

· 化学与分析 ·

HPLC-ELSD 分析蜜炙对黄芪中 3 种皂苷成分含量的影响

张乐林, 周倩, 孙立立*
(山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] 目的:建立黄芪饮片中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III 和黄芪甲苷的含量测定方法并分析蜜炙对黄芪皂苷含量的影响。方法:采用 HPLC-ELSD, 色谱条件为 Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.3% 甲酸溶液梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, ELSD 参数为漂移管温度 110 °C, 氮气体积流量 3.0 L·min⁻¹。结果:黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的线性范围分别为 0.804 ~ 8.04, 0.784 ~ 7.84, 0.406 ~ 4.06 μg, 平均加样回收率分别为 98.3%, 99.3%, 98.9%, RSD 分别为 2.46%, 1.89%, 2.38%。不同产地黄芪饮片中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷含量分别在 0.301 ~ 0.527, 0.186 ~ 0.303, 0.128 ~ 0.178 mg·g⁻¹。结论:建立的含量测定方法简单易行, 方法学验证符合要求。炙黄芪中黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 III 的含量高于生品, 但黄芪甲苷较生品降低, 说明蜜炙对黄芪皂苷类成分的含量产生了一定影响。

[关键词] 反相高效液相色谱-蒸发光散射法; 黄芪; 炙黄芪; 皂苷类成分; 含量测定

[中图分类号] R283.1; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0039-03

[doi] 10.11653/syfy2014020039

Effect of Honey Bake on Content of Three Saponins from Astragali Radix by HPLC-ELSD

ZHANG Le-lin, ZHOU Qian, SUN Li-li*
(Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine contents of astragaloside I, astragaloside III and astragaloside IV from Astragali Radix, then analyzed influence of honey-processed for astragaloside content. **Method:** HPLC-ELSD was adopted, Thermo Synchronis C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase consisting of acetonitrile-0.3% formic acid using a gradient elution, flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and column temperature at 25 °C, drifttube temprature of ELSD parameters was 110 °C, volume flow rate of nitrogen was 3.0 L·min⁻¹. **Result:** Astragaloside I, astragaloside III and astragaloside IV showed a good linear relationship in the range of 0.804-8.04, 0.784-7.84, 0.406-4.06 μg, the average recoveries of them were 98.3%, 99.3%, 98.9% with RSD of 2.46%, 1.89%, 2.38%, respectively. Contents of astragaloside I, astragaloside III and astragaloside IV from Astragali Radix in different places were 0.301-0.527, 0.186-0.303, 0.128-0.178 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This established method was simple and reliable, methodology validation met requirements. Contents of astragaloside I and astragaloside III from processed Astragali Radix were higher than raw materials, but astragaloside IV was opposite, indicating that honey-processed had an effect on the content of saponins.

[Key words] HPLC-ELSD; Astragali Radix; Astragali Radix Praeparata Cum Melle; saponins; determination

[收稿日期] 20130522(014)

[基金项目] 2010-2011 年中医药行业科研专项(20110700705); 山东省科技发展计划项目(2008GG30002056)

[第一作者] 张乐林, 硕士, 从事中药炮制研究, Tel:15966671238, E-mail:zhanglelin_01@163.com

[通讯作者] * 孙立立, 研究员, 从事中药新药与中药炮制原理研究, Tel:0531-82949829, E-mail:xingerx@163.com

黄芪始载于《神农本草经》，味甘、性温，具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效^[1]，是常用的经典补益中药。黄芪在临床应用时须经炮制，目前临床最常用的炮制规格为生黄芪与炙黄芪 2 种。研究证实生黄芪具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血等功效，蜜炙后其补益作用增强，功效以益气补中为主。有关黄芪蜜炙后补益作用增强的报道较多^[2-3]，但蜜炙后该作用增强的物质基础尚不明确。

黄芪中主要含有皂苷、黄酮、多糖、氨基酸及微量元素等多种化学成分，其中皂苷类为主要活性成分^[4-5]，该类成分除具有免疫调节作用外，还具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降糖和改善心血管疾病等广泛的生理活性^[6]。2010 年版《中国药典》黄芪【含量测定】项下仅列出对黄芪甲苷的含量测定方法，未对其他皂苷类成分作出要求。本实验采用 HPLC-ELSD^[7]，建立了黄芪饮片中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的含量测定方法，通过该方法比较生、炙黄芪饮片中皂苷类成分的含量差异，分析蜜炙对黄芪皂苷类成分含量的影响，为生、炙黄芪饮片的质量评价及黄芪临床的“生熟异用”提供实验依据。

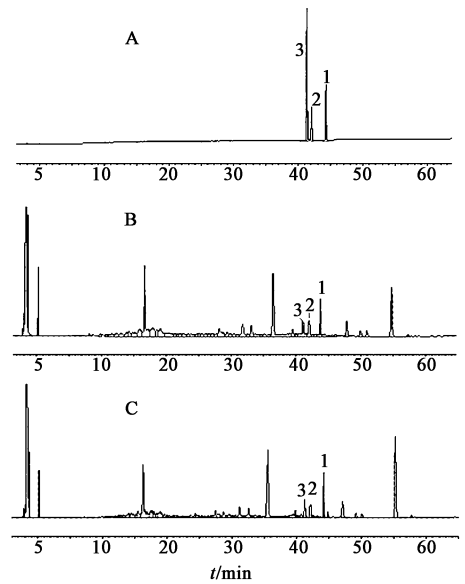
1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), Alltech 3300 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司), XS205DU 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), Milli-Q 型纯水发生器(美国 Millipore 公司)。生黄芪饮片购自山东博康中药饮片有限公司,产地分别为甘肃、内蒙、山西和河北,经山东省中医药研究院中药资源室主任林慧彬研究员鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 的干燥根,蜜炙黄芪饮片(自制),黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III 对照品(均购自上海丽臣商贸有限公司,批号分别为 120610, 120723),黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110781-200613),乙腈为色谱纯,水为 Millipore 纯水器 2 次制备水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.3% 甲酸溶液(B) (0 ~ 20 min, 10% ~ 25% A; 20 ~ 35 min, 25% ~ 35% A; 35 ~ 40 min, 35% ~ 45% A; 40 ~ 50 min, 45% A; 50 ~ 65 min, 45% ~ 65% A; 65 ~ 70 min, 65% ~ 80% A), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C,

ELSD 参数为漂移管温度 110 °C, 氮气体积流量 3.0 L · min⁻¹, 见图 1。



A. 混合对照品; B. 生黄芪; C. 炙黄芪;
1. 黄芪皂苷 I; 2. 黄芪皂苷 III; 3. 黄芪甲苷

图 1 黄芪 HPLC-ELSD

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取五氧化二磷减压干燥至恒重的黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷对照品适量,加甲醇溶解,制成质量浓度分别为 0.402, 0.392, 0.203 g · L⁻¹ 的混合溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品细粉约 4 g,精密称定,置索氏提取器中,加甲醇适量,冷浸过夜,加热回流至无色,提取液回收溶剂至干,残渣加水 5 mL 微热使溶解,放冷,通过 AB-8 型树脂柱(1.5 cm × 12 cm),加水 50 mL 洗脱,弃去水洗液,用 20% 乙醇 50 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 85% 乙醇 100 mL 洗脱,收集 85% 乙醇洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2, 6, 10, 15, 20 μL 注入液相色谱仪,按 2.1 项下方法测定,以峰面积的对数值为纵坐标,对照品进样量的对数值为横坐标,得黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷回归方程分别为 $\lg Y_1 = 1.012 \lg X_1 + 12.950$ ($r_1 = 0.9996$), $\lg Y_2 = 1.0005 \lg X_2 + 12.963$ ($r_2 = 0.9998$), $\lg Y_3 = 1.0154 \lg X_3 + 13.253$ ($r_3 = 0.9996$), 线性范围分别为 0.804 ~ 8.04, 0.784 ~ 7.84, 0.406 ~ 4.06 μg。

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液 10 μL,连续进样 5 次,按 2.1 项下方法测定,结果黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷峰面积的 RSD 分别为 1.65%, 1.83%, 1.95%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于制备后0,2,4,8,12 h进样10 μL ,按2.1项下方法测定,结果黄芪皂苷I、黄芪皂苷III、黄芪甲苷峰面积的RSD分别为1.29%,0.93%,1.64%,表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.7 重复性试验 取同一批黄芪样品(产地内蒙)6份,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下方法测定,结果测得黄芪皂苷I、黄芪皂苷III、黄芪甲苷平均质量分数分别为0.341,0.252,0.166 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为1.56%,1.18%,1.56%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的黄芪样品(产地内蒙)2 g,共6份,分别精密加入黄芪皂苷I、黄芪皂苷III、黄芪甲苷对照品适量,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下方法测定,计算加样回收率,结果平均回收率分别为98.3%,99.3%,98.9%,RSD分别为2.46%,1.89%,2.38%。

2.9 样品测定 取不同产地生黄芪和制备的炙黄芪饮片,照2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下方法测定,计算3种皂苷类成分的含量,见表1。结果发现4个不同产地的黄芪药材均含有黄芪皂苷I、黄芪皂苷III和黄芪甲苷,但产地不同,皂苷类成分的含量存在较大差异;黄芪皂苷I和黄芪皂苷III经蜜炙后含量明显高于生品,不同产地黄芪中黄芪甲苷I、黄芪皂苷III的升高比例分别在9.87%~48.17%,22.70%~47.44%,而黄芪甲苷则相反,

表1 不同产地生、炙品黄芪中3种皂苷类成分的含量测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

产地	样品	黄芪皂苷I	黄芪皂苷III	黄芪甲苷
甘肃	黄芪	0.301	0.186	0.169
	炙黄芪	0.446	0.227	0.163
内蒙	黄芪	0.345	0.252	0.166
	炙黄芪	0.492	0.314	0.155
山西	黄芪	0.527	0.303	0.178
	炙黄芪	0.579	0.427	0.161
河北	黄芪	0.384	0.156	0.128
	炙黄芪	0.483	0.230	0.122

蜜炙后含量较生品降低,降低比例在3.68%~10.56%。

3 讨论

通过对4个产地黄芪饮片中皂苷类成分的含量测定,发现3种成分的含量差异较大,均以山西产地的含量最高,可能是由于产地的环境、气候甚至种植方面的差异造成,也可能与黄芪的生长年限有一定关系。

皂苷类成分是黄芪中主要成分,与黄芪的药理作用密不可分,蜜炙对皂苷类成分产生的影响与黄芪炮制后功效的变化必然存在一定内在联系。本研究对蜜炙前后黄芪饮片中3种皂苷类成分的含量进行比较,通过对同批次生、炙黄芪饮片进行含量测定,发现黄芪经蜜炙后黄芪皂苷I和黄芪皂苷III的含量均高于生品,而黄芪甲苷含量却较生品降低,表明蜜炙对黄芪各皂苷成分的含量产生了不同影响,推测该类成分变化也可能与黄芪炮制后疗效的变化有一定关联。

[参考文献]

- [1] 肖培根.新编中药志·第5卷[M].北京:化学工业出版社,2002:8772.
- [2] 李兴尚,陈佳,徐自升,等.黄芪炮制前后相关化学成分的变化研究[J].中国药房,2012,23(15):1399.
- [3] 田圣志,杨玉涛,张振凌,等.HPLC测定黄芪蜜炙前后毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量[J].中成药,2010,32(8):1365.
- [4] 王平,梁逸曾.HPLC-DAD-MS研究黄芪的化学成分[J].中草药,2011,42(2):226.
- [5] WANG Y P, LI X Y, SONG C Q, et al. Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(3):263.
- [6] 张蕾,高文远,满淑丽.黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(21):3203.
- [7] 赵强强,韩丽,欧水平,等.HPLC-ELSD测定黄芪提取物中黄芪皂苷I, II及乙酰黄芪皂苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):56.

[责任编辑 全燕]