

HPLC测定当归补血片中黄芪甲苷的含量

刘玮锦¹, 蔡大可¹, 刘亮锋¹, 赖平¹, 董婷霞², 詹华强², 苏子仁^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 香港科技大学, 香港九龙)

摘要 目的: 建立当归补血片中黄芪甲苷的含量测定方法。方法: 以吡啶-苯甲酰氯(2:5:1)为衍生化试剂, 对黄芪甲苷进行苯甲酰化, 采用HPLC测定样品中黄芪甲苷含量。色谱柱: Phenomenex Gemini C₁₈柱(50 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%三乙胺溶液(98:2)洗脱 30 min; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 230 nm; 柱温 20℃; 进样量 10 μL。结果: 黄芪甲苷进样量在 0.074~0.925 μg范围内线性关系良好($r=0.9999$), 重复性好(RSD=0.17%), 平均回收率($n=3$)为 98.6%~99.9%(RSD=0.32%~0.95%)。结论: 该法样品前处理简单, 专属性强、准确度高、灵敏度高、重现性好。

关键词: 当归补血片; 黄芪甲苷; 衍生化; HPLC

中图分类号: R917

文章编号: A

文章编号: 0254-1793(2009)09-1553-03

HPLC determination of astragaloside IV in Danggui Buxue tablets

LU Wei-jin¹, CAI Da-ke¹, LIU Liang-feng¹, LAI Ping¹,

DONG Ting-xia², ZHAN Hua-qiang², SU Zi-ren^{1*}

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. The Hong Kong University of Science and Technology, Kowloon Hong Kong, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of astragaloside IV in Danggui Buxue tablets. **Methods** Astragaloside IV in Danggui Buxue tablets was determined by HPLC with pre-column derivatization, the derivatizing reagent were benzoyl chloride and pyridine. Column Phenomenex Gemini C₁₈ column(50 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile-0.1% triethylamine solution(98:2) with the same gradient elution of 30 min at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; detection wavelength 230 nm; column temperature 20℃; injection volume 10 μL. **Results** The linear range of astragaloside IV was 0.074-0.925 μg($r=0.9999$); The method had a good repeatability(RSD=0.17%) and average recovery(98.6%-99.9%) with RSD of 0.32%-0.95%. **Conclusion** The method is accurate, specific, sensitive and reproducible and preparation of the sample is simple.

Key words Danggui Buxue tablets; astragaloside IV; derivatization; HPLC

当归补血片是由黄芪、当归组成的中成药, 具有补气生血等功效。其中, 黄芪为君药, 性味甘, 温, 归肺、脾经, 具有补气固表、利尿托毒等功效^[1]。现代研究表明, 黄芪具有增强免疫、抗癌、抗衰老作用, 同时对心血管、血液、肝脏、肾脏等均具有一定的药理作用^[2]。黄芪的药理作用广泛, 因此, 无论对其药材、经典方剂, 还是成方制剂, 建立黄芪有效成分的含量测定方法, 具有重大意义。

在 2005 年版中国药典一部中, 黄芪甲苷作为黄芪质量控制的指标成分, 其中规定的测定黄芪甲苷

的方法为 HPLC-ELSD^[1], 但此方法采用质量检测器, 仪器设备不通用。因此, 本实验采用柱前衍生化法对制剂中黄芪甲苷进行含量测定, 结果报道如下。

1 仪器、试剂及样品

Dionex Summit 高效液相色谱仪(P680 HPLC Pump, ASI-100 Automated Sampled Injector, UVD170U, SIH585 Column Oven) Chromeleon 6.70 数据处理系统。

黄芪甲苷对照品(含量测定用, 批号 110781-200613), 购自中国药品生物制品检定所; 乙腈为色

* 通讯作者 Tel: 13763393599; E-mail: vip_suziren@gzhtcm.edu.cn

谱纯试剂(购自 Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

当归补血片 3 批(批号: 20071201, 20071202, 20071203): 由广州中医药大学新药开发研究中心提供。其由当归、黄芪以 1:5 比例组成, 两者加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次 1.5 h 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.35~1.40(60℃), 喷雾干燥, 粉碎成细粉, 加适量的 15% 聚维酮溶液、交联聚维酮、微晶纤维素, 混匀, 加入适量微晶纤维素, 制成颗粒, 压片, 包衣, 即得片重为 $0.43 \text{ g} \cdot \text{片}^{-1}$ 的样品。

缺黄芪的阴性样品: 由广州中医药大学新药开发研究中心模拟当归补血片制备工艺, 制备仅含当归和辅料的阴性样品。

2 实验方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取黄芪甲苷对照品 9.25 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 $0.185 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。

2.1.2 系列对照品溶液 精密量取对照品储备液 0.2 0.4 0.6 0.8 1 1.2 1.4 1.6 1.8 2.0 2.5 mL , 先后加吡啶 1 mL 、氯仿 2 mL , 在冰浴下加入苯甲酰氯 0.4 mL , 摇匀后于冰箱中 4°C 放置 24 h , 使衍生化反应完全。挥干溶剂, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 微孔滤膜过滤, 即得^[3]。

2.1.3 供试品溶液 取同一批号样品适量, 除去包衣, 研细, 每份称取约 0.5 g 精密称定, 加甲醇 100 mL 索氏提取 4 h 蒸干, 残渣加水饱和正丁醇 20 mL 溶解, 用 1% 氢氧化钠溶液振摇提取 3 次(每次 6 mL), 弃去碱液, 正丁醇液用正丁醇饱和和水洗涤 2 次(每次 6 mL), 弃去水层, 正丁醇蒸干, 残渣加 1 mL 吡啶溶解, 加入氯仿 2 mL , 在冰浴下加入苯甲酰氯 0.4 mL , 摇匀后于冰箱中 4°C 放置 24 h 使衍生化反应完全。挥干溶剂, 残渣用甲醇稀释并定容至 10 mL 量瓶中, 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.4 阴性样品溶液 取缺黄芪的阴性样品, 按“2.1.3”项下操作, 即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Gemini C_{18} 柱 ($50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈 - 0.1% 三乙胺溶液 ($98:2$) 等度洗脱 30 min ; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 230 nm ; 柱温 20°C ; 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。理论板数按黄芪甲苷峰计算不低于 2500, 在上述色谱条件下, 黄芪甲苷能达到基线分离, 阴性无干扰, 专属性强。色谱图见图 1。

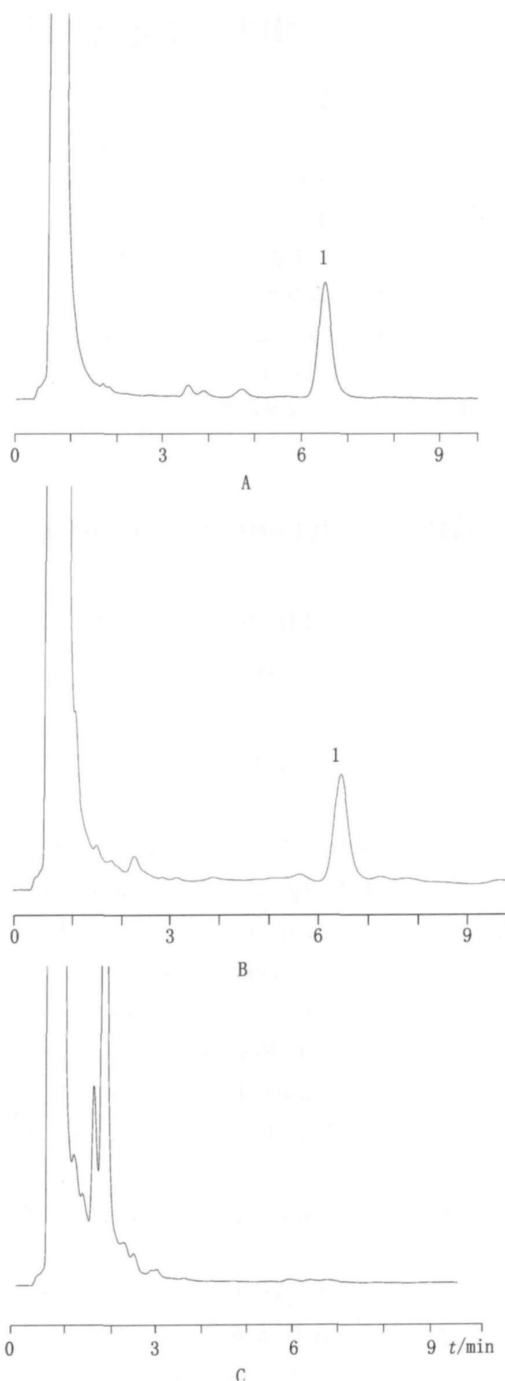


图 1 对照品(A)、样品(B)及阴性样品(C)衍生化后的 HPLC 图
Fig 1 Chromatograms of reference substance(A), sample(B), and negative sample without Astragalix(C) after derivatization
1. 黄芪甲苷 (astragaloside IV)

2.3 线性范围考察 按“2.1.2”项下方法制备系列对照品溶液, 分别进样测定。以进样浓度 X 对黄芪甲苷峰面积 Y 进行线性回归, 结果黄芪甲苷进样量在 $0.074 \sim 0.925 \mu\text{g}$ 内呈良好的线性关系, 回归方程为:

$$Y = 5.503 \times 10^3 X + 25.28 \quad r = 0.9999$$

2.4 精密度试验 精密量取对照品溶液 10 μL 注入色谱仪, 测定峰面积。结果连续进样 7 次的峰面积平均值为 2059.532 RSD= 0.59%, 显示精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL , 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 注入色谱仪, 测定峰面积, 求得 RSD 为 2.3%。在测定时间内, 峰面积均相近, 没有明显递增或递减等趋势规律。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批样品按“2.1.3”项下方法操作, 平行制备供试品溶液 6 份, 测定峰面积并计算含量。结果样品中黄芪甲苷含量平均值为 0.36 $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, RSD = 1.6%, 表明该方法重复性好。

2.7 准确度试验 取同一批样品 9 份, 平均分为 3 份, 每份约 0.19 g 精密称定, 每份分别精密加入对照品储备液适量 (约为样品中黄芪甲苷含有量的 0.8, 1.0, 1.2 倍), 按“2.1.3”项下方法操作, 测定峰面积, 计算黄芪甲苷量, 求得低、中、高浓度平均加样回收率 ($n=3$) 分别为 99.3%, 98.6%, 99.9%; RSD 分别为 0.95%, 0.49%, 0.32%。结果表明该方法准确度高。

2.8 样品测定 取 3 个批次的当归补血片各 2 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 用标准曲线法计算黄芪甲苷的含量, 结果见表 1。将本文的柱前衍生化-HPLC 法与 2005 年版中国药典的 HPLC-ELSD 法^[1]的测定结果进行比较, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, $n=2$)

Tab 1 Determination results of sample (mg per tablet , $n=2$)

批号 (Lot No.)	本法 (This method)	中国药典法 (ChP method)
20071201	0.38	0.37
20071202	0.38	0.37
20071203	0.37	0.36

3 讨论

本实验采用柱前衍生化制备供试品溶液, 使黄芪甲苷苯甲酰化后能够采用 UV 230 nm 检测, 仪器通用性较强, 可适合于绝大多数 HPLC 的仪器配置。当归补血片采用本法测定黄芪甲苷的含量, 样品处理简便, 检测灵敏度提高, 专属性强。HPLC-ELSD 和柱前衍生化-HPLC 两法测定同一批黄芪药材, 结果相近, 提示可以采用本法替代

HPLC-ELSD 法。

不同的提取方法和提取时间对实验结果有着较大影响。本实验对不同的提取方法 (超声提取、回流提取、索氏提取) 和提取时间 (3, 4, 5 h) 进行了考察。实验结果显示, 样品索氏提取的含量较高, 且样品索氏提取 4 h 和 5 h 的含量比索氏提取 3 h 的高, 但索氏提取 4 h 和 5 h 黄芪甲苷含量无统计学差异, 从节约时间及能源的角度考虑, 确定索氏提取时间为 4 h。

本实验对黄芪甲苷的富集方法进行优化。采用大孔树脂法、水饱和正丁醇萃取法和 SPE 法分别制备衍生化前溶液, 结果表明, 3 种方法测定结果均无统计学差异。在获得较好的实验结果的前提下, 为节约成本, 最终采用了水饱和正丁醇萃取法分离富集黄芪甲苷制备衍生化前溶液。

预实验结果表明, 黄芪甲苷衍生物在偏碱性流动相条件下, 保留时间提前, 柱效更佳, 实验中使用碱性流动相和耐碱色谱柱来调节色谱峰峰形和分离度, 故本实验对不同型号的色谱柱进行筛选, 分别选取 Luna C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Waters C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Gemini C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 和 Gemini C_{18} 柱 (50 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 进行含量测定, 结果显示, 因耐碱性更强, Gemini 柱的柱效明显优于 Luna 柱和 Waters 柱, 而 Gemini C_{18} 柱 (50 mm) 较 Gemini C_{18} 柱 (250 mm) 的出峰时间提早 30 min 左右, 且分离度好, 因此最终选择 Gemini C_{18} 柱 (50 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)。

本法与 2005 年版中国药典规定的方法相比, 测定结果无显著性差异, 但采用柱前衍生化-HPLC 测定黄芪甲苷, 前处理简便迅速, 选择性强, 灵敏度高, 重现性好, 测定更准确、可靠, 可以作为黄芪生药、当归补血片中黄芪甲苷的含量测定方法。

参考文献

- ChP (中国药典). 2005. Vol II (一部): 212
- WU Fa-bao (吴发宝), CHEN Xi-yuan (陈希元). Astragalus pharmacological effects review (黄芪药理作用研究综述). *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(3): 232
- YAO Mei-cun (姚美村), QI Ying (齐莹), CHE Zhen-tao (车镇涛), et al. Pre-column derivatization of astragaloside IV in Astragalus mongolicus by HPLC (柱前衍生化 HPLC 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(4): 17

(本文于 2008 年 9 月 11 日收到)