

# SPE-HPLC-ELSD 法测定复方藏药制剂 肝纤消颗粒中黄芪甲苷的含量

江宝红<sup>1</sup>, 黄一平<sup>2\*</sup>, 鞠建明<sup>2</sup>, 刘汉清<sup>1</sup>, 蔡雪萍<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 建立 SPE-HPLC-ELSD 法测定复方藏药制剂肝纤消颗粒中黄芪甲苷含量的方法。方法: 采用固相萃取系统对肝纤消颗粒进行处理, 色谱柱为 Alltima C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (33:67), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, ELSD 漂移管温度 110 °C, 载气流量 2.7 L·min<sup>-1</sup>, 进样量 20 μL。结果: 黄芪甲苷在 1.014 ~ 20.280 μg 峰面积积分值自然对数与进样量自然对数有良好的线性关系线,  $r = 0.9993$ ; 平均加样回收率为 100.1%, RSD 2.6%。结论: 该方法操作简单, 准确, 重复性好, 可用于藏药肝纤消颗粒的质量控制。

**[关键词]** 藏药; 肝纤消颗粒; 黄芪甲苷; 固相萃取-高效液相色谱-蒸发光检测

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0069-03

## Determination of Astragaloside in Tibetan Medicine Preparation Ganxianxiao Granules by SPE-HPLC-ELSD

JIANG Bao-hong<sup>1</sup>, HUANG Yi-ping<sup>2\*</sup>, JU Jian-ming<sup>2</sup>, LIU Han-qing<sup>1</sup>, CAI Xue-ping<sup>1</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an analysis method to determine astragaloside in Tibetan medicine Preparation Ganxianxiao granules by SPE-HPLC-ELSD. **Method:** Samples were processed by the SPE, and determined on an Alltima C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted acetonitrile-water (33:67) with flow rate at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature at 35 °C, while drift tube temperature was 110 °C of ELSD, by the carrier flow was 2.7 L·min<sup>-1</sup>, and injection volume was 20 μL. **Result:** The linear ranges of astragaloside was 1.014-20.280 μg ( $r = 0.9993$ ), with the average recovery were of 100.1% (RSD 2.6%). **Conclusion:** The method is simple, accurate, reproducible and it can be used for the quality control of Tibetan medicine Preparation Ganxianxiao granules.

**[Key words]** Tibetan medicine; Ganxianxiao granules; astragaloside; SPE-HPLC-ELSD

肝纤消颗粒系西藏民间验方, 处方由人工牛黄、伞梗虎耳草、余甘子、黄芪、甘草等 10 多味药材组

成, 具有清肝利胆、活血化痰、健脾和胃的功效, 用于肝纤维化的治疗。该制剂质量标准中已经建立了人工牛黄中胆酸的含量测定方法<sup>[1]</sup>, 但其在制备过程中人工牛黄没有经过提取直接加入, 因此仅测定胆酸不能很好控制肝纤消颗粒的质量。为此, 我们选择了水煎煮提取工艺代表性药味黄芪中的指标成分黄芪甲苷, 建立了 SPE-HPLC-ELSD 含量测定方法<sup>[2-3]</sup>, 为更好地控制肝纤消颗粒的质量提供了实验依据。

**[收稿日期]** 20110825(009)

**[基金项目]** 江苏省社会发展项目 (BS2007089); 拉萨市科技局重大科技项目 (200414)

**[第一作者]** 江宝红, 在读硕士生, 从事中药新制剂和新剂型, Tel: 025-85639640, E-mail: jiangbaohong2007@126.com

**[通讯作者]** \* 黄一平, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新药, 藏药研究, Tel: 025-85637809, E-mail: yiping@163.com

### 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (Alliance 2695 四元

泵及自动进样系统)、Alltech ELSD 2000 检测器、Empower 色谱工作站;Millipore Milli-Q 纯水器(美国);METTLER 1/万及 1/10 万电子天平(瑞士);Supelclean ENVI-18 固相萃取小柱(505706, 1 g/6 mL,批号 2366701,美国 Supelco)及固相萃取系统。

乙腈(色谱纯,批号 1101499,上海星可生化有限公司),甲醇(色谱纯,批号 110738,江苏汉邦科技有限公司),氨水(分析纯,批号 100505300263,南京化学试剂有限公司),超纯水(实验室自制);对照品(黄芪甲苷为中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用,批号 110781-200613,经 HPLC 纯度检查,用面积归一化法计算,纯度为 99.89%)。肝纤消颗粒(由江苏省中医药研究院提供,批号 20110608,20110610,20110612)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Alltima C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(33:67);流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 35 °C;ELSD 漂移管温度 110 °C;载气流量 2.7 L·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL。

### 2.2 溶液的制备

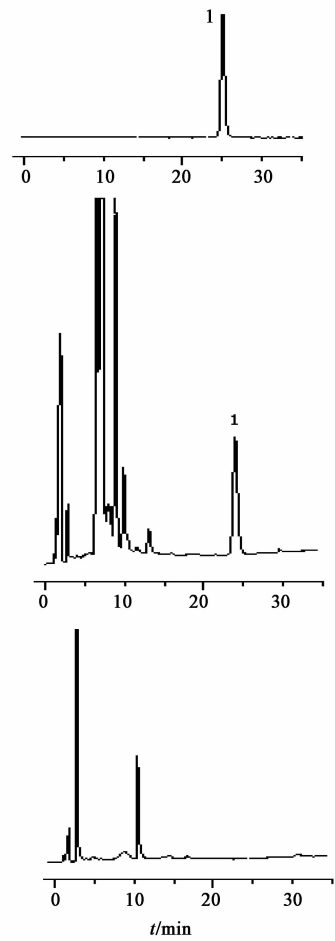
**2.2.1 对照品溶液** 精密称取黄芪甲苷对照品 5.07 mg,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度为 1.014 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,吸取该对照品溶液 2 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.410 4 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,备用。

**2.2.2 供试品溶液** 精密称取肝纤消颗粒 5.0 g,置 150 mL 平底烧瓶中,精密加入回流液(60% 甲醇-浓氨水 10:1)25 mL,密塞,称重,于 85 °C 水浴回流 1 h,取出,放冷,称定质量,用回流液补足减失的质量,摇匀,离心(4 500 r·min<sup>-1</sup>,15 min),吸取上清液,精密量取 20 mL 置烧瓶中,加入固相萃取小柱中,用 60% 甲醇 5 mL 少量多次洗涤烧瓶,并转移至固相萃取小柱,弃去洗脱液,再用蒸馏水约 10 mL 洗脱至无色,弃去水洗脱液,用甲醇 5 mL 洗脱至 5 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**2.2.3 供试品溶液** 按处方比例制备不含黄芪的颗粒,并按 2.2.2 项下方法制备阴性样品溶液,即得。

**2.3 专属性试验** 分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液注入色谱仪,按照 2.1 项下色谱条件进样。结果,阴性对照溶液在各对照品相同保留

时间处未见明显色谱峰,表明阴性对照无干扰,色谱详见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 黄芪甲苷

图 1 黄芪甲苷 HPLC 图谱

**2.4 线性范围的考察** 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液(1.014 g·L<sup>-1</sup>)1.0,4.0,8.0,12.0,16.0,20.0 μL,以进样量(μg)自然对数为横坐标,峰面积自然对数为纵坐标,求得其回归方程为  $Y = 1.92 X + 4.81$ ( $r = 0.9993$ )。结果表明,在 1.014 ~ 20.280 μg,黄芪甲苷峰面积积分值自然对数与进样量自然对数有良好的线性关系。

**2.5 精密度试验** 精密吸取对照品溶液(0.410 4 g·L<sup>-1</sup>),连续进样 6 次,每次 20 μL,峰面积的 RSD 2.4%。结果表明本法精密度良好。

**2.6 重复性试验** 精密称取同一批(批号 20110608)肝纤消颗粒 5 份,按 2.2.2 项下制备方法分别制备供试品溶液,测得峰面积并计算含量,黄芪甲苷含量 RSD 为 1.9%,表明重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 精密称定肝纤消颗粒(批号 20110608)5 g,按供试品溶液的制备方法制备样品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10 h 测定,计算其峰面积

和浓度 RSD 分别为 3.38%, 1.80%, 结果表明样品在 10 h 内稳定性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取肝纤消颗粒(批号为 20110608, 黄芪甲苷平均含量为  $0.2430 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

2.5 g, 精密称定, 共 5 份, 分别加入黄芪甲苷对照品

0.615 mg, 按供试品制备方法制得供试品溶液, 注入液相色谱仪, 计算回收率, 结果见表 1。

**2.9 样品测定** 取 3 个批次(批号分别为 20110608, 20110610, 20110612)的样品各 2 份, 按供试品溶液的制备方法处理样品, 测定含量, 结果见表 2。

表 1 黄芪甲苷加样回收率试验 ( $n=5$ )

称样量	样品中含量	加入量	测出量	回收率	平均回收率	RSD
/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
2.5003	0.6076	0.6150	1.2231	100.1		
2.5002	0.6075	0.6150	1.2169	99.1		
2.5031	0.6083	0.6150	1.2206	99.6	100.1	2.6
2.5067	0.6091	0.6150	1.2503	104.3		
2.5002	0.6076	0.6150	1.2081	97.7		

表 2 样品中黄芪甲苷的测定 ( $n=2$ )

样品	峰面积	黄芪甲苷	平均值
		$/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	$/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
20110608-1	1 083 972	0.2411	0.2434
20110608-2	1 121 059	0.2456	
20110610-1	1 104 774	0.2453	0.2472
20110610-2	1 147 567	0.2490	
20110612-1	1 171 540	0.2485	0.2481
20110612-2	1 172 578	0.2476	

### 3 讨论

本实验通过参考相关文献<sup>[4-5]</sup>确定了 60% 甲醇-浓氨水为提取液。同时结合黄芪甲苷的性质, 对影响供试品制备过程中主要因素浓氨水的加入量进行了考察, 对不同比例 60% 甲醇-浓氨水(20:1, 10:1, 8:1, 5:1)溶液进行比较。结果表明 60% 甲醇-浓氨水(10:1)作为提取液时, 黄芪甲苷含量可达到最大, 故选择以 60% 甲醇-浓氨水(10:1)为提取溶剂。

实验还对甲醇洗脱量进行了考察, 分 4 次收集 20 mL 甲醇洗脱液, 每次 5 mL, 结果发现, 第 2 次的甲醇洗脱液中没有黄芪甲苷的峰出现, 说明样品中的黄芪甲苷在第 1 个 5 mL 的甲醇洗脱液中已被全部洗脱下来, 故确定甲醇洗脱量为 5 mL。

文献报道<sup>[6-7]</sup>黄芪甲苷的含量测定多用水饱和和正丁醇萃取 HPLC-ELSD 法。本实验对水饱和和正丁醇萃取法和固相小柱萃取法进行了比较, 前者较之后者, 操作繁琐, 溶剂用量多, 耗时较长, 由于处方中药味较多, 采用水饱和和正丁醇萃取处理后的样品中其他杂峰对黄芪甲苷峰干扰明显, 分离度较差, 而采用固相萃取小柱对样品进行处理, 进样后黄芪甲苷

峰达到基线分离, 无杂峰干扰; 从测定的结果来看, 前者测得样品中黄芪甲苷含量为  $0.1769 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 后者为  $0.2434 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 可见, 采用水饱和和正丁醇法测定时, 黄芪甲苷含量损失大, 使测定结果欠准确。本文采用固相萃取结合高效液相色谱法测定复方藏药制剂肝纤消颗粒中黄芪甲苷的含量, 操作简便, 结果可靠。

### [参考文献]

- [1] 徐梦丹, 鞠建明, 黄一平, 等. HPLC-ELSD 法测定复方藏药制剂肝纤消颗粒中胆酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 39.
- [2] 卢彦琦, 贺学礼. 黄芪化学成分及药理作用综述[J]. 保定师范专科学校学报, 2004, 17(4): 40.
- [3] 陈英红, 黄恩喜, 高阳, 等. 高效液相色谱法测定骨炎灵丸中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, (6): 14.
- [4] 沈红, 钱大玮, 段金廛, 等. SPE-HPLC-ELSD 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(1): 45.
- [5] 沈红, 钱大玮, 段金廛, 等. SPE-HPLC-ELSD 法测定黄芪配方颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中成药, 2006, 28(5): 761.
- [6] 张彤, 黄顺旺. HPLC-ELSD 测定前列舒乐颗粒中的黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 82.
- [7] 刘君, 袁媛, 姜泓. ELSD-HPLC 法测定益正片中黄芪甲苷的含量[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(6): 1278.

[责任编辑 蔡仲德]