于宗渊, 陈延龙. 薄层扫描法测定复方止咳口服液中葛根素的含量[J]. 中验方剂学杂志, 1999, 5(4): 9.
- [3] 郭向阳. 颈复康无糖颗粒剂的质量标准研究[J]. 黑龙江医药, 1999, 12(4): 218.
- [4] 仲英, 王菊, 杨尚军, 等. 高效液相色谱法测定不同地区葛根中葛根素的含量[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(12): 1059.

收稿日期: 2004-07-15