

黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化

刘和平, 彭招华, 张润容, 黄静, 黄文漳, 曹晖*

(丽珠医药集团股份有限公司 国家中药现代化工程技术研究中心, 广东 珠海 519020)

[摘要] 目的:优化黄芪甲苷含量测定的供试液制备方法,建立黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定的方法。方法:采用 UPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量流动相乙腈-水(32:68),柱温 30 ℃,流速 0.5 mL·min⁻¹,ELSD 检测器温度 45 ℃,载气干燥压缩空气,压力 0.5 kPa,增益值 7。采用甲醇和氨水混合超声提取黄芪中黄芪甲苷,经正丁醇萃取,通过单因素试验优选供试品溶液的制备方法。结果:供试品制备方法为加甲醇 80 mL 和浓氨水 40 mL,超声提取 30 min,用水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 40 mL。采用优化的方法测得 11 批样品中黄芪甲苷含量明显高于 2010 年版《中国药典》黄芪项下含测方法的结果。结论:优化的供试液制备方法操作简单、有效成分损失少。建立的含量测定方法准确可靠、灵敏度高。

[关键词] 黄芪; 黄芪甲苷; 含量测定; 供试液; 单因素试验

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0092-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015050092

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1449.003.html>

[网络出版时间] 2015-01-12 14:49

Optimization of Determination of Astragaloside IV in Astragali Radix LIU He-ping, PENG Zhao-hua, ZHANG Run-rong, HUANG Jing, HUANG Wen-zhang, CAO Hui* (*National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Livzon Pharmaceutical Group Co. Ltd., Zhuhai 519020, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize sample solution preparation method and establish assay method of astragaloside IV in Astragali Radix. **Method:** UPLC-ELSD was used to determine the content of astragaloside IV with mobile phase of acetonitrile-water (32:68), column temperature of 30 ℃, flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, temperature of ELSD at 45 ℃, carrier gas was dry compressed air with pressure of 0.5 kPa, gain value was 7. Ammonia-methanol mixture was used to ultrasonic extract of astragaloside IV as well as *n*-butanol extraction. Preparation method of test solution was optimized through single-factor tests. **Result:** Optimal preparation method was as following: added methanol 80 mL and concentrated ammonia 40 mL, ultrasonic extraction for 30 min, purification by subsequent extraction with *n*-butanol for four times every 40 mL in sample preparation. The content of astragaloside IV from 11 batches of Astragali Radix by this optimizing method were significantly higher than the result determined by HPLC method in 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. **Conclusion:** This optimized sample preparation method is simple with less loss of effective constituents. UPLC analysis method is accurate and reliable with high sensitivity.

[Key words] Astragali Radix; astragaloside IV; determination; test solution; single factor test

黄芪主要化学成分为皂苷类、黄酮类和多糖类^[1-2]。黄芪甲苷是其主要活性成分之一,常作为黄芪药材质量控制的主要指标,一般采用 HPLC-

ELSD 测定^[3-6]。2010 年版《中国药典》黄芪【含量测定】中供试液的制备方法为正丁醇萃取,氨试液洗涤,过 D101 树脂。由于氨试液与待反应物质分

[收稿日期] 20140528(011)

[基金项目] 广东省粤港关键领域重点突破项目(2010A032100001);广东省战略性新兴产业核心技术攻关项目(2011A081403002);国家工业和信息化部扶持中药材生产建设项目(工信消费函[2012]138号);广东省部产学研结合项目(2010A090200064)

[第一作者] 刘和平,学士,高级工程师,从事中药新药开发与研究,Tel:0756-8135103,E-mail:pingzi6288@sina.com

[通讯作者] *曹晖,博士,研究员,从事中药新药开发与研究,Tel:0756-8135676,E-mail:caohui@livzon.com.cn

布于两相,接触不充分,致使含乙酰基的皂苷类成分皂化不完全,且制备方法繁琐,耗时较长。本实验在文献[7]的研究基础上,通过单因素试验优化黄芪甲苷含量测定中供试液的制备方法,建立黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法,为 2015 年版《中国药典》黄芪【含量测定】中样品的制备方法提供参考。

1 材料

1260 型快速高效液相色谱仪(G1311B 型四元泵,G1329B 型自动控温自动进样器,G4218A 型 ELSD 检测器,Chemstation 色谱工作站,美国安捷伦公司),CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110781-200613),甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。黄芪药材收集于山西大同(包括丽珠集团浑源 GAP 基地)和朔州等地区,经国家中药现代化工程技术研究中心曹晖研究员鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*,凭证标本存于国家中药现代化工程技术研究中心生药标本室,见表 1。

表 1 黄芪药材收集信息

Table 1 Informations of Astragali Radix

No.	凭证 标本号	产地	收集时间	栽培方式 或生长年限
1	H-01-042	山西浑源 GAP 基地	2011-03-23	半野生
2	H-01-057	山西浑源 GAP 基地	2011-03-23	半野生,一等品
3	H-01-046	山西五寨县	2011-03-23	野生
4	H-01-044	山西五寨县	2011-03-23	半野生
5	H-01-108	山西五寨县	2012-05-14	半野生
6	H-01-110	山西五寨县	2012-11-05	半野生
7	H-01-109	山西五寨县	2012-11-05	人工栽培,二年
8	H-01-111	山西五寨县	2013-02-02	人工栽培,三年
9	H-01-049	山西应县	2011-03-23	半野生
10	H-01-052	陕西榆林	2011-03-23	半野生,三等品
11	H-01-047	陕西榆林	2011-03-23	野生

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Agilent poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 2.7 μm),流动相乙腈-水(32:68),柱温 30 °C,流速 0.5 mL · min⁻¹,进样量 5 μL。ELSD 检测器温度 45 °C,载气干燥压缩空气,压力 0.5 kPa,增益值 7,分离度 ≥ 1.5。理论塔板数以黄芪甲苷峰计不低于 8 000。

2.2 对照品溶液制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 0.2 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试液制备方法对比 精密称取样品粉末 4 g (过 3 号筛),按《中国药典》2010 年版一部黄芪【含

量测定】项下方法制备供试品溶液 1。参考文献[7]方法,精密称取样品粉末(过 3 号筛)1 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 80 mL 和浓氨水 40 mL,密塞超声提取(45 kHz)30 min,用脱脂棉过滤,滤渣加甲醇洗涤 3 次,每次 10 mL,收集滤液,蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 12 cm),加水 50 mL 洗脱,弃去水洗液,加 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,得供试品溶液 2。在前期研究基础上,精密称取样品粉末(过 3 号筛)1 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 80 mL 和浓氨水 40 mL,密塞超声提取(45 kHz)30 min,用脱脂棉过滤,滤渣用甲醇洗涤 3 次,每次 10 mL,收集滤液,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,用水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 40 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,得供试品溶液 3。取同一批样品(H-01-44),按上述 3 种方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果黄芪甲苷提取量分别为 1.12,1.34,1.48 mg · g⁻¹,表明本文制定的供试液制备方法(供试品溶液 3)操作相对简单、重复性好、皂化更充分且处理过程中黄芪甲苷损失较少。

2.4 供试液制备方法考察

2.4.1 氨水用量 取同一黄芪粉末(H-01-44)1 g,共 6 份,各加入甲醇 80 mL,分别加入浓氨水 0,5,10,20,40,60 mL,混匀,按 2.3 项下供试品溶液 3 方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果黄芪甲苷提取量分别为 0.19,0.98,1.19,1.32,1.46,1.43 mg · g⁻¹,故选择氨水量 40 mL。

2.4.2 提取时间 取同一黄芪粉末(H-01-44)1 g,共 3 份,相同条件下分别超声 15,30,60 min,按 2.3 项下供试品溶液 3 的方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果黄芪甲苷提取量分别为 1.36,1.48,1.47 mg · g⁻¹,故选择超声时间 30 min。

2.4.3 提取次数 取黄芪粉末(H-01-44)1 g,按 2.3 项下方法 3 超声 1 次,加甲醇洗涤 3 次,药渣再超声第 2 次和第 3 次,按 2.1 项下色谱条件测定,结果第 2 次提取液测得的黄芪甲苷峰面积为前两次峰面积之和的 1.09%,表明超声 1 次基本可提取完全。

2.5 色谱条件优化及方法学考察

2.5.1 柱温 分别设置为 15,20,25,30,35 °C,其他条件同 2.1 项,结果表明 30 °C 时主要色谱峰分离

度及响应值最佳。

2.5.2 流速 流速分别选择 0.3, 0.5, 0.8 mL·min⁻¹, 其他条件同 2.1 项, 结果表明流速 0.5 mL·min⁻¹ 时主要色谱峰分离度较佳。

2.5.3 流动相耐受性 相同条件下改变流动相比比例 ±5%, 结果表明流动相耐受性良好。

2.5.4 线性关系考察 分别精密吸取 0.210 8 g·L⁻¹ 黄芪甲苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL 和 1.054 g·L⁻¹ 黄芪甲苷对照品溶液 4, 5 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以进样量对数与峰面积对数进行线性回归, 得线性方程 $Y = 1.55X + 2.51$ ($r = 0.999 2$), 线性范围 0.421 6 ~ 5.270 μg, 定量限度 0.105 4 μg。

2.5.5 精密密度试验 取同一供试品溶液按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 0.8%, 表明仪器精密密度良好。

2.5.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算黄芪甲苷峰面积 RSD 1.3%, 表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.5.7 重复性试验 取同一黄芪粉末 6 份, 按 2.3 项下供试品溶液 3 方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算黄芪甲苷平均提取量 1.457 mg·g⁻¹, RSD 0.8%, 表明该方法重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 取同一黄芪粉末 9 份, 按 80%, 100%, 120% 共 3 个水平分别加入黄芪甲苷对照品, 按 2.3 项下供试品溶液 3 方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算平均加样回收率 95% ~ 105%, RSD 均 < 3.0%, 表明该方法准确度良好。

2.6 样品测定 分别采用 2.3 项下供试品溶液 1 和 3 的方法制备样品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果见表 2。结果发现 11 批样品采用方法 3 测定的黄芪甲苷含量明显高于按《中国药典》2010 年版一部黄芪项下含测方法的测定结果。

表 2 不同产地黄芪样品中黄芪甲苷含量 (n = 2)

Table 2 Content of astragaloside IV in Astragali Radix from different habitats (n = 2) mg·g⁻¹

No.	标本号	方法 1	方法 3	No.	标本号	方法 1	方法 3
1	H-01-042	1.51	2.05	7	H-01-109	1.10	1.40
2	H-01-057	0.96	1.15	8	H-01-111	1.20	1.69
3	H-01-046	0.31	0.46	9	H-01-049	1.46	1.99
4	H-01-044	1.12	1.49	10	H-01-052	0.81	1.01
5	H-01-108	1.00	1.85	11	H-01-047	1.47	2.24
6	H-01-110	0.61	1.01				

3 讨论

《中国药典》2010 年版一部黄芪项下【含量测

定】测得的是黄芪中含量较高的多个乙酰基葡萄糖皂苷(黄芪皂苷 I, II 等)经过皂化反应脱去乙酰基而生成的黄芪甲苷^[8], 故可近似视为含乙酰基的总皂苷测定法, 由于供试品制备步骤中氨试液与待反应物质分布于两相, 接触并不充分。文献报道氨试液加入量和氨试液洗涤振荡后放置时间均会对黄芪甲苷含量产生影响, 故 2010 年版《中国药典》记载的方法可操作性和重复性不佳, 且因皂化不完全致测定结果偏低^[9]。本文优选的供试液制备方法是在文献[7]和 2010 年版《中国药典》记载方法的基础上加以改进的, 通过浓氨水与甲醇混合超声提取, 使皂化过程较充分, 测定结果更准确, 操作相对简单、杂质干扰少、重复性好, 且处理过程中因不过 D101 型大孔树脂使得黄芪甲苷损失相对较小, 与文献报道的黄芪甲苷经 D101 型树脂后会因吸附而损失约 10% 的结论一致^[10]。采用 UPLC-ELSD 快速检测黄芪甲苷含量, 比 HPLC 节省了一半的时间, 且本方法灵敏度、准确性、塔板数等均优于 HPLC。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283-284.

[2] 肖培根, 李大鹏, 杨世林, 等. 新编中药志. 一卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 876-893.

[3] 李翔, 朱臻宇, 朱东亮, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测梯度洗脱法测定黄芪药材中黄芪甲苷的含量[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(3): 331-333.

[4] 裴彩云, 王宗权, 贾继明, 等. HPLC-ELSD 内标法测定 8 个产地黄芪药材、饮片中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14): 1982-1984.

[5] 王辰, 侯连兵, 刘婵, 等. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液黄芪甲苷的含量[J]. 中药材, 2006, 29(6): 618-619.

[6] 段亚丽, 谢梅冬. 黄芪化学成分及其有效成分黄芪甲苷含量测定的研究现状[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(3): 35-37.

[7] 杜国军, 秦雪梅, 李震宇, 等. 山西省中药材标准地道黄芪含量测定方法的建立[J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(2): 134-138.

[8] 丁水平, 马宝瑕, 张锐, 等. 黄芪甲苷检测在黄芪及其制剂质控中的应用[J]. 中国药师, 2001, 4(5): 360-362.

[9] 姜勇, 金芳, 鲍忠, 等. 不同来源黄芪药材中黄芪甲苷的定量分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 930-933.

[10] 王春怡, 李卫民. HPLC-ELSD 法测定不同产地黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 144-145.

[责任编辑 刘德文]