

黄芪 4 种皂苷提取物的制备 及其在黄芪总皂苷含量测定中的应用

周超^{1,2}, 何轶², 林瑞超², 鲁静^{2*}

(1. 齐齐哈尔市食品药品检验检测中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161000;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] **目的:**制备黄芪 4 种皂苷提取物,探讨选择皂苷提取物替代黄芪甲苷对黄芪总皂苷进行含量测定的可行性。**方法:**采用 HPLC-ELSD 测定,色谱条件为 Phenomenex 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。建立黄芪 4 种皂苷提取物的含量测定方法,并与外标测定法进行比较。**结果:**黄芪 4 种皂苷提取物方法学考察中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 的线性范围分别为 50.6 ~ 810, 54.3 ~ 869, 56.2 ~ 899, 58.3 ~ 934 mg·L⁻¹, 平均加样回收率分别为 99.9%, 100.1%, 99.8%, 99.8%, RSD 分别为 0.4%, 0.4%, 0.7%, 0.4%。黄芪 4 种皂苷提取物的含量测定方法与外标测定法的 RSD 均 < 3.0%。**结论:**黄芪 4 种皂苷提取物可用于测定黄芪药材中总皂苷含量,该方法简单易行,符合方法学验证。

[关键词] HPLC-ELSD; 黄芪皂苷提取物; 含量测定; 外标法; 方法学考察

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0056-04

[doi] 10.11653/syfy2013220056

Preparation and Application in Determination of Four Saponin Extracts from Astragali Radix

ZHOU Chao^{1,2}, HE Yi², LIN Rui-chao², LU Jing^{2*}

(1. Qiqihar Food and Drug Inspection and Testing Center, Qiqihar 161000, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare four saponin extracts from Astragali Radix, and investigated feasibility of saponin extracts instead of astragaloside IV as control components in determination of total saponins in Astragali Radix. **Method:** HPLC-ELSD was adopted, separation was performed on a phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase consisted of acetonitrile and 0.3% formic acid with gradient elution. Determination of four saponin extracts from Astragali Radix was established, and compared with external standard assay. **Result:** In methodological study of four saponin extracts from Astragali Radix, linear ranges of astragaloside I, astragaloside II, astragaloside III and astragaloside IV were 50.6-810, 54.3-869, 56.2-899, 58.3-934 mg·L⁻¹, respectively; Average recoveries were 99.9%, 100.1%, 99.8%, 99.8% with RSD were 0.4%, 0.4%, 0.7%, 0.4%, respectively. Relative deviation between external standard assay and determination of four saponin extracts from Astragali Radix was less than 3.0%. **Conclusion:** Four saponin extracts from Astragali Radix could be applied for determining the content of total saponins from Astragali Radix, this method was simple, convenient and fulfilled method validation.

[Key words] HPLC-ELSD; saponin extracts from Astragali Radix; determination; external standard assay; methodological study

[收稿日期] 20130423(017)

[第一作者] 周超, 硕士, 中级研究员, 从事中药分析研究, Tel: 14704653569, E-mail: zesyyk@163.com

[通讯作者] * 鲁静, 教授, 从事药物质量控制研究, Tel: 010-67095387, E-mail: lujing@nicbpb.org.cn

《中国药典》2010年版一部黄芪项下记载了黄芪甲苷的鉴别和含量测定项^[1]。黄芪中皂苷类成分(以黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 和黄芪皂苷 IV 为主)具有调节免疫、抗氧化、保肝、抗癌、抗疲劳和耐缺氧^[2-5]等药理作用。本实验探索选用黄芪中4种皂苷类成分对照提取物替代黄芪甲苷,即以黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 和黄芪皂苷 IV 为标示成分,结合黄芪药材及其相关制剂的研究情况^[6-7],采用 HPLC-ELSD 对黄芪总皂苷进行多指标成分的含量测定,以实现多组分控制药材质量。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),2000 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司)。黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 对照品(经峰面积归一化法测定,纯度均 $\geq 98\%$)和黄芪皂苷类成分提取物(实验室自制),D4020, AB-8 型大孔吸附树脂(天津南开),SBC-MCI-GEL 反相填料 F 型(成都科谱生物有限公司),MCI 树脂(MCI GEL CHP20P 75~150 μm ,日本三菱公司),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

黄芪购自各药材市场,经中国食品药品检定研究院张继老师鉴定,编号 1(1003,黑龙江),2(0401,安徽亳州),3(0702,黑龙江)为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根;编号 4(9905,安徽亳州),5(0106,安徽亳州),6(北京某药材公司),7(北京某药店,饮片),8(内蒙),9(甘肃),10(安国药材市场)为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 黄芪4种皂苷提取物的提取分离与纯化

2.1.1 黄芪提取物的制备 取黄芪粗粉 3.0 kg,加 3 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至无醇味,加 5 倍量水稀释,过滤。滤液通过预先处理好的 D4020 型大孔吸附树脂柱(1.2 kg),水洗至无色,用 80% 乙醇洗脱,直至洗脱液无色或无皂苷反应为止,合并洗脱液,60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至稠膏 1 kg,即得黄芪粗提物。

2.1.2 黄芪总皂苷的精制 取黄芪粗提物(上样 2 次,每次 500 g),用 95% 乙醇溶解,通过 AB-8 型大孔树脂,分别用去离子水、30% 乙醇、50% 乙醇各 3 BV 洗脱,弃去洗脱液,加 70% 乙醇洗脱至薄层检测无皂苷反应,收集 70% 乙醇洗脱液,浓缩蒸干,得粗黄芪总皂苷 85.177 g。

2.1.3 黄芪4种皂苷提取物的制备 取粗黄芪总皂苷,用 50% 乙醇溶解,通过 MCI 树脂柱(国产),依次用去离子水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇、40% 乙醇各 3 BV 洗脱,弃去洗脱液,加 50% 乙醇洗脱至薄层检测无皂苷成分斑点,收集 50% 乙醇洗脱液,浓缩蒸干,得黄芪总皂苷 20.217 g 与黄芪皂苷 IV 32.67 mg。取黄芪总皂苷用 70% 甲醇溶解,通过 MCI 树脂柱(进口),依次用 50% 甲醇、70% 甲醇、75% 甲醇、80% 甲醇、83% 甲醇各 3 BV 洗脱,加 85% 甲醇洗脱至薄层检测无皂苷成分斑点,收集体积分数 75%~85% 的甲醇洗脱液,浓缩,冷冻离心收干,得黄芪 4 种皂苷提取物 6.283 g。

2.2 黄芪4种皂苷提取物方法学验证与纯度测定

2.2.1 色谱条件 Phenomenex C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.3% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 10% A; 15~20 min, 25% A; 20~35 min, 25%~34% A; 35~40 min, 34%~45% A; 40~50 min, 45% A; 50~60 min, 45%~10% A),流速 1 mL \cdot min⁻¹,进样量 10 μL 。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取五氧化二磷中减压干燥至恒重的各对照品,用甲醇分别配成黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 质量浓度分别为 1.013, 1.086, 1.124, 1.167 g \cdot L⁻¹ 的储备液,备用。

2.2.3 供试品溶液的配制 取黄芪 4 种皂苷提取物约 10 mg 至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察 精密量取 2.2.2 项下各储备液 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 8.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,以对照品质量浓度对数值为横坐标,峰面积对数值为纵坐标,得黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 回归方程分别为 $\lg Y = 1.435 \lg X + 2.29$ ($r = 0.9997$), $\lg Y = 1.59 \lg X + 2.161$ ($r = 0.9995$), $\lg Y = 1.149 \lg X + 2.59$ ($r = 0.9996$), $\lg Y = 1.763 \lg X + 2.48$ ($r = 0.9995$),线性范围分别为 50.6~810, 54.3~869, 56.2~899, 58.3~934 mg \cdot L⁻¹。

2.2.4.2 精密度试验 取供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,结果黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 1.2%, 1.0%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液于室温下放

置,分别于 0,2,4,8,12,24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,测得黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 峰面积的 RSD 分别为 1.2%,0.9%,1.3%,0.9%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

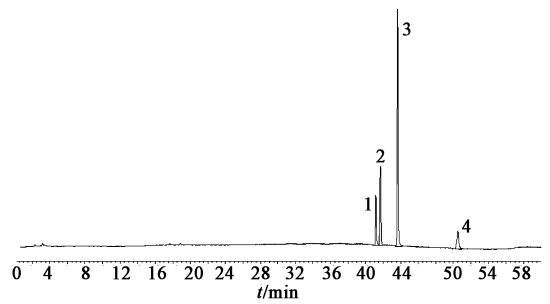
2.2.4.4 重复性试验 取黄芪 4 种皂苷提取物样品 6 份,分别按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,测得黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 峰面积的 RSD 分别为 2.2%,1.5%,1.4%,2.5%,表明该方法重复性良好,样品混合均匀。

2.2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的黄芪 4 种皂苷提取物约 10 mg,精密称定 6 份,分别精密加入黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 储备液各 1 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 黄芪 4 种皂苷提取物含量测定的加样回收试验

成分	样品中质量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
黄芪皂苷 I	0.465 6	1.013	1.480 0	100.1	99.9	0.4
	0.470 6		1.476 4	99.3		
	0.463 6		1.476 6	100.0		
	0.469 5		1.478 4	99.6		
	0.475 5		1.491 5	100.3		
	0.470 0		1.479 0	99.6		
黄芪皂苷 II	2.968 5	1.086	4.053 4	99.9	100.1	0.4
	3.000 0		4.082 7	99.7		
	2.955 4		4.051 2	100.9		
	2.993 4		4.077 2	99.8		
	3.031 6		4.119 8	100.2		
	2.996 6		4.082 6	100.0		
黄芪皂苷 III	1.178 2	1.124	2.303 3	100.1	99.8	0.7
	1.190 6		2.311 4	99.7		
	1.172 9		2.303 7	100.6		
	1.188 0		2.296 4	98.6		
	1.203 2		2.329 4	100.2		
	1.189 0		2.310 7	99.8		
黄芪皂苷 IV	0.221 2	1.167	1.385 9	99.8	99.8	0.4
	0.223 6		1.382 8	99.3		
	0.220 2		1.388 4	100.1		
	0.2231		1.385 4	99.6		
	0.226 0		1.397 6	100.4		
	0.223 3		1.388 0	99.8		

2.2.5 黄芪中 4 种皂苷提取物纯度的测定 取黄芪 4 种皂苷提取物 10 mg,精密称定,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,记录色谱峰面积,计算黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV 平均质量分数($n=2$)分别为 9.05%,57.70%,22.90%,4.30%,RSD 分别为 0.6%,0.9%,1.7%,1.2%,总皂苷纯度 93.95%,见图 1。



1. 黄芪皂苷 IV;2. 黄芪皂苷 III;3. 黄芪皂苷 II;4. 黄芪皂苷 I

图 1 黄芪 4 种皂苷提取物 HPLC

2.3 黄芪中 4 种皂苷类成分的含量测定 以制备的黄芪 4 种皂苷提取物为对照,采用 HPLC-ELSD 按 2.2.1 项下色谱条件进样分析,建立黄芪药材中 4 种皂苷成分的含量测定方法。

2.3.1 供试品溶液的制备 取黄芪中粉约 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,提取液回收溶剂并浓缩至干,残渣加水 5 mL 微热使溶解,放冷,通过 AB-8 型树脂柱(内径 1.5 cm,长 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,用 85% 乙醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.3.2 样品测定 取收集的 10 批样品适量,粉碎成中粉,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以黄芪 4 种皂苷提取物为对照品,测定黄芪药材中各成分含量,结果见表 2,见图 2。

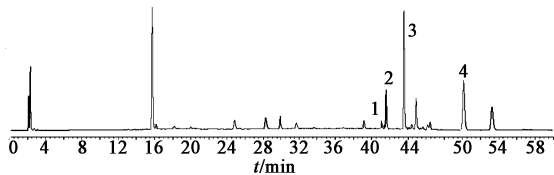
2.3.3 测定结果比较 取 2.2.2 项下各对照品溶液,采用黄芪 4 种皂苷提取物和 4 种对照品平行测定 10 批黄芪药材中皂苷含量,结果见表 3。

3 讨论

黄芪皂苷的现行含量测定方法主要有 2 种。①将黄芪碱性处理,促使黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 均转化为黄芪皂苷 IV,测定黄芪皂苷 IV 含量即可^[8]。但这种转化受碱性条件和提取条件等影响,很难达

表2 黄芪药材中4种皂苷成分的含量测定 %

No.	黄芪皂苷 I	黄芪皂苷 II	黄芪皂苷 III	黄芪皂苷 IV	皂苷总量
1	0.012 1	0.056 1	0.025 5	0.000 7	0.068 9
2	0.024 0	0.038 6	0.011 7	0.000 6	0.074 9
3	0.019 1	0.033 7	0.021 0	0.000 2	0.074 0
4	0.021 0	0.026 0	0.019 4	0.000 4	0.066 8
5	0.036 7	0.011 7	0.027 9	0.000 4	0.076 7
6	0.013 9	0.028 1	0.031 6	0.000 3	0.073 9
7	0.021 3	0.016 2	0.018 1	0.000 2	0.055 8
8	0.027 2	0.011 3	0.006 1	-	0.044 6
9	0.028 3	0.010 9	0.008 9	0.000 3	0.048 4
10	0.026 9	-	0.010 4	0.000 1	0.037 4



1. 黄芪皂苷 IV; 2. 黄芪皂苷 III; 3. 黄芪皂苷 II; 4. 黄芪皂苷 I

图2 黄芪药材中4种皂苷成分 HPLC

表3 黄芪4种皂苷提取物法与外标法含量测定对比(n=2) %

No.	黄芪4种皂苷 提取物测定	外标法测定	RSD
1	0.068 9	0.071 1	1.6
2	0.074 9	0.073 1	1.2
3	0.074 0	0.076 6	1.7
4	0.066 8	0.063 9	2.2
5	0.076 7	0.078 6	1.2
6	0.073 9	0.071 7	1.5
7	0.055 8	0.058 7	2.5
8	0.044 6	0.046 1	1.5
9	0.048 4	0.050 7	2.3
10	0.037 4	0.035 3	2.9

到完全转化,不能客观真实地反映黄芪皂苷的真实含量。②采用对照品外标法测定,该方法虽能客观反映黄芪皂苷的真实含量,但黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 难以制备和纯化,实验成本较高,实际应用存在一定局限性。采用黄芪皂苷提取物对黄芪药材进行含量测定,既能同时测定4种皂苷,又降低了实验成本,具有应用可行性。

在3批膜荚黄芪与7批蒙古黄芪中,膜荚黄芪即样品1~3中黄芪皂苷 II 含量偏高;蒙古黄芪样品5,8~10中黄芪皂苷 I 含量偏高。黄芪皂苷 III 和黄芪皂苷 IV 无明显的变化趋势,这种趋势是否具有代表性,还需大量样品和实验数据进行论证。由10批样品的实验数据和文献[9]可知,黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 的含量普遍高于黄芪皂苷 III 和黄芪皂苷 IV,采用黄芪皂苷提取物 HPLC-ELSD 测定4种皂苷的含量更能简捷、直接、真实、客观反映黄芪药材的质量,选择建立黄芪4种皂苷多组分测定是基于其显著的药理作用和明显的组分特征,为黄芪的多组分同时检测及质量标准改善提供新思路 and 参考数据。

[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.
- [2] 杨小敏,张天一,朱昌来,等. 黄芪皂苷对培养的小鼠腹腔巨噬细胞的激活作用[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8):1625.
- [3] 王要军,权启镇,孙自勤,等. 黄芪对实验性肝纤维化组织 ICAM-1 表达影响的免疫组化研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2000,5(1):49.
- [4] 王迎新,李华,陈敏珠. 黄芪提取物的抗疲劳和耐缺氧作用[J]. 中国实用医药,2007,2(9):43.
- [5] 王润田,单保恩,李巧霞,等. 黄芪提取物免疫调节活性的体外实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2002, 22(6):453.
- [6] 覃红萍,鲁静,林瑞超. HPLC-ELSD 法测定黄芪药材中黄芪皂苷 I、II、III、IV [J]. 中草药,2009, 40(3):471.
- [7] 汪红,王强. HPLC-ELSD 法测定黄芪及其注射液黄芪皂苷 IV, III, I 的含量[J]. 中国药学杂志,2002,37(4):298.
- [8] 刘孜,周晶,张庆伟,等. 氨液水解法用于提高黄芪中黄芪甲苷含量的工艺研究[J]. 中国中药杂志,2008, 33(6):635.
- [9] 汪祺,张聿梅,戴忠,等. 黄芪药材 HPLC 特征图谱研究(1) 皂苷类成分 [J]. 药物分析杂志,2012, 32(6):1101.

[责任编辑 仝燕]