

HPLC 法测定葛根滴丸中葛根素的含量

刘生杰, 王丽娜, 董圣惠(解放军总医院门诊药局, 北京 100853)

摘要 目的: 建立葛根滴丸中葛根素含量的测定方法。方法: 以 30% 乙醇溶液超声溶解葛根滴丸中葛根素, 采用高效液相色谱法(HPLC)外标法测定葛根素含量, 其中固定相为 Kromasil C₁₈, 流动相为乙腈: 水 = 10 : 90, UV 检测波长为 250nm, 流速为 1mL/min, 柱温为室温。结果: 葛根素溶液浓度范围在 10 ~ 200 μg/mL 时与其吸收值呈良好线性关系($r=0.9998$), 平均回收率为 100.76%, $RSD=1.12%$ 。结论: 该法具有良好的准确性、精密性, 方法简便, 结果可靠。

关键词 葛根素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2006)03-0164-03

Determination of puerarin in puerariae radix dripping pills by HPLC

LIU Sheng-jie, WANG Li-na, DONG Sheng-hui (Department of Pharmacy, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

ABSTRACT Objective: To establish a HPLC method for determination of puerarin in radix puerariae dripping pills. **Methods:** The radix puerariae dripping pills were dissolved with 30% alcohol by ultrasonic wave. The puerarin was separated by Kromasil C₁₈ analysis column. The mobile phase was composed of acetonitrile : water = 10 : 90 (V/V). The flow rate of mobile phase was 1mL/min. The detection wavelength was UV 250nm. **Results:** There was a good linearity from 10 μg/mL to 200 μg/mL ($r=0.9998$) in separation of puerarin. The average recovery was 100.76% and the relative standard deviation 1.12% ($n=6$). **Conclusion:** The method is simple and fast, and the results are reliable.

KEY WORDS puerariae; HPLC

葛根素有山人参的美称, 富含人体必需的 8 种氨基酸和多种微量元素, 具有去热解毒、扩张血管、抗癌等功能, 现已被制成针剂(如葛根素注射液)、片剂(如愈风宁心片)、滴丸(如愈风宁滴丸)等用于临床。葛根黄酮滴丸为一种新剂型药物, 有效成分是从葛根中提取的总黄酮(主要成分为葛根素、大豆苷元、大豆苷、葛根黄素木糖甙等), 其中葛根素约占总黄酮的 30%^[1,2], 因此, 测定葛根滴丸中葛根素的含量, 可作为评价葛根滴丸制剂质量的重要指标。现行国家标准用 HPLC 法测定提取得到的葛根素, 注射液中葛根素的含量一般采用 UV 法测定, 但 UV 法测出的是混合成分的含量, 用法则能较好地测出主要成分葛根素的含量。本研究先用 30% 乙醇溶液超声溶解出葛根滴丸中葛根素成分后, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定葛根素含量, 旨在建立测定葛根滴丸中葛根素含量的有效方法。

1 材料和方法

1.1 试药和试剂 葛根滴丸, 每粒含葛根素 2.2 mg, 自制, 批号为 20001128、20010118、20010324。葛根素对照品, 中国药品生物制品鉴定所 乙腈

(色谱纯, 天津市华真特种化学试剂厂, 批号 20031024)。95% 乙醇(分析纯, 天津市化学试剂六厂, 批号: 20021228)。配制流动相用重蒸水, 其他为蒸馏水。

1.2 仪器 日本岛津 LC-10A 型高效液相色谱系统, 配有: SPD-10AVP 型紫外检测器, LC-10AVP 高压泵; BP-210S 型电子天平; Double J chromatogram 脱气装置; 微孔滤膜, 类型: 有机溶媒系, 规格: 直径 50mm, 孔径: 0.45 μm, 天津市双吉色谱仪器经营部提供。

1.3 色谱条件^[3,4] 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈: 水 = 10 : 90 (V/V), 流速为 1.000 mL/min, 柱温为室温, 紫外检测波长为 250 nm, 以峰面积定量。

1.4 溶液配制 ①对照品溶液制备: 精密称取葛根素对照品 5.22 mg, 于 25 mL 容量瓶中, 加 30% 乙醇溶解并稀释至刻度。②辅料阴性液制备: 取聚乙二醇 0.2 mL 置 25 mL 容量瓶中, 以 30% 乙醇溶解并定容。③供试品溶液制备: 精密称取葛根滴丸 0.1374 g 置于 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇适量, 超声处理 30min, 放冷, 加 30% 乙醇至刻度, 混匀。用

0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取滤液即得。

1.5 葛根滴丸中葛根素的含量测定 3个批号葛根滴丸,每个批号各取两组:样品1,样品2。方法:精密称定,加30%乙醇超声30min溶解,并稀释成每1mL中约含葛根素40 μ g的溶液,制成供试液,精密量取10 μ L注入高效液相色谱仪,量取峰面积;另取葛根素标准品按前述对照品溶液制备方法进行制备,取10 μ L进样^[4]。分别精密称取3批葛根滴丸样品进行测定。

1.6 方法学考察

1.6.1 线性关系 浓度为0.01、0.02、0.04、0.06、0.1、0.2mg/mL的对照品溶液各10 μ L进行测定,以峰面积值A和对照品浓度c作回归计算。

1.6.2 加样回收率 精密称取葛根素对照品9.12mg置10mL量瓶中,处理方法同前述对照品制备方法,制成对照液。

精密称取葛根滴丸(批号为20001128、20010118、20010324)403.3mg,置25mL量瓶中,处理方法同前述供试品溶液制备方法,制成供试品液。

分别精密吸取0.5mL供试品溶液置于1~12号微量试管中,再分别精密吸取0.5mL对照品溶液加入上述4~6号微量试管中,精密取0.6mL对照品溶液分别加入上述7~9号微量试管中,精密取0.7mL对照品溶液分别加入10~12号微量试管中,混合均匀。于1~12号微量试管中各取0.4mL溶液置于1~12号10mL容量瓶中,加30%乙醇至刻度,混匀。各取10 μ L进样,按1.3条件进行测定。计算回收率。

1.6.3 重复性 取上述0.04mg/mL的对照品溶液,连续进样6次,每次10 μ L,记录峰面积。计算RSD。

1.6.4 稳定性 取样品溶液分别于0、2、4、6、8、24h各测定1次。

2 结果

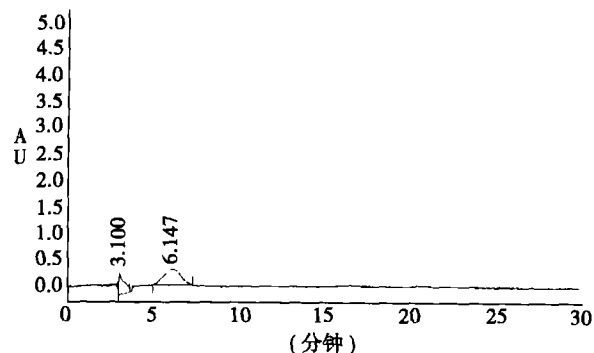


图1 辅料阴性液 HPLC 图谱

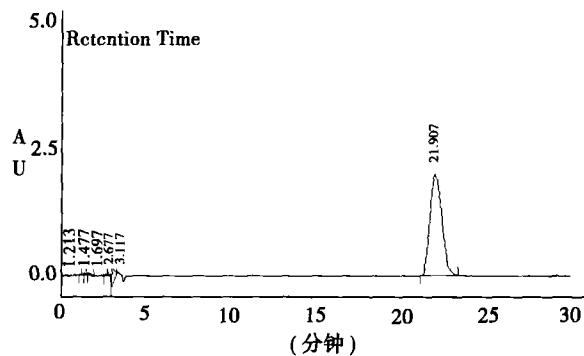


图2 葛根素标准品 HPLC 图谱

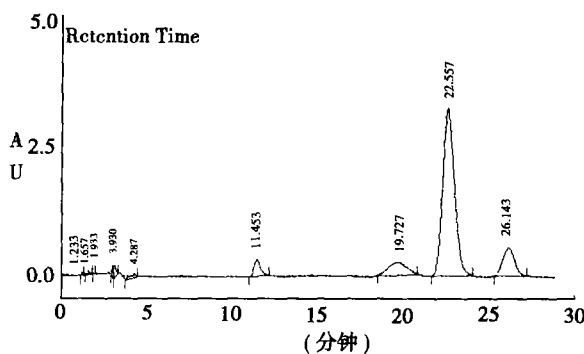


图3 葛根素供试品 HPLC 图谱

辅料阴性液(图1)与对照品溶液(图2)对比在葛根素出峰范围内无任何杂质干扰峰出现,证明该主要辅料对葛根素在测定条件下无干扰。且对照品溶液与供试品溶液(图3)在22min左右处有相应峰,证明此处为葛根素峰。

将3个批号中每个批号样品1、样品2的葛根素含量(mg/30mg)取平均值分别为2.1495、2.1350、2.1301,标示量为2.2mg,计算得出标示含量为97.19%。线性回归方程: $C = 2.370 \times 10^{-5}A - 2.20$, $r = 0.9998$ 。平均回收率为100.76%, $RSD = 1.12\%$ 。重复性考察, $RSD = 1.29\%$ ($n = 6$),表明重复性良好。稳定性考察, $RSD = 1.27\%$,说明样品溶液在24h内稳定。

3 讨论

目前测定葛根素含量的方法中,常采用的流动相是甲醇:水=20:80。该条件下葛根滴丸供试品(提取液)中葛根素峰与葛根总黄酮中其他异黄酮成分峰分离度不佳,作者曾前后改用流动相比例(23:77,15:85,13:87,10:90),仍出现出峰时间长,分离度不佳,峰形不好,峰宽等多种不利于测定的情况。改用乙腈作为流动相,经过乙腈:水=18:82,19:81,15:85,10:90等多种流动相条件

的多次摸索,最终确定以乙腈:水=10:90作为葛根素测定的合适流动相条件,确定在葛根素峰附近无其他可产生干扰的异黄酮成分及其他干扰物质的杂质峰出现的色谱条件。

葛根滴丸中葛根素提取方法参考《中国药典》^[5]中丹参滴丸的提取方法和中药葛根在 HPLC 中含量测定时的提取方法,同时经过实验考察,前后采用不同浓度乙醇和不同超声时间,如 30% 乙醇与 1h 超声时间,45% 乙醇与 30min 超声时间,30% 乙醇与 30min 超声时间这 3 种不同提取方法,其中 30% 乙醇超声提取 30min 的提取方法使葛根滴丸中葛根素的提取更加安全稳定,所以最终选择 30% 乙醇超声提取 30min 的提取方法作为葛根滴丸中葛根素的最佳提取方法。

实验证明,本文所建立的 HPLC 法具有良好的

准确性、精密性,方法简便,结果可靠。

参考文献:

- [1] 郭建平,孙其荣. 葛根化学成分及临床应用研究概况[J]. 药学实践杂志,1996,14(3):146.
- [2] 李正国,王宝琴. 葛根及其制剂中异黄酮类成分测定方法的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,1999,10(5):309.
- [3] 郭建平,孙其荣,周全. 高效液相色谱法测定葛根黄酮制剂中葛根素的含量[J]. 药学实践杂志,1996,14(5):300.
- [4] 郭炎荣. HPLC 测定全血中葛根素的含量[J]. 中国医院药学杂志,2000,20(6):343.
- [5] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 2005.
- [6] 陈士林,陈四保. 葛根素高效液相指纹图谱的研究[J]. 中草药,2003,34(7):661.

收稿日期:2006-04-05

(上接第 155 页)

3.2.2 最佳处方的验证 以上述优化的矫味剂配比,即明胶/甘露醇/阿司帕坦/盐酸三氟拉嗪 0.15/1/0.05/0.16,以及崩解时间优化的处方组合 PVPP 8%、L-HPC 5%、MCC 30%,与乳糖、硬脂酸镁、微粉硅胶适量,按等量递加法混匀,100 目过筛,采用直接压片法制备片重为 100mg 的片剂。所得口腔崩解片的硬度为 (3.2 ± 0.7) kg,口感良好,无砂砾感,脆碎度减小重量 0.93%,片重差异在 $\pm 4.61\%$,崩解时间为 (10 ± 2) s。

3.3 溶出度测定 口腔崩解片与市售普通片的溶出度测定结果见图 1。

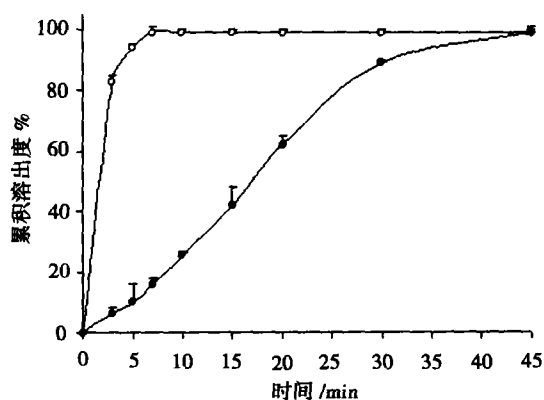


图 1 盐酸三氟拉嗪口腔崩解片与市售普通片的溶出曲线
-○- 口腔崩解片 -●- 市售普通片

从图 1 可见,盐酸三氟拉嗪口腔崩解片在 5min 溶出盐酸三氟拉嗪超过 90%,7min 释放完全。而市售普通片溶出 90% 则需要 30min,45min 后才释放

完全。

4 讨论

口腔崩解片研制的首要技术难点就是口感问题,一般采用甜味剂或香精进行矫味。但盐酸三氟拉嗪味道较苦,对口腔黏膜刺激性较大,单纯加入大量的甜味剂难以达到满意的效果。本文采用明胶先将盐酸三氟拉嗪包裹,再加入适量的甘露醇和阿司帕坦,调节口味,当明胶/甘露醇/阿司帕坦/盐酸三氟拉嗪为 0.15/1/0.05/0.16 时,制得的盐酸三氟拉嗪的粉末口感良好、无砂砾感、对口腔黏膜无刺激性,适合口腔崩解片的质量要求。

盐酸三氟拉嗪制成口腔崩解片,护士只需将其塞入精神病患者口中,1min 内片剂就能在口腔中自动崩解完毕,通过正常的生理吞咽动作,患者就能自动吸收药物,这将极大减少医院护理工作的负担。同时与普通片相比,口腔崩解片崩解速度更快,药物溶出度显著增加。

参考文献:

- [1] 史宁,吴久鸿. 口腔崩解片的研究进展[J]. 解放军药学学报,2005,21(1):56.
- [2] 薛卫萍,王旭,申兰萍. 盐酸三氟拉嗪片溶出度的测定方法[J]. 中国药业,2003,12(6):21.
- [3] 季兴梅,张德福,李勇,等. 氯雷他定口腔崩解片及其制备方法. 中国,200410027019. [P]. 2005-01-26.
- [4] 中国药典 2005 年版. 二部[S]. 附录,2005:74.

收稿日期:2006-01-17