

HPLC-ELSD 测定黄芪提取物中黄芪皂苷 I, II 及乙酰黄芪皂苷

赵强强¹, 韩丽^{1*}, 欧水平¹, 潘媛¹, 王森¹, 杨明^{1,2*}

- (1. 成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137;
2. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:研究以 HPLC-ELSD 法测定黄芪提取物中黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 的含量。方法:色谱柱为 Welc C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈和水, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 漂移管温度 80 °C, 气体(空气)压力为 50 psi。结果:黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 的平均回收率分别为 101.16%, 99.34%, 100.43%, RSD 分别为 2.76%, 2.28%, 2.55%, 含量分别为 4.01%, 1.70%, 3.67%。结论:方法简单易行, 结果可靠, 分离效果好, 可作为黄芪提取物中皂苷类成分定量的方法。

[关键词] 黄芪提取物; 黄芪皂苷; 含量; 高效液相-蒸发光散射检测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0056-03

Determination of Astragaloside I, II and Acetytastragaloside I in Astragalus Extract by HPLC-ELSD

ZHAO Qiang-qiang¹, HAN Li^{1*}, OU Shui-ping¹, PAN Yuan¹, WANG Miao¹, YANG Ming^{1,2*}

- (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Chengdu 611137, China;
2. Key Lab for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education of China, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method to determine the content of astragaloside I, II and acetylastragaloside I in *Astragalus* extract. **Method:** The HPLC-ELSD system consisted of Welc C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile-water using a gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was at 30 °C. The drift tube temperature of ELSD was 80 °C with a carrier gas (air) pressure of 50 psi. **Result:** The average recoveries of astragaloside I, II and acetylastragaloside I were 101.16%, 99.34% and 100.43% respectively, with RSD of 2.76%, 2.28%, 2.55%. The content of astragaloside I, II and acetylastragaloside I was 4.01%, 1.70%, 3.67% respectively. **Conclusion:** It was proved that the newly-established HPLC-ELSD method was simple, reliable, well-separated and precise, which could be used for quantitative analysis of saponins in *Astragalus* extract.

[Key words] *Astragalus* extract; astragaloside; content; HPLC-ELSD

[收稿日期] 20110103(002)

[基金项目] 国家科技“重大新药创制”专项(2009ZX09103-307)

[第一作者] 赵强强, 硕士, 研究方向: 中药新剂型、新制剂, Tel: 13541076039, E-mail: zhaoqiangdengni@126.com

[通讯作者] * 韩丽, 副教授, 博士, 从事中药新制剂新技术研究, E-mail: hanliy@163.com, Tel: 028-61800127

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,味甘性温,归肺、脾经,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1]。黄芪含皂苷、黄酮、多糖及氨基酸等多种化学成分,其中皂苷为黄芪的主要活性成分,具有降血压、镇静、镇痛等作用^[2]。目前,关于含黄芪皂苷的制剂多采用 HPLC-ELSD 法检测黄芪甲苷的含量^[3-5],然而黄芪的清除超氧阴离子自由基的功效是黄芪皂苷混合物作用的结果,说明黄芪甲苷以外其他皂苷也具生理活性^[6]。因此有必要对除黄芪甲苷外其他含量较高的皂苷进行含量测定,便于对黄芪制剂进行全面的监控。

本实验采用 HPLC-ELSD 法对黄芪提取物中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、乙酰黄芪皂苷 I 等 3 种皂苷的定量测定方法进行了研究,测定了 3 批中试生产的黄芪提取物中 3 种皂苷类成分的含量。

1 材料

岛津高效液相色谱仪;蒸发光散射检测器(ELSD100)(美国 Softa 公司生产);空气压缩机(天津市琛航科技仪器有限公司);LC-10Atvp 泵;CTO-10Asvp 柱温箱;N2000 色谱工作站;Startorius BP211D 电子天平;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);

黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、乙酰黄芪皂苷 I 对照品均由上海同田生物技术有限公司提供(峰面积归一化法测定,质量分数 $\geq 98\%$),黄芪皂苷提取物自制 3 批(批号 100601,100602,100603)试剂乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 黄芪提取物制备方法 取黄芪,60%乙醇加热回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩至每毫升 1 g 生药,过 D101 大孔吸附树脂,静置吸附 1 h,先用 5 倍柱体积(BV)水洗,控制流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,然后用 5 BV 70%乙醇洗脱,控制流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集洗脱液。回收乙醇,减压干燥,即得。

2.1 色谱条件 Welc C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相 A 为乙腈,B 为水,梯度洗脱,0~13 min,22%~32% A,13~30 min,32%~34% A,30~55 min,34%~60% A;流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 。ELSD 检测器条件,漂移管温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$,气体(空气)压力 50 psi。色谱图见图 1。

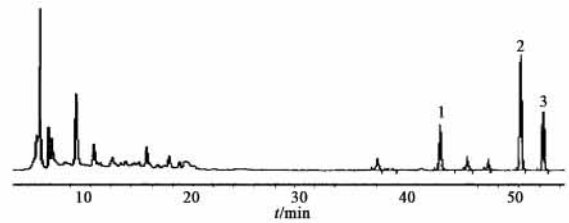


图 1 黄芪提取物 HPLC-ELSD 图

1. 黄芪皂苷 II; 2. 黄芪皂苷 I; 3. 乙酰黄芪皂苷 I

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 对照品适量,加甲醇溶解制成含黄芪皂苷 I $0.56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄芪皂苷 II $0.436\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乙酰黄芪皂苷 I $0.466\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,摇匀即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末约 70 mg,精密称定,加水 10 mL 使溶解,水饱和正丁醇萃取 4 次,每次 40 mL,合并正丁醇,正丁醇减压浓缩至干,残渣加甲醇定容至 5 mL 量瓶中,摇匀即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 4, 8, 10, 12, 16, 20 μL , 注入液相色谱仪,测得峰面积值。分别以峰面积的对数值(Y)为纵坐标,以黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 对照品进样量的对数(X)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。黄芪皂苷 I $Y=1.6601X+5.0058(r=0.9997)$; 黄芪皂苷 II $Y=1.6465X+5.222(r=0.9998)$; 乙酰黄芪皂苷 I $Y=1.6465X+4.7761(r=0.9996)$ 。黄芪皂苷 I 在 $2.24\sim 11.20\text{ }\mu\text{g}$ 、黄芪皂苷 II 在 $1.74\sim 8.72\text{ }\mu\text{g}$ 、乙酰黄芪皂苷 I 在 $1.86\sim 9.32\text{ }\mu\text{g}$ 进样量对数与峰面积对数呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件重复进样 5 次,测定峰面积积分值,结果表明,黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 峰面积积分值的 RSD 分别为 2.1%, 1.7%, 2.0%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 检测,测定黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 峰面积积分值,结果表明,黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 峰面积积分值的 RSD 分别为 1.8%, 2.2%, 2.6%。

2.7 重复性试验 取同一批样品 6 份,按供试品溶液制备方法制备,依上述测定条件测定,结果表明,黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 的含量分别为 4.00%, 1.72%, 3.68%, RSD 分别为 2.5%, 2.0%, 2.8%。

2.8 加样回收率试验 称取本品 6 份, 每份 35 mg, 精密称定, 分别精密加入 1.0 mL 混合对照品溶液 (含黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 分别为 1.402, 0.614, 1.301 mg), 按供试品溶液制备方法制备, 依上述测定条件测定, 计算回收率, 见表 1~3。

表 1 黄芪皂苷 I 加样回收率试验测定

No.	取样量 /mg	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD /%
1	36.12	1.444 8	2.882 1	102.52	101.16	2.76
2	35.11	1.404 4	2.832 2	101.84		
3	35.42	1.416 8	2.781 0	97.30		
4	35.88	1.435 2	2.874 1	102.63		
5	35.63	1.425 2	2.802 3	98.22		
6	36.04	1.441 6	2.906 2	104.47		

注: 加入量均为 1.402 mg。

表 2 黄芪皂苷 II 加样回收率试验测定

No.	取样量/mg	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD /%
1	36.12	0.621 2	1.243 8	101.39	99.34	2.28
2	35.11	0.603 8	1.203 1	97.59		
3	35.42	0.609 2	1.223 6	100.06		
4	35.88	0.617 1	1.219 2	98.06		
5	35.63	0.612 8	1.206 2	96.64		
6	36.04	0.619 9	1.248 2	102.33		

注: 加入量均为 0.614 mg。

表 3 乙酰黄芪皂苷 I 加样回收率试验测定

No.	取样量/mg	样品中含 量/mg	测得 量/mg	回收 率/%	平均 值/%	RSD /%
1	36.12	1.329 2	2.629 1	99.91	100.43	2.55
2	35.11	1.292 0	2.608 1	101.16		
3	35.42	1.303 5	2.585 3	98.53		
4	35.88	1.320 4	2.582 1	96.98		
5	35.63	1.311 2	2.634 2	101.69		
6	36.04	1.326 3	2.683 2	104.30		

注: 加入量均为 1.301 mg。

2.9 样品中皂苷类成分的定量测定 取 3 批黄芪皂苷中试提取物, 按上述供试品溶液制备方法制备, 分别进样 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测得峰面积, 并计算样品中黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 的含量, 测定结果见表 4。

表 4 黄芪提取物中黄芪皂苷 I、II、乙酰黄芪皂苷 I 的

批号	含量测定 (n=3)			%
	黄芪皂苷 I	黄芪皂苷 II	乙酰黄芪皂苷 I	
100601	4.01	1.71	3.67	
100602	4.03	1.72	3.70	
100603	3.98	1.67	3.64	
均值	4.01	1.70	3.67	

3 讨论

黄芪提取物主含皂苷, 具有免疫调节、抗炎降压、镇静镇痛、保肝、护心、清除多种自由基等作用。本试验采用 HPLC-ELSD 法对黄芪提取物中 3 种主要皂苷的含量进行测定, 结果表明, 在上述色谱条件下黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 能达到良好分离, 结果可靠, 重复性好, 为黄芪提取物制定质量标准提供依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:283.
- [2] 林琦, 陆阳, 陈泽乃. 黄芪属植物皂苷类成分研究进展[J]. 国外医药·植物药分册, 2002, 17(4):143.
- [3] 曹湘萍, 梁建宁, 何晓艳, 等. HPLC-ELSD 法测定乙肝宁颗粒中黄芪甲苷含量[J]. 中成药, 2005, 27(2):165.
- [4] 孙健, 刘泓, 范斌. HPLC-ELSD 法测定百草精口服液中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1):6.
- [5] 丘明明. HPLC-ELSD 测定止血灵胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(8):6.
- [6] 王金山. 黄芪中有效成分环黄芪醇皂苷和黄芪甲苷的含量测定[J]. 海峡药学, 2009, 21(2):40.

[责任编辑 蔡仲德]