

高效液相色谱法测定脑得生片中葛根素的含量

沈春香, 杨兵勋, 陈立钻(浙江天皇药业有限公司, 杭州 310012)

摘要:目的 采用高效液相色谱法测定脑得生片中葛根素的含量,以控制该制剂的质量。**方法** 柱为 Agilent EclipseXDB-C₁₈ (4.6×250mm, 5μm); 以水-甲醇-乙腈溶液(76:20:4)为流动相; 流速 1.0mL/min; 检测波长为 250nm。**结果** 方法的平均加样回收率为 102.0%, RSD=0.62%(*n*=9)。葛根素在 0.032~2.031μg 进样量范围内, 进样量与吸收面积值呈良好的线性关系 *R*=1.000。**结论** 本方法测定脑得生片中葛根素的含量, 结果准确, 重复性好。

关键词: 高效液相色谱; 葛根素; 脑得生片

中图分类号: R917.799.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)03-0223-03

Determination of puerarin in Naodesheng tablets by HPLC

SHEN Chun-xiang, YAN Bin-xun, CHEN Li-zuan(*Zhejiang Tianhuang Pharmaceutical CO., Ltd, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the contents of puerarin in Naodesheng tablets by HPLC. **METHODS** Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6×250mm, 5μm) was used with the mobile phase of water-methanol-acetonitrile(76:20:4), the flow rate was 1.0mL/min. The wavelength of detection was set at 250nm and the column temperature was at 25°C. **RESULTS** The linear range of puerarin was 0.032~2.031μg with the correlation coefficient 1.000. The average recovery was 102.0%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and accurate.

KEY WORDS: HPLC; puerarin; Naodesheng tablets

脑得生片是 2005 年版药典收载品种, 具有活血化瘀, 通

经活络之功效。用于淤血阻络所致的眩晕、中风, 脑动脉硬

化、缺血性中风及脑出血后遗症等^[1]。葛根为处方中最大的组分,其活性成分葛根素具有降压,扩张心脑血管,降低血管阻力,增加脑血流量,抑制血小板聚集,抗血栓形成等广泛的心脑血管系统的药理作用^[2-3],临床疗效早已有多篇论文报道^[4-5],因此可认为葛根素是脑得生的有效成分之一,有必要对其质量进行监控。药典中的质量标准未对其进行含量测定。为更好的控制该制剂质量,我们建立了高效液相色谱法测定其葛根素含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪, Agilent 化学工作站(A.09.01版)。超声仪: BOLONG USC-702, 上海波龙电子设备有限公司。甲醇, 色谱纯, 天津市四友生物医学技术有限公司, 批号 030820101; 乙腈, 色谱纯, 天津市四友生物医学技术有限公司, 批号 041103101。水为亚沸高纯水。其余试剂均为分析纯。脑得生片 4 批(批号为: 050301, 050401, 050402, 050403), 由浙江天皇药业有限责任公司生产; 葛根素对照品, 批号: 110752-200209, 购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, Agilent EclipseXDB-C18 (4.6 × 250mm, 5μm); 流动相: 水-甲醇-乙腈溶液(76:20:4); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 25℃; 检测波长为 250nm。在此条件下葛根素的保留时间约为 9.366min。以葛根素峰计算色谱柱的理论板数大于 5000, 与其他相邻组分峰的分离度大于 1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 称取葛根素对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇溶液制成每 1mL 含 0.05mg 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 取约 0.1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 50mL, 密塞, 称定重量, 超声提取(功率 300W, 频率 40kHz)15min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 取缺葛根的处方药, 按该品种质量标准制备不含葛根的阴性对照品, 按供试品溶液的制备方法制备阴性供试品溶液。

2.3 检测波长的选择

取葛根素对照溶液(c = 0.0797mg/mL)在 200nm ~ 400nm 进行波长扫描, 在 250nm 处有最大吸收波长。所以选择 250nm 为检测波长。

2.4 专属性和系统适用性

分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液 10μL 注入色谱仪中, 记录色谱图。葛根素峰保留时间约为 9.366 min。阴性对照色谱图在葛根素峰位置无假阳性峰, 表明其他组分对测定无干扰。葛根素峰与其他组分峰的分离度为 10.00, 理论板数以葛根素峰计算为 7706。

2.5 线性考察

取葛根素对照品约 20mg, 精密称定: 20.31mg。置于 50.0mL 的量瓶中, 用 50% 甲醇溶解, 定容, 摇匀, 得对照溶液

1, 浓度为 0.4062mg/mL。对照溶液 1 逐倍稀释成不同浓度的溶液, 分别进样 0.0320, 0.0635, 0.1270, 0.2540, 0.5080, 1.0155, 2.0310μg 进行色谱分析, 测定峰面积。以峰面积值为纵坐标(Y), 进样量为横坐标(X)作回归方程, X 单位为 μg, 得直线方程 y = 3945.6x - 11.122, 相关系数 R = 1.0000, 表明进样量在 0.0320 ~ 2.0310μg 范围内, 峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.6 精密度考察

依法取同一对照溶液(浓度为 0.050 8mg/mL)连续进样 6 次, 测定结果: 峰面积 RSD 为 0.28% (n = 6)。

2.7 重复性考察

取同一批号脑得生片样品 6 份(批号: 050301), 按供试品溶液的制备方法制备, 分别依法测定。测定结果: RSD 为 0.57% (n = 6)。

2.8 稳定性实验

取同一供试品溶液每间隔 4h 依法测定一次, 共测定 7 次, 测定葛根素峰面积。测定结果: RSD 为 0.37% (n = 6), 结果表明供试品溶液在 24h 内基本稳定。

2.9 回收率考察

采用加样回收法, 样品 9 份(批号 050301)每份称取 0.05 g, 精密称定。每份分别精密加入对照溶液(浓度为 0.4062 mg/mL)2, 3, 5mL, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别依法测定。结果见表 1。

表 1 回收率实验结果

Tab 1 The results of recovery tests						
取样量 (g)	样品中葛根素的量 (mg)	加入对照的量 (mg)	测定总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.0501	1.0679	0.8124	1.8844	100.5		
0.0516	1.0998	0.8124	1.9329	102.5		
0.0569	1.2128	0.8124	2.0449	102.4		
0.0520	1.1084	1.2186	2.3530	102.1	102.0	0.62
0.0513	1.0934	1.2186	2.3300	101.5		
0.0532	1.1339	1.2186	2.3803	102.3		
0.0577	1.2300	2.0310	3.3021	102.0		
0.0505	1.0764	2.0310	3.1478	102.0		
0.0511	1.0892	2.0310	3.1679	102.3		

2.10 定量限考察

取对照溶液(c = 0.0064mg/mL)2.0mL 于 25.0mL 的量瓶中, 得对照溶液 9(c = 0.000512mg/mL)。进样 5μL 测定。结果葛根素峰的信噪比为 10.3。所以定量限为 0.00256μg。

2.11 中试 3 个批号样品的测定

取三批样品, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别依法测定。结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Tab 2 Results of sample determination	
批 号	每片中葛根素的量 (mg)
050401	9.35
050402	7.51
050403	7.47

3 讨论

3.1 曾比较不同流动相系统,如甲醇-水,甲醇-乙腈-水,甲醇-乙腈-0.2mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液,甲醇-乙腈-0.1% 枸橼酸溶液,甲醇-0.1% 枸橼酸溶液,甲醇-乙腈-0.2% 磷酸溶液,并分别考察了不同的比例,结果表明,以甲醇-乙腈-水(74:20:6)为流动相分离效果好,而且方便。

3.2 曾比较不同的提取溶剂,如甲醇、乙醇、50% 甲醇。结果发现:乙醇提取的供试品在同样的条件下基线不能回0,且分离度差。甲醇、50% 甲醇提取供试品都有较好的系统适应性。50% 甲醇对葛根素的提取率大于甲醇提取率。所以选择 50% 甲醇为提取溶剂。

3.3 曾比较不同的提取时间,结果超声(40kHz,300W)15min 就能提取完全,所以选择提取时间为 15min。超声提取方便可行,且分离能达到要求。

3.4 孙立华等^[6]曾用高效毛细管电泳法测定葛根及其制剂脑得生片中葛根素的含量。比较而言,本实验的方法比较方便,与脑得生中测定三七皂苷用同一设备,同一根柱,流动相

组成亦相近。

参考文献

- [1] 中国药典 2005 年版一部[S]. 2005:572.
- [2] 范学理. 葛根素对犬血压、血管反应性、脑循环及外周循环的作用[J]. 中华医学杂志,1974,54(4):265.
- [3] 王福文,朱燕,胡志力,等. 葛根素对体内血栓形成及血液流变学影响[J]. 山东医药工业,2003,22(2):52.
- [4] 马丽娜,刘庶珠,王静杰,等. 葛根素对脑梗死患者脑循环动力学影响的研究[J]. 中华实用中医药杂志,2005,18(5):637.
- [5] 鲁国志,哈钱媛. 葛根素注射液治疗急性脑梗死临床疗效观察[J]. 中华实用中西医杂志,2004,17(12):1784.
- [6] 孙立华,胡永明,邹德禄,等. 高效毛细管电泳法测定葛根及其制剂脑得生片葛根素的含量[J]. 中国药学杂志,2000,35(10):694-696.

收稿日期:2005-11-22