

高效液相色谱法测定银仙通肺宝颗粒中岩白菜素的含量

苏明武¹, 柳俊¹, 姚雪莲², 袁征¹, 尹久¹ (1 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061; 2 江西中医学院, 江西 南昌 330000)

摘要 目的: 应用高效液相色谱法测定银仙通肺宝中岩白菜素的含量。方法: 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (18: 81: 1), 检测波长 275 nm, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 °C。结果: 岩白菜素在 0.43~2.15 μg 范围内呈良好的线性关系; 平均加样回收率为 98.33%; RSD 为 2.68%。结论: 本方法检测快速, 定量准确, 重现性好, 可用于岩白菜素的含量测定。

关键词 银仙通肺宝; 岩白菜素; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)01-0051-03

Determination of bergenin in Yinxian Tongfeibao granules by HPLC

SU Mingwu¹, LIU Jun¹, YAO Xuelian², YUAN Zheng¹, YIN Ji¹ (1 Hubei College of Traditional Chinese Medicine Wuhan 430061, China; 2 Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine Nanchang 330000, China)

ABSTRACT Objective To develop a HPLC method for determining bergenin in Yinxian Tongfeibao granules. **Methods** Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column was used and methanol-water-acetic acid-glacial (18: 81: 1) was used as mobile phase; detection wavelength was 275 nm, the flow rate was 0.8 mL/min, column temperature was 30 °C. **Results** There was a good linear relationship in the range of 0.43~2.15 μg, $r = 0.9998$. The average recovery was 98.33% with RSD = 2.68%. **Conclusion** The method is rapid, accurate and repeatable. It can be applied to an effective control of the quantity of Yinxian Tongfeibao granules.

KEY WORDS HPLC; Yinxian Tongfeibao granules; bergenin

银仙通肺宝颗粒主要由银杏叶、紫金牛、淫羊藿、黄芪、陈皮、川芎、当归、五味子八味药组成, 是一个临床疗效显著的验方。具有扶正祛邪、清肺化痰、止咳平喘的功效, 用于痰湿阻肺、气喘咳嗽、久咳不愈以及慢性支气管炎及其阻塞性肺气肿见上述症候者。岩白菜素为紫金牛的有效成分之一, 具有镇咳、祛痰、平喘、抗菌、抗病毒等药理作用。本实验选择岩白菜素作为内控指标, 采用高效液相色谱法对岩白菜素进行含量测定。

1 仪器和试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪; AT-201型电子天平 (0.01 mg)。岩白菜素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0678-2000016 中国药典法含量 99.68%, HPLC 归一法检测波长为 220 nm 和 275 nm, 含量为 99.52%, 99.73%)。银仙通肺宝颗粒 (自制, 批号: 030405~030508); 甲醇为色谱纯, 其余为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (18: 81: 1), 检测波长为 275 nm, 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 30 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥器中干燥 48 h 的岩白菜素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.27 mg 的对照品溶液。

2.2.2 样品溶液的制备 取颗粒剂约 2.5 g 研细, 精密称定, 置具塞三角烧瓶中, 加 70% 甲醇溶液 25 mL, 轻轻振摇, 称定重量, 超声处理 50 min, 再称定重量, 用 70% 甲醇溶液补足减失的重量, 充分振摇, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例和工艺, 制成不含紫金牛的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适应性试验 分别取对照品溶液、样品溶液、阴性对照溶液 5 μL 注入色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。

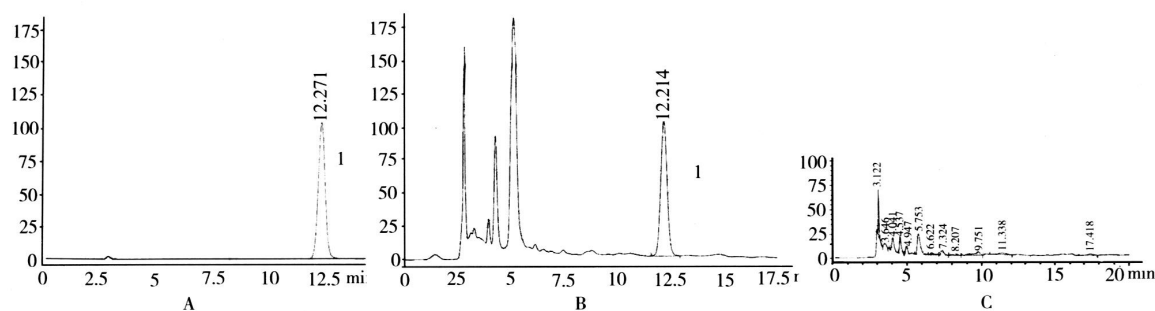


图 1 岩白菜素高效液相色谱图

A-对照品; B-样品溶液; C-阴性对照液; 1-岩白菜素

图 1 显示,岩白菜素峰与其它峰分离度良好,阴性样品对其测定无干扰,理论塔板数以岩白菜素峰计不少于 3 000。

2.4 线性关系考察 精密吸取岩白菜素上述对照品 1、2、3、4、5 μL , 进样测定, 记录峰面积, 以岩白菜素含量 (X) 为横坐标, 峰面积值 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 1\,820.67X + 17.6$ $r = 0.999\,88$ 结果表明岩白菜素在 0.43~2.15 μg 范围内, 线性关系良好。

2.5 精密度试验 取岩白菜素对照品溶液, 进样 4 μL , 连续进样 6 次, 分别记录峰面积: 2187.0、2196.7、2207.2、2199.2、2210.1、2209.6。根据所得峰面积值计算, RSD 为 0.41%, 表明方法精密度良好。

2.6 重现性试验 取同一批号的样品 5 份, 分别按“2.2.2”方法制备成供试品溶液, 进样测定, 计算岩白菜素含量为 38.04、37.05、36.11、35.75、37.44 $\text{mg}/\text{袋}$, 平均每袋 36.88 mg $RSD(\%) = 2.56\%$ 。试验结果表明, 测定结果的重现性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液在室温下放置, 第 1 天, 每次间隔 2 h 连续测定 5 次。第 2 天, 再连续测定 5 次, 每次间隔 2 h, 共测 10 次, 记录峰面积。试验结果表明供试品溶液在 2 d 内稳定, $RSD(\%) = 0.68$, 见表 1。

表 1 稳定性试验结果

时间 (h)	峰面积	时间 (h)	峰面积
2	2128	24	2122
4	2142	26	2123
6	2114	28	2138
8	2111	30	2153
10	2141	32	2111

2.8 回收率试验 精密称取已知含量的颗粒剂 (用研钵研匀) 6 份, 每份约 3.5 g 精密称定; 准确加

入岩白菜素对照品约 3.5 mg 精密称定, 混匀。按“2.2.2”项下方法制备加样回收试样, 测定, 结果平均回收率为 98.33%, $RSD(\%) = 2.68$, 见表 2。

表 2 加样回收率试验结果

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	$RSD(\%)$
3.34	3.1807	95.23		
3.41	3.2243	95.14		
3.32	3.1999	96.38	98.33	2.68
3.97	4.0965	103.2		
3.96	3.9520	99.80		
3.55	2.8501	98.39		

2.9 样品含量测定 取 5 个批号的样品, 按 2.2 方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算样品含量, 结果如表 3 所示。

表 3 样品中岩白菜素含量测定结果

批号	含量 (mg/袋)	平均值 (mg/袋)
030405	33.82	33.97
030412	42.92	43.13
030418	39.13	39.65
030502	37.58	37.44
030508	36.86	36.53

3 讨论

3.1 样品提取溶剂的筛选 我们采用了纯甲醇、80% 甲醇溶液、60% 甲醇溶液 3 种溶剂分别对样品进行提取, 通过比较高效液相测定结果, 发现纯甲醇能完全提尽岩白菜素, 但是极性小的成分同时也被提取出来; 60% 甲醇溶液不能提尽岩白菜素, 影响测定结果; 只有 70% 甲醇溶液既能完全提尽岩白菜素, 又能减少极性小的成分被提取出来。

3.2 样品提取方法的筛选 我们比较了加热回流法和超声波震荡法, 实验结果表明采用超声波震荡

法提取优于加热回流法提取,同时我们对样品提取时间的含量进行了考察,根据考察结果确定超声波震荡法提取时间为 50 min。

3.2 流动相的选择^[1,2] 比较了甲醇-水和乙腈-水 2种系统,发现前一种流动相系统分离效果并不比后一种差,而且前一种流动相系统的成本低,所以确定甲醇-水系统为本实验的流动相系统。在此基础上,考虑主峰分离效果、出峰时间等因素,调节甲醇与水的比例,确定甲醇-水-冰醋酸的体积比为 18:

81:1。

参考文献:

- [1] 杨能英,夏新华. HPLC 测定小儿止咳颗粒中岩白菜素的含量 [J]. 中成药, 2003, 25(7): 591.
[2] 熊佐章. HPLC 法测定复方岩白菜素片的含量 [J]. 基层中药杂志, 2002, 16(2): 11

收稿日期: 2006-04-24

冬虫夏草多糖测定方法的研究进展

刘桂萍 (总参管理保障部中心门诊部药局, 北京 100082)

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2008)01-0053-03

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc^[1]寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体,具有补肺益肾、止血化痰、抗肿瘤、提高机体免疫力等功效。现代药物研究表明虫草中含有甘露醇、腺苷、腺嘌呤、尿苷、鸟苷、尿嘧啶、麦角甾醇、氨基酸、虫草素及微量元素、矿物质等成分^[2]。近年研究证明,虫草除了富含蛋白质、氨基酸、维生素及钙、铁、锰、锌、硒等微量元素外,还含有虫草酸、虫草素、虫草多糖和 SOD 等生物活性物质,具有扩张血管、镇静、抗菌、降血压等功效。特别是其功效成分虫草多糖具有抗肿瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、抗放射、降血糖、降血脂等活性。

国内对冬虫夏草部分活性成分的含量研究情况已有综述报道^[3]。但冬虫夏草多糖的检测方法近年发展很快,特对其研究进展作一综述。

多糖的检测,目前尚无一个统一的方法。多糖的检测方法一般可分为两大类,一类是直接测定多糖本身,如高效液相色谱法和酶法。另一类是利用杨酸法、斐林法、苯酚-硫酸法、硫酸-萘酚法等。前者测定方法准确,有效成分清晰,但需昂贵的仪器、多糖纯品和特定的酶,操作步骤繁琐,在应用中受到限制。后者虽然测定结果灵敏度有限,但方法简单、快速,无需多糖纯品和高级仪器,因而被广泛采用。

1 冬虫夏草多糖的含量测定

1.1 硫酸-苯酚法 鲁晓岩^[4]采用活性炭脱色、醇

析、Sevag法沉淀蛋白,用苯酚-硫酸法测定其含量,并用葡萄糖作为标准。实验结果表明,方法简单快速、灵敏度高、重现性较好。该方法多糖样品用水溶解,80%乙醇醇析,Sevag法沉淀蛋白,在浓硫酸作用下迅速脱水生成糖醛衍生物,然后和苯酚缩合反应显橙黄色,与葡萄糖标准系列比较定量。样品处理液中加入苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速加浓硫酸 5 mL,摇匀,放置 5 min,置沸水浴中加热 15 min,取出冷却至室温,于 490 nm 处,以空白校正零点,用 1 mL 比色皿测吸光度。计算方法为:

$$\begin{aligned} \text{多糖 (以葡萄糖计)} (\text{mg}/100 \text{ mL}) \\ = \frac{A}{V_1/100 \times V_2 \times 1000} \times 100 \end{aligned}$$

式中: A 多糖含量, V₁样品取样量, V₂样品处理液吸取体积。

冬虫夏草多糖是一种复合多糖,葡聚糖含量高,可采用 490 nm 的葡萄糖比色范围比色。当然,总多糖的测定与葡萄糖有差别,需用换算因子换算。

1.2 蒽酮-硫酸法 采用蒽酮-硫酸法测定多糖的含量,反应原理为多糖在浓硫酸作用下,水解成单糖分子,并迅速脱水生成糠醛,然后糠醛与蒽酮缩合成糠醛衍生物,呈蓝绿色,颜色稳定,在 625 nm 处有特征吸收。

刘春泉^[5]以葡萄糖为标准,采用蒽酮硫酸法测定北冬虫夏草子实体粗多糖含量。北冬虫夏草粗多糖液是经乙醚脱脂(脱色)、热水提取、乙醇沉淀和活性炭脱色后制得。结果表明,葡萄糖含量在 0.01 ~ 0.08 mg/mL 时有良好的线性关系,线性方程 y