

当归补血汤颗粒中黄芪甲苷和黄芪多糖的含量测定

涂波*, 汪志勇

(贵阳医学院化学教研室, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**探讨当归补血汤颗粒中黄芪甲苷和黄芪多糖的含量测定方法。**方法:**采用高效液相色谱法测定黄芪甲苷的含量,采用苯酚-硫酸比色法测定黄芪多糖的含量,旨在为自制的当归补血汤颗粒质量评价奠定基础。**结果:**黄芪甲苷和黄芪多糖的平均回收率分别为 97.64%、97.61%,RSD 分别为 2.10%、3.20%。**结论:**采用高效液相色谱法测定黄芪甲苷的含量,高效液相色谱法能实现黄芪甲苷与有关物质的有效分离,黄芪甲苷峰形好,含量测定结果重复性好;所用测定黄芪多糖含量的苯酚-硫酸比色法,具有准确可靠、灵敏度高、重现性好等优点,可用于评价当归补血汤颗粒质量的有效方法。

[关键词] 当归补血汤颗粒;黄芪甲苷;黄芪多糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0115-03

Astragaloside and Astragalan Determination in Angelicae Sinensis Decoction for Supplementing Blood Granules

TU Bo*, WANG Zhi-yong

(Department of Chemistry, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate astragaloside and astragalan determination method in angelicae sinensis decoction for supplementing blood granules. **Method:** This article used HPLC to determine the content of astragaloside, and used phenol-sulfuric colorimetric method to determine the content of astragalan. **Result:** The average recoveries of astragaloside and astragalan were 97.64%, 97.68%. Relative standard deviation was 2.10%, 3.07%. **Conclusion:** HPLC had been used in determining the content of astragaloside and it could get an effective separation, good peak shape and reproducible assay results. Phenol-sulfuric colorimetric method was used to determine the content of astragalan, and it was accurate, reliable, high sensitivity, and good reproducibility. So they can be effectively used to evaluate the quality of angelicae sinensis decoction for supplementing blood granules.

[Key words] angelicae sinensis decoction for supplementing blood granules; astragaloside; astragalan

当归补血汤颗粒是由黄芪、当归、川芎等中药制备而成的中药方剂。本品具有补气生血,行气活血,增强机体免疫之功效。可用于贫血虚弱,萎黄肌瘦等病症^[1-2]。黄芪所含的黄芪甲苷和黄芪多糖为本品的主要活性成分^[3-4]。本试验采用 HPLC 测定黄芪甲苷的含量及采用苯酚-硫酸比色法测定黄芪多糖的含量,旨在为当归补血汤颗粒质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-10A 型紫外检测器(日本岛津公司),C-R6A 数据处理机。AD-2 型 1/100 万电子天平(美国),BP210S 型电子天平(德国),AS6150D 型超声清洗器(天津)。

1.2 试剂 黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0873-0210),黄芪多糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0873-0211),正丁醇、苯酚、硫酸、葡萄糖冰醋酸为分析纯,乙腈为色谱纯;乙腈(色谱纯);水(重蒸水);其他试剂均为分析纯。

[收稿日期] 2011-03-25

[通讯作者] *涂波,讲师,从事有机化学的教学、研究、实验管理工作,Tel:0951-6909608

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3] Shim-Pack CLC ODS-3 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (15:85); 检测波长 230 nm。流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL, 流动相经 0.45 μm 滤器滤过。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定黄芪甲苷对照品 10.30 mg, 于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释定容至刻度, 制成每 1 mL 含黄芪甲苷 0.103 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备^[4]

2.3.1 黄芪甲苷提取 精密称定当归补血汤颗粒 20 g, 研细, 置入锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 称定量, 置水浴中回流 1 h, 放冷, 称重, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 50 mL, 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣用水 20 mL 使之溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 5 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 20 mL, 正丁醇液蒸干, 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。

2.3.2 黄芪多糖提取 取当归补血汤颗粒粉碎, 过 20 目筛, 80 °C 下干燥。各称取约 3 g 粉末各 3 份分别加入三角瓶中, 加入 20 倍量的 95% 乙醇, 超声提取 80 min, 过滤, 滤渣挥干乙醇。将滤渣置于三角瓶中, 加 10 倍量的水, 在 60 °C 下提取 40 min, 过滤, 滤液保存, 滤渣再次提取, 连续提取 3 次。合并滤液并浓缩, 后定容于 50 mL 量瓶中, 备用。

2.4 黄芪甲苷的含量测定

2.4.1 线性关系的考察 精密量取黄芪甲苷对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6 mL 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别得到 2.06, 4.12, 6.18, 8.24, 12.36 μg·mL⁻¹ 的系列浓度溶液。分别精密吸取各系列溶液 20 μL, 依次注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定, 以黄芪甲苷的浓度为横坐标, 相应的峰面积为纵坐标, 计算, 得线性回归方程为: $Y = 12\ 319 X + 4\ 666$, $r = 0.999\ 4$ ($n = 5$), 该色谱条件下, 黄芪甲苷在 2.06 ~ 12.36 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取供试品溶液, 连续进样 5 次, 每次 20 μL, 记录色谱图峰面积, 峰面积 RSD 为 0.87%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批号供试品溶液 (批号 090603) 6 份, 照 2.3 项下方法制备并测定, RSD 为 1.27%, 表明重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取供试品溶液, 每隔 2 h 进样一次, 连续进样 5 次, 测定并记录峰面积, 结果表明在 10 h 内黄芪甲苷的峰面积值基本稳定, RSD 1.90%, 结果表明溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收试验 精密称取当归补血汤颗粒 (090705), 共 6 份, 每份分别加入黄芪甲苷对照品适量, 按 2.3 项下方法制备溶液, 依法测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 97.64%, RSD 2.10%。见表 1。

表 1 黄芪甲苷回收率

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10.02	49.83	25.03	75.23	100.49	97.64	2.10
10.21	50.22	24.62	72.35	96.67		
10.15	49.75	25.02	73.41	98.18		
10.26	50.09	25.13	71.31	94.80		
9.99	50.14	25.04	74.57	99.19		
10.31	50.21	24.71	72.31	96.52		

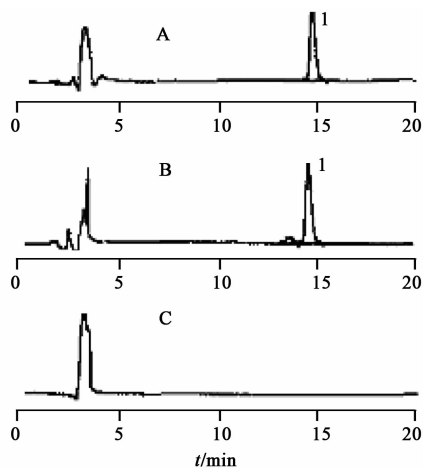
2.4.6 样品测定 按上述方法测定 3 批当归补血汤颗粒样品, 批号 090508, 090603, 090705 的含量分别为 4.982, 5.215, 5.301 mg·g⁻¹, 其 RSD 分别为 1.61%, 1.73%, 1.50%。

由图 1 可见, 在上述色谱条件下, 样品溶液中的黄芪甲苷与其他成分表现出良好的分离效果, 能够满足本品的含量测定。

2.5 黄芪多糖的含量测定

2.5.1 线性关系考察 精密称取苯酚 5 g, 于 100

mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得 5% 苯酚溶液。精密称取葡萄糖适量, 加水溶解并稀释成 1 g·L⁻¹ 的对照溶液; 分别精密量取葡萄糖标准溶液 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀。吸取此溶液 2 mL 于试管内, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 然后立即加入浓硫酸 5.0 mL。振摇 5 min, 于室温下放置 30 min。以水作为空白对照, 测定葡萄糖的吸光度值。以吸光度 (Y) 对葡萄糖浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y =$



A. 黄芪甲苷对照品; B. 当归补血汤颗粒供试品;
C. 阴性对照品; 1. 黄芪甲苷

图1 当归补血汤颗粒 HPLC

$0.12765X - 0.00657$, ($r = 0.9999$), 表明葡萄糖在 $24 \sim 84 \mu\text{g}$ 内线性关系良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批号供试品溶液(批号 090603)6份,测定黄芪多糖含量,结果显示其 RSD 0.99%,表明方法重复性良好。

2.5.3 加样回收率试验 分别精密称取含已知量的当归补血汤颗粒6份,每份各加入葡萄糖对照品 15.6 mg ,按照 2.3 项下配制中黄芪多糖提取方法进行提取操作。并测定样品吸光度值,计算回收率为 97.61%,RSD 3.20%。

2.5.4 样品测定 按上述方法测定3批当归补血汤颗粒样品,结果批号 090511,090605,090709 的含量分别为 $30.46, 30.18, 29.95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,其 RSD 分别为 1.81%,1.43%,1.51%。

表2 黄芪多糖回收率

取样量/g	已知样品含量/mg	加入对照品量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.002	30.02	15.56	44.03	96.60		
1.021	30.17	15.37	44.86	98.51		
1.015	30.09	15.82	42.14	91.79		
1.026	30.72	15.53	45.81	99.05	97.61	3.20
0.9987	30.35	15.14	45.74	100.55		
10.31	298.7	155.3	450.2	99.16		

3 讨论

本文采用高效液相色谱法测定黄芪甲苷的含量,HPLC 能实现黄芪甲苷与有关物质的有效分离,黄芪甲苷峰形好,含量测定结果重复性好;黄芪多糖主要为葡萄糖,因此,可采用以葡萄糖或葡聚糖作对照品的苯酚-浓硫酸法、蒽酮浓硫酸法或水解后用碘量法等测定其含量,由于蒽酮-浓硫酸法的线性关系不好,故不宜采用,文献较多采用苯酚-浓硫酸法。本文所采用的测定黄芪多糖含量的苯酚-硫酸比色法,具有准确可靠、灵敏度高、重现性好等优点,可作为评价当归补血汤颗粒质量的有效方法。

[参考文献]

- [1] 王平,梁逸曾.基于 HPLC-DAD-MS 的当归补血汤化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):28.
- [2] 杨帆,肖远胜,章飞芳,等.当归化学成分 HPLC-MS/MS 分析[J].药学报,2006,41(11):1078.
- [3] 胡春丽,杨丽,王冬梅,等. HPLC 法同时测定当归龙荟片中龙胆苦苷和栀子苷的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(3):205.
- [4] 翁何霞,李耿.高效液相色谱法测定当归补血口服液黄芪甲苷的含量[J].中国医院药学杂志,2008,28(8):675.

[责任编辑 蔡仲德]