

由表3可知,第2个0.5BV萃取物中的蒽醌衍生物量及提取率最高,第1个0.5BV次之,第3个0.5BV最低。第2个0.5BV萃取物中大黄酚量高达81.638%,如果欲制备高含量的有效部位,可以采取分段收集的方法。

3 结论与讨论

3.1 试验结果表明,USFE的合适萃取温度、萃取时间和夹带剂用量分别低于SFE的10℃、30 min、0.5 BV,在相同的萃取压力下,USFE对5种蒽醌衍生物成分的提取率较SFE分别提高2.113%~6.095%。超声强化超临界流体提取大黄5种蒽醌衍生物的量及提取率均明显高于单独的超声和超临界提取。

3.2 研究显示,超临界提取和超声波提取技术在中药提取分离方面具有广泛的应用前景,两者的成功联用尚未见相关文献报道,它对有效成分的提取纯化和制剂工艺研究具有巨大的推动作用,也为其他的中药产品工艺改进提供新的方法。

3.3 超声强化超临界流体提取技术成功整合了两者在提取方面的优势,避免了两者的劣势,减少夹带剂的用量,降低回收工作量及成本,避免萃取物中的有效成分长时间加热而被破坏,同时缩短提取时间,提高工作效率。

参考文献:

[1] 中国药典[S].一部.2010.

- [2] 郝淑清,王汝龙,何丽一. 大黄煎煮方法对有效成分的影响[J]. 中草药,1984,15(2):15.
- [3] 罗顺德,蔡鸿生,苏玮. 几种提取方法对大黄蒽醌类含量的影响[J]. 中药通报,1987,12(5):30.
- [4] 陈维祖. 超临界流体萃取的原理和应用[M]. 北京:化学工业出版社,1998.
- [5] 李卫民,金波,冯毅凡. 中药现代化与超临界流体萃取技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002.
- [6] 胡爱军,丘泰球,梁汉华. 超临界流体萃取强化技术及应用[J]. 精细化工,2001,18(12):736-740.
- [7] 郭孝武. 超声技术在中药成分提取中的应用[J]. 中草药,1993,24(10):548-549.
- [8] 肖飞,李卫民,李其凤. 正交试验法优化SFE-CO₂萃取大黄总蒽醌工艺探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,22(4):89-90.
- [9] 郭孝武. 超声频率对提取大黄蒽醌类成分的影响[J]. 华西药理学杂志,1999,14(2):117-118.
- [10] 郭孝武. 不同超声强度对提取大黄蒽醌成分的影响[J]. 陕西大学学报:自然科学版,1994,22(1):89-90.
- [11] 岳淑梅,冯玲玲,齐潇潇. 肝宁颗粒中大黄所含5种蒽醌苷元的HPLC测定[J]. 中成药,2008,30(8):1155-1158.
- [12] 孙慧,朱超,章弘扬. 大黄及其炮制品的液质联用分析及物质基础比较[J]. 中成药,2009,31(3):420-424.

HPLC-ESI-MSⁿ 法测定黄芪药材中黄芪甲苷

李晶¹, 韦露莎¹, 申旭霁¹, 赵新锋¹, 王世祥¹, 郑晓晖^{1,2*}

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学与深圳清华大学研究院共建“创新中药及天然药物研究”联合实验室, 广东 深圳 518057)

摘要:目的 建立黄芪醇提物中黄芪甲苷的高效液相色谱-电喷雾-离子阱质谱测定方法,测定黄芪药材中黄芪甲苷。方法 超声法制备黄芪药材的总提物,反相色谱分离,采用离子阱质谱多级反应模式,以 m/z :807.4→627.2为提取离子对,外标法测定黄芪甲苷。结果 方法最低检测限为5 ng/mL,线性范围为0.10~1.04 mg/mL,精密度、重复性、稳定性RSD均小于5.0%,平均加样回收率为96.51%。供试黄芪药材中含黄芪甲苷为0.54 mg/g。结论 该方法具有简便、快速和灵敏度高的特点,可用于黄芪药材及其生物制品样品中黄芪甲苷测定。

关键词:黄芪; 黄芪甲苷; 质谱

中图分类号:R 284.1

文献标志码:B

文章编号:1001-528(2011)04-0720-03

黄芪是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,是中医临床广泛用于补气固表和托毒排脓的药材之一^[1]。黄芪含皂苷、

黄酮、多糖及氨基酸等多种化学成分,黄芪皂苷为黄芪的主要活性成分,并以黄芪甲苷为主^[2]。目前,有关黄芪甲苷的测定方法包括高效液相色谱-蒸发光散射检测法,高效液相色谱-紫外检测法,薄层扫描法^[3-5]。上述方法对黄芪药材及

收稿日期:2010-06-30

基金项目:陕西省中医管理局科研招标课题重点项目(1c119);陕西省中医管理局(2007-25-6)

作者简介:李晶(1986-),女,硕士生,主要从事药物代谢与分析方面的研究。Tel:(029)88302686,E-mail:lijing04163@163.com

* 通信作者:郑晓晖(1968-),男,教授,博士生导师,博士,主要从事复方药物代谢应答与分析等方面的研究。Tel:(029)88302686,E-mail:zhengxh@nwu.edu.cn

其制剂中黄芪甲苷的测定有重要意义,且有潜在的推广应用前景。然而,由于黄芪甲苷为紫外末端吸收物质,其在复杂体系中高效测定方法的建立仍然是需进一步研究的问题之一。本试验建立了黄芪醇提取物中黄芪甲苷的高效液相色谱-电喷雾-离子阱(HPLC-ESI-MSⁿ)测定方法,旨在为复杂体系中黄芪甲苷的快速测定提供方法。

1 仪器与试剂

仪器:Agilent1100系列高效液相色谱-电喷雾-离子阱质谱联用仪,包括二元梯度泵、二极管阵列检测器、电喷雾离子源、SL型离子阱质谱和 Chemstation 5.2 工作站。

材料及试剂:黄芪(购于西安藻露堂药店,经西安市药品检验所鉴定);黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110781-200613);色谱纯甲醇(美国 Fisher 公司);实验用水为超纯蒸馏水(自制);其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析条件

色谱条件:色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流动相为甲醇-0.2% 甲酸水(70:30 v:v);体积流量为 0.7 mL/min;检测波长为 203 nm;柱后 2:1 分流,三分之一流出液进行质谱分析。

质谱条件:电喷雾正离子模式检测;雾化气压力为 35.0 psi;干燥气温度为 350 °C,流速为 8.0 L/min;黄芪甲苷选择离子对为 *m/z* 807.4 → 627.2;质量扫描范围为 100 ~ 1 000 amu。该条件下,黄芪药材中黄芪甲苷提取离子流图和质谱图分别见图 1 和图 2。

2.2 供试品溶液的制备 黄芪甲苷对照品溶液的制备:精密称取黄芪甲苷标准品 5.2 mg,甲醇溶解于 5.0 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,制备成浓度为 1.04 mg/mL 的对照品溶液。

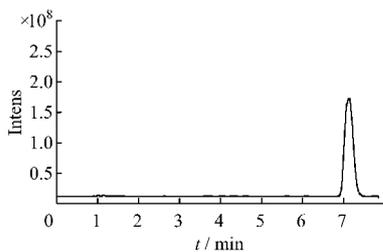


图1 黄芪甲苷提取离子流图

黄芪药材供试品溶液的制备:取黄芪药材 20.0 g,50.0 °C 干燥至恒重。粉碎,过 40 目筛,准确称取药材粉末 5.0 g,置具塞锥形瓶中,加 10 倍量甲醇,冷浸过夜,超声提取 3 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压浓缩至干,残渣用甲醇溶解至 10.0 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,4.0 °C 冷藏备用^[6]。

2.3 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mL,用甲醇稀释并定容到 1.0 mL 量瓶中,制备系列质量浓度对照品溶液。在拟定分析条件下,准确吸取 10.0 μL 进样分析。黄芪甲苷离子选择 *m/z* 807.4 为母离子,627.2 为子离子,测定提取离子流图峰面积^[7-8]。以质量浓度为横坐标,以提取离子流图峰面积为纵坐标进行线性回

归,得回归方程为: $Y = 379.18X + 9.0521$ ($r = 0.9997$) 提示黄芪甲苷在 0.10 ~ 1.04 mg/mL 范围内线性关系良好。以 3 倍信噪比为标准,测得黄芪甲苷的最低检测限为 5 ng/mL ($S/N = 3$)。

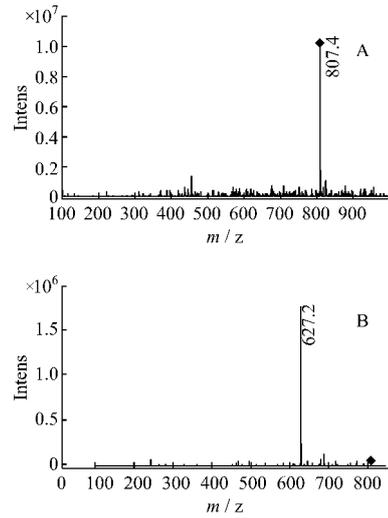


图2 黄芪甲苷质谱图

A. 一级质谱图 B. 二级质谱图

2.4 精密实验 在拟定分析条件下,精密吸取黄芪药材供试品溶液 10.0 μL,连续进样 5 次,记录提取离子流图峰面积,测定黄芪甲苷量,计算得相对标准偏差(RSD)为 2.7%,提示该方法具有较好的精密性。

2.5 重复性实验 取同一黄芪样品 5 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在拟定分析条件下,准确吸取 10.0 μL 进样分析,测定黄芪甲苷量,计算得 RSD 为 3.2%,提示该方法重复性良好。

2.6 稳定性实验 取黄芪药材供试品溶液,分别在 0、4、8、16、24 h 和 36 h 后,在拟定分析条件下,准确吸取 10.0 μL 进样分析,测定黄芪甲苷量,计算得 RSD 为 2.4%,提示黄芪供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.7 加样回收率实验 精密称取 5 份黄芪甲苷量已知的黄芪药材,每份 5.0 g,分别准确加入浓度为 1.04 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液 2.0 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。在拟定分析条件下,准确吸取 10.0 μL 进样分析,测定黄芪甲苷量,结果见表 1。由表 1 可见,方法平均回收率为 96.51%,表明该方法具有较好的回收率。

表1 加样回收率实验结果 (n=5)

原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
2.72	2.08	4.85	101.04	-	-
2.70	2.08	4.72	98.74	-	-
2.74	2.08	4.62	95.85	96.51	3.6
2.74	2.08	4.57	94.81	-	-
2.73	2.08	4.43	92.10	-	-

2.8 样品测定 分别精密称取黄芪药材 3 份,每份 5.0 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。在拟定分析条件下,准确

吸取 10.0 μL 进样分析,测定黄芪甲苷质量分数。结果表明,供试药材中黄芪甲苷的平均质量分数为 0.54 mg/g。

3 讨论

3.1 黄芪甲苷为末端紫外吸收物质^[9],采用紫外检测法进行测定,一般具有灵敏度差等不足。蒸发光散射检测器虽然能用于黄芪甲苷等紫外末端吸收物质的测定,但线性范围一般低于 3 个数量级,且在灵敏度方面与紫外相比并未显示出独特的优势。质谱法以气态离子为检测对象,检测灵敏度不受待测对象紫外光吸收性质的限制,在紫外末端吸收物质的测定方面具有独特的优势。因此,本试验以质谱法为手段,进行黄芪药材中黄芪甲苷的测定。

3.2 本试验采用多级反应模式即选择离子对法进行黄芪甲苷的测定。该方法以黄芪甲苷的准分子离子 m/z 807.4 和二级碎片离子 m/z 627.2 为离子对对药材中的黄芪甲苷进行定性,具有特异性强的特点。此外,由于选择离子对法能有效排除复杂体系中的基质对待测对象的干扰,因此不仅能有效缩短分析时间,而且灵敏度高。综上,本试验所建立的黄芪药材中黄芪甲苷的测定方法,具有灵敏度高、重现性好和快速的特点,可用于黄芪药材的质量评价,而且有望为生物样品等复杂体系中黄芪甲苷的快速测定提供方法。

参考文献:

[1] 中国药典[S].一部.2010:283-284.

- [2] 江燕,晁若冰.黄芪药材中黄芪甲苷和总皂苷含量的比较[J].华西药理学杂志,2007,22(3):322-324.
- [3] 蒋红艳,杨元娟,何静,等.黄芪及其制剂中黄芪甲苷定量分析方法研究进展[J].中国医药指南,2009,7(10):209-211.
- [4] 周春玲,鲁静.高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J].中国中药杂志,2000,25(3):166-168.
- [5] 莫迎,陆石英,叶萍,等.HPLC-ELSD测定芪丹益肝胶囊中黄芪甲苷含量[J].中成药,2009,31(10):附4-附6.
- [6] 南换杰,李晓娜,秦雪梅,等.黄芪及其制剂中测定黄芪甲苷含量时供试液制备方法的改进[J].中国医院药学杂志,2009,29(19):1627-2630.
- [7] Huang Chenrong, Wang Guangji, Li Hao, et al. Sensitive and selective liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of astragaloside IV in rat plasma[J]. Pharm Biomed Anal, 2006, (40): 788-793.
- [8] 贾晓斌,陈彦,蔡宝昌,等.HPLC-MS(TOF)法测定家兔血浆中黄芪甲苷的浓度[J].中成药,2005,27(3):323-325.
- [9] 毛文彬,相莉,冯伟.HPLC-ELSD测定黄芪药材及其炮制品中黄芪甲苷的含量[J].齐齐哈尔医学院学报,2008,29(15):1853-1854.

水黄皮根总黄酮提取工艺的研究

赵映淑¹, 朱毅^{1*}, 董志², 陈国彪¹

(1. 海南省药品检验所, 海南省药物质量研究重点实验室, 海南 海口 570216; 2. 重庆医科大学, 重庆 400016)

摘要:目的 确定水黄皮根总黄酮的最佳提取工艺。方法 以总黄酮量为指标,采用单因素试验与正交设计试验优选水黄皮根总黄酮最佳提取工艺条件;以水黄皮素为对照,用紫外分光光度法测定总黄酮量。结果 水黄皮总黄酮最佳提取工艺为:每 1 g 药材粗粉加入 20 倍量 60% 乙醇,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 3 次,每次 1.0 h。结论 本实验设计合理、可行,实验结果重复性较好。

关键词:水黄皮;总黄酮;提取工艺;单因素试验;正交设计试验

中图分类号:R 284.1

文献标志码:B

文章编号:1001-1528(2011)04-0722-03

水黄皮 *Pongamia pinnata* (L.) Merr. 为豆科 (*Leguminosae*) 水黄皮属 (*Pongamia Vent.*) 的半红树植物,别名水流豆^[1]。水黄皮在民间具有广泛的应用,用于治疗疥癣、疱疹、支气管炎、百日咳、风湿性关节炎、消渴病、白斑病、麻风病和腰痛等疾病^[2]。近年来,研究结果证明水黄皮具有巨大的药

用潜力,在抗炎镇痛、抗菌、抗消化性溃疡、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、降糖以及镇静等方面具有明显的作用,且主要活性成分为黄酮类化合物,其中呋喃黄酮为指标性成分^[3-4]。本实验采用单因素试验和正交设计试验法筛选醇提取水黄皮根中总黄酮的最佳工艺条件,为深入研究水黄皮的药理作用

收稿日期:2010-03-12

基金项目:国家科技支撑计划课题(2007BAI27B06);海南省重点科技项目(070205)

作者简介:赵映淑(1982-),女,硕士研究生,研究方向:神经药理,中药药理和新药开发。Tel:13907689304, E-mail:zhaoysh2007@sina.com

* 通信作者:朱毅(1962-),男,博士,研究员,硕士生导师。Tel:(0898)66832901, E-mail:hnzhyi@126.com