

HPLC-ELSD 内标法测定 8 个产地黄芪药材、 饮片中黄芪甲苷的含量

裴彩云*, 王宗权, 贾继明, 宋剑

(河北以岭医药研究院, 河北 石家庄 050035)

摘要 目的:建立 HPLC-ELSD 内标法,测定黄芪药材中黄芪甲苷含量。方法:采用人参皂苷 Rb_2 为内标物,Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) 色谱柱,甲醇-水(72:28)为流动相,流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C,ELSD 检测器漂移管温度为 75 $^{\circ}$ C,以洁净干燥的压缩空气为雾化气体,压力为 172.4 kPa。结果:黄芪甲苷在进样量 0.562 4 ~ 5.624 μ g,进样量的常用对数与对照品峰和内标峰峰面积比值的常用对数成良好线性关系($r=0.999\ 9$);平均回收率为 98.06%,RSD 为 0.98%。结论:建立的内标法准确度高,重复性好,是控制黄芪药材质量的较理想方法。

关键词 高效液相蒸发光检测;内标法;黄芪;黄芪甲苷

黄芪为常用中药,是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,具有补气固表,利尿托毒等功效。黄芪中主要成分为皂苷类、黄酮类、多糖类等,其中黄芪甲苷具有正性肌力、保护血管内皮细胞、抗炎、抗病毒等多方面药理活性^[1],是黄芪药材中的重要活性成分,通常作为黄芪药材及其制剂质量控制的主要指标。黄芪甲苷为紫外末端吸收,以往的含量测定多采用薄层扫描法,高效液相色谱法中一般采用紫外检测法和蒸发光检测法,后者灵敏度高,是目前无紫外吸收的皂苷类成分比较理想的检测方法,并被 2005 版中国药典采用^[2]。已有文献中的液相色谱方法均采用外标法定量,由于蒸发光检测器的稳定性较差,且外标法和内标法相比,引起误差的可能性较大。本文建立了以人参皂苷 Rb_2 为内标物的 HPLC-ELSD 方法,提高了测定的准确性,并测定了不同产地黄芪药材中黄芪甲苷的含量。

1 材料

Waters 2695 系列高效液相色谱仪;2420 蒸发光检测器;Sartorius BS110S 分析天平;Millipore A10 型

超纯水机;甲醇为 Fisher 色谱纯;其余试剂、试药均为分析纯。

黄芪甲苷对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号,110781-200613);人参皂苷 Rb_2 对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 111715-200802);黄芪药材采自河北、内蒙古、山西等地,由河北以岭医药研究院中药标本室田青存主任药师鉴定,留样药材存于河北以岭医药研究院中药标本室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);流动相甲醇-水(72:28),人参皂苷 Rb_2 为内标物;流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 30 $^{\circ}$ C;蒸发光检测器漂移管温度 75 $^{\circ}$ C,以洁净干燥的压缩空气为雾化气,气体压力为 172.4 kPa。理论塔板数以人参皂苷 Rb_2 计应不低于 6 000。

2.2 含内标物的系列对照品溶液的制备 精密称取 14.06 mg 黄芪甲苷对照品,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得对照品溶液,质量浓度为 0.562 4 g · L⁻¹;精密称取 12.6 mg 人参皂苷 Rb_2 ,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得内标物溶液,浓度为 0.477 8 g · L⁻¹;分别精密吸取上述黄芪甲苷对照品溶液 0.5,1,2,3,4,5 mL,置 10 mL 量瓶中,精密加入人参皂苷 Rb_2 内标物溶液各 1.0 mL,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 线性关系考察 精密吸取以上系列对照品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪中,记录人参皂苷 Rb_2 及黄芪甲苷峰面积,以黄芪甲苷进样量的自然对数值

稿件编号 20101023004

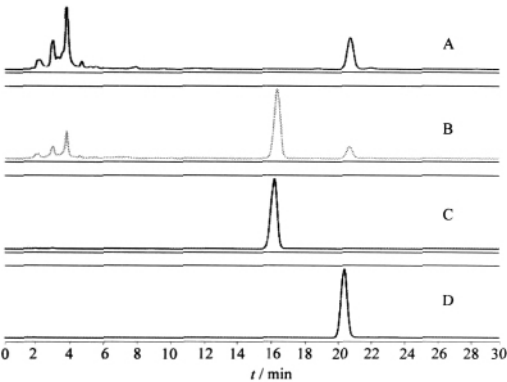
基金项目 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2005CB523301);国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI08B04-09)

通信作者 *裴彩云,工程师,硕士,长期从事中药创新药物研究工作,E-mail: peicaiyun@126.com

X 为横坐标,以人参皂苷 Rb_2 和黄芪甲苷峰面积比值的自然对数值 Y 为纵坐标进行回归,得到方程 $Y = -1.6153X - 0.423$, $r = 0.9999$ 。表明黄芪甲苷进样量在 $0.5624 \sim 5.624 \mu\text{g}$,黄芪甲苷进样量自然对数值与人参皂苷 Rb_2 和黄芪甲苷峰面积比值自然对数值呈良好的线性关系。

2.4 供试品溶液制备 将黄芪药材粉碎成中粉,取约 4 g ,精密称定,置索氏提取器中,加甲醇 40 mL ,冷浸过夜,再加甲醇适量,加热回流 4 h ,提取液回收溶剂并浓缩至干,残渣加水 10 mL ,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 40 mL ,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤 3 次,每次 40 mL ,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,通过 $D101$ 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm ,长 12 cm),以水 50 mL 洗脱,弃去水液,再用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,分别精密吸取上述溶液及人参皂苷 Rb_2 内标物溶液各 1 mL 混合,摇匀,即得。

2.5 专属性考察 分别吸取未加内标物的药材提取液,供试品溶液、黄芪甲苷对照品溶液及人参皂苷 Rb_2 内标物溶液按照测定条件进行检测,结果药材提取液色谱图中人参皂苷 Rb_2 出峰处无干扰。色谱图见图 1。



A. 黄芪药材;B. 供试品;
C. 人参皂苷 Rb_2 ;D. 黄芪甲苷。

图 1 黄芪专属性色谱图

2.6 稳定性试验 分别制备对照品及供试品溶液,每隔一定时间进样,测定人参皂苷 Rb_2 和黄芪甲苷峰面积,考察对照品和供试品溶液的稳定性,结果表明,对照品和供试品溶液在 24 h 内人参皂苷 Rb_2 和

黄芪甲苷峰面积比值基本稳定,RSD 分别为 1.6% , 1.9% 。

2.7 重复性试验 取同一批样品,设高、中、低 3 个浓度,每个浓度平行 3 份,按 2.4 项下方法分别制备供试品溶液,测的黄芪甲苷平均含量为 $0.918\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 1.7% ,说明方法重复性良好。

2.8 回收率试验 采用加样回收实验,取同一批样品(产地内蒙古饮片,20091101,质量分数为 $0.918\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),设高、中、低 3 个浓度,分别加入对照品溶液($1.818\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5, 1.0, 1.5\text{ mL}$ 。按 2.4 项下方法制备供试品溶液并测定,计算回收率。高中低 3 个不同浓度平均回收率为 98.06% ,RSD 0.98% ,表明方法准确性良好。

2.9 样品含量测定 称取不同产地黄芪药材粉末,照供试品制备方法制备供试品。精密吸取供试品溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$,注入高效液相色谱仪测定,平行进样两次,取峰面积平均值,根据回归方程计算含量,结果见表 1。

表 1 不同产地黄芪药材中黄芪甲苷含量($n=3$)

No.	产地	品种	质量分数/%
1	河北安国,栽培品,二年生	膜荚黄芪	0.132
2	内蒙古,栽培品,二年生	蒙古黄芪	0.081
3	山东,栽培品,三年生	膜荚黄芪	0.113
4	河北承德丰宁,栽培品,二年生	膜荚黄芪	0.056
5	河北承德丰宁,栽培品,一年生	膜荚黄芪	0.128
6	吉林通化,栽培品,三年生	膜荚黄芪	0.143
7	山西浑源,野生品	蒙古黄芪	0.071
8	山西,野生品	蒙古黄芪	0.189
9	内蒙古,栽培品,饮片(20091101) ¹⁾	蒙古黄芪	0.092
10	内蒙古,栽培品,饮片(20091201) ¹⁾	蒙古黄芪	0.089
11	内蒙古,栽培品,饮片(20100101) ¹⁾	蒙古黄芪	0.086

注: ¹⁾ 饮片购自河北安国以岭中药材饮片公司。

3 讨论

黄芪甲苷紫外末端只有弱吸收,采用 HPLC-ELSD 测定含量,灵敏度高,结果比较理想。但其灵敏度受检测器漂移管温度、蒸发温度以及雾化气体流速等多种因素影响,仪器波动较大,相比于紫外检测器,稳定性和精密度较差,特别是应用外标法测定时,对照品测定与样品测定过程间仪器状态的波动对结果准确度影响较大。采用内标法可避免用外标法时仪器波动造成的定量误差,从而提高了测定的准确性。

HPLC-ELSD 采用外标法定量时,每次测定都要随行测定两点对照品计算含量,而内标法在方法建立之后,测定时只需分析样品溶液根据回归方程就可定量,不仅结果准确而且缩短了分析时间。

黄芪甲苷与人参皂苷类成分结构类似,且黄芪药材中不含人参皂苷类成分,考察了人参皂苷 Rb₁, Rb₂, Rb₃ 分别做为内标物时供试品分离度,结果人

参皂苷 Rb₂ 与黄芪甲苷分离度好,色谱峰无干扰,出峰时间接近,是良好的内标物。

参考文献

[1] 朱燕辉,严丰祥. 黄芪甲苷及其生物学活性 [J]. 现代生物医学进展,2008,8(4):781.
[2] 中国药典. 一部 [S]. 2005:213.

Determination of astragaloside IV of eight area in Astragali Radix is by HPLC-ELSD internal standard method

PEI Caiyun*, WANG Zongquan, JA Jiming, SONG Jian
(Hebei Yiling Medicine Institute, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-ELSD internal standard method for determination of astragaloside IV in Astragali Radix. **Method:** With Ginsenoside Rb₂ as internal standard, the separation were carried out on an Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) column with methanol-water (72:28) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the drift tube temperature of the ELSD was 75 °C. The gas pressure was set at 172.4 kPa using the clean and dry compressed air as spray gas. **Result:** There was good linearity in the range of 0.5624-5.624 μg of astragaloside IV (r = 0.999 9); The average recovery was 98.06% with RSD of 0.98%. **Conclusion:** The internal standard method is accurate and reproducible, and suitable for quality control of radix astragali.

[Key words] HPLC-ELSD; internal standard; Astragali Radix; astragaloside IV

doi: 10.4268/cjcmm20111430

责任编辑 丁广治