

HPLC-ELSD 测定更年调和颗粒中黄芪甲苷的含量

张乐林, 周倩, 吴丽丽, 孙立立(山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

摘要: **目的** 建立 HPLC-ELSD 法测定更年调和颗粒中黄芪甲苷的含量。**方法** 色谱柱为 Thermo Synchronis C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(34:66); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃。蒸发光散射检测器(ELSD)参数: 漂移管温度 85 ℃, 氮气体积流量 1.8 mL·min⁻¹。**结果** 黄芪甲苷在 0.812~8.12 μg 范围内具有良好的线性关系, 加样回收率为 98.07 % (RSD 为 1.21 %, n=6)。**结论** 本法简单易行, 重复性符合要求, 测定结果准确, 可作为更年调和颗粒中黄芪甲苷的含量测定方法。

关键词: HPLC-ELSD; 更年调和颗粒; 黄芪甲苷; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)06-0619-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.024

Determination of Astragaloside IV in Gengnian Tiaohe Granula by HPLC-ELSD

ZHANG Lelin, ZHOU Qian, WU Lili, SUN Lili (Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014 Shandong, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC-ELSD method for the determination of astragaloside IV in *Gengnian Tiaohe* Granula. **Methods** The HPLC-ELSD system consisted of Thermo Synchronis C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-water(34:66). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was set at 30 ℃. Evaporative light-scattering detector was adopted. The drift tube temperature of ELSD was set at 85 ℃, nitrogen volume flow rate was 1.8 L·min⁻¹. **Result** Astragaloside IV showed a good linearity in the range of 0.812~8.12 μg. The recovery was 98.07 % (RSD=1.21 %, n=6). **Conclusion** The established method is simple and reliable, and is suitable for the determination of astragaloside IV in *Gengnian Tiaohe* Granula.

Keywords: HPLC-ELSD; *Gengnian Tiaohe* Granula; Astragaloside IV; Content determination

更年调和颗粒是由更年调和饮汤剂改进而成, 由黄芪、当归、柴胡、山药等组成。更年调和饮为临床验方, 具有益气补中、补肾健脾、疏肝理气、宁心安神等功效, 在临床因能有效治疗妇女更年期综合征引起的情绪多变、烦躁不安、失眠多梦、头昏目眩、潮热自汗、心悸、胸闷等证^[1], 而得到广大医患的一致好评。通过对颗粒制备工艺、初步稳定性等系统试验研究, 将更年调和饮制备成颗粒剂, 既保留了中医药

的传统用药特色, 充分发挥有效成分综合治疗作用, 又能克服汤剂在贮存、携带、运输、服用方面不便的缺点。

黄芪系方中君药, 主要成分包括皂苷、黄酮和多糖等。近年来对黄芪皂苷的研究发现, 该类成分除具有免疫调节作用之外, 还具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降糖和改善心血管疾病等广泛的生理活性^[2], 黄芪皂苷中以黄芪甲苷含量最高, 为黄芪最主要的质量

收稿日期: 2013-06-13

作者简介: 张乐林, 男, 研究实习员, 研究方向: 中药炮制。Email: zhanglelin_01@163.com。通讯作者: 孙立立, 研究员, 研究方向: 中药新药与中药炮制原理研究。Email: xingerx@163.com。

基金项目: 山东省科技发展计划项目(2008GG30002056); 2010-2011 年中医药行业科研专项(20110700705); 山东省科技发展计划项目(2011-170); 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目。

评价指标^[3],也是2010版《中华人民共和国药典》中黄芪含量测定项下的定量指标^[4],因此,确定黄芪皂苷为本制剂含量测定的指标成分。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT型高效液相色谱仪、LCsolution色谱工作站,日本岛津公司;Alltech 3300型蒸发光散射检测器(ELSD),美国奥泰公司;XS205DU型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;DK-S23电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;Millipore纯水发生器。

1.2 试药 黄芪甲苷对照品(astragaloside IV),购于中国药品生物制品检定所,批号:110781-200613,供含量测定用;乙腈,色谱纯,迪马公司;纯净水为Millipore纯水器二次制备。更年调和颗粒为本院中试产品,批号为120301、120305、120309。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Synchronis C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈-水(34:66)为流动相;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30℃;蒸发光散射检测器条件,漂移管温度:85℃,气体流速1.8 L·min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.402 mg的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取更年调和颗粒15 g,精密称定质量,置索氏提取器中,加甲醇适量,加热回流至提取液无色,提取液回收溶剂并浓缩至干,残渣加水20 mL,微热使溶解,水饱和正丁醇提取4次,每次40 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤2次,每次40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加入50%乙醇10 mL溶解,放冷,通过D101型大孔吸附树脂柱(内径1.5 cm,柱高为12 cm),以50%乙醇50 mL洗脱,弃去洗脱液,继用70%乙醇120 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 取处方组成中除黄芪外的其余中药制成不含黄芪的阴性对照品,按照2.3项下供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.5 专属性试验 按照2.1项下色谱条件,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10 μL注入液相色谱仪,测定。结果表明,供试品中黄芪甲苷色谱峰与

其相邻峰的分离度大于1.5,黄芪甲苷色谱峰达到基线分离,保留时间适中。黄芪甲苷对照品色谱峰的保留时间及峰形与供试品中色谱峰的保留时间及峰形一致,峰形对称,无拖尾现象产生。在该色谱条件下,色谱柱的理论板数以黄芪甲苷峰计算为8435,说明该分析条件良好,符合定量分析的要求。

在上述色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液和阴性对照溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定。结果表明,阴性对照色谱中,在与黄芪甲苷对照品峰相应的位置上,无吸收峰出现,说明阴性对照无干扰。上述试验说明,用该色谱条件测定更年调和颗粒中黄芪甲苷的含量是可行的。对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液的HPLC图谱见图1~3。

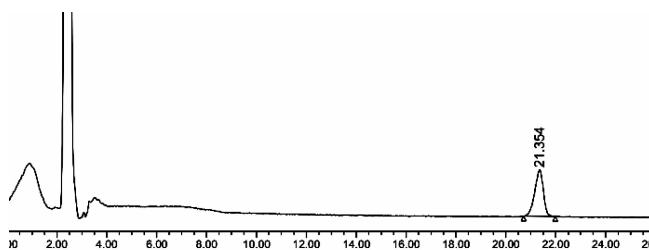


图1 黄芪甲苷对照品 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC-ELSD chromatogram of astragaloside IV

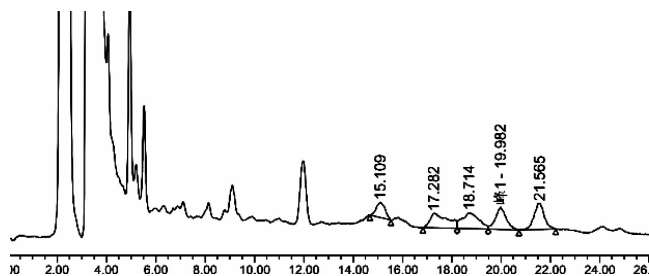


图2 供试品溶液 HPLC 图谱

Figure 2 HPLC-ELSD chromatogram of sample

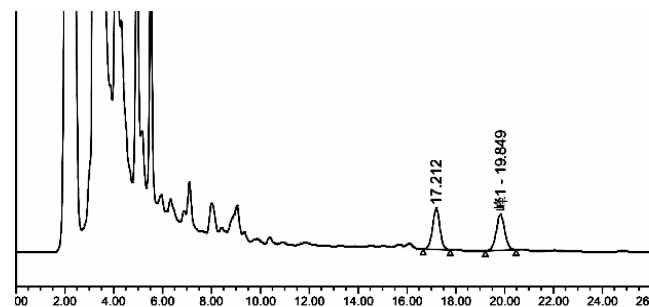


图3 阴性对照 HPLC 图谱

Figure 3 HPLC-ELSD chromatogram of negative reference substance

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系的考察 分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 8, 15, 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积值。以峰面积(Y)的对数值为纵坐标, 以黄芪甲苷对照品进样量(X)的对数值为横坐标, 绘制标准曲线, 计算, 得回归方程为 $\text{Lg}(Y)=0.9885\text{Lg}(X)+15.501$, $r=0.9996$ 。表明黄芪甲苷在 0.812~8.12 μg 范围内, 进样量对数值与峰面积对数呈良好的线性关系。

2.6.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 测定。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.22 %。

2.6.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 测定, 结果黄芪甲苷峰面积值的 RSD 为 1.47 %, 表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.6.4 重复性试验 取同一批号(120309)样品, 平行称取 6 份, 按照 2.3 供试品溶液制备项下方法进行制备, 依法测定, 计算黄芪甲苷的含量, 结果样品中黄芪甲苷平均含量为 0.127 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.36 %。

2.6.5 加样回收率试验 取已知含量的样品 6 份, 每份 7.5 g, 分别加入黄芪甲苷对照品适量, 按拟定的供试品溶液制备方法和测定条件, 测定黄芪甲苷的含量, 结果平均回收率为 98.07 %, RSD 为 1.21 %。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Table 1 Recovery of astragaloside IV

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.954	0.804	1.745	98.39	98.07	1.21
2	0.963	0.804	1.748	97.62		
3	0.968	0.804	1.751	97.42		
4	0.957	0.804	1.759	99.74		
5	0.952	0.804	1.747	98.86		
6	0.964	0.804	1.739	96.37		

2.7 样品含量测定 取 3 个批次更年调和颗粒的中试产品, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依法进样测定, 计算含量, 结果见表 2。

由表中结果可见, 黄芪甲苷含量在 0.126~0.128 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间, 该结果表明更年调和颗粒的中试产品质量稳定。

表 2 样品含量测定结果

Table 2 Content determination results of samples

批号	黄芪甲苷含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
120301	0.126
120305	0.127
120309	0.128

3 讨论

黄芪甲苷进行紫外全波长扫描, 只有紫外末端出现弱吸收, 而 ELSD 为通用型质量检测器, 用于检测皂苷类化合物灵敏度高, 结果理想。通过调节 ELSD 检测器的气体流速、漂移管温度这些重要参数发现, 氮气流速在 1.8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的体积流量, 漂移管温度 85 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可以获得最大的检测灵敏度。

本研究考察了 Thermo Synchronis C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、汉邦 Benetnach C_8 色谱柱(150mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、汉邦 Benetnach C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、甲醇-甲醇-水、乙腈-水不同比例混合的流动相, 发现 hermo Synchronis C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、乙腈-水(34 : 66)色谱系统中可将黄芪甲苷有效地洗脱出来, 能达到很好的基线分离, 此条件下, 流动相可全部挥发以减少其对测定的影响。对不同柱温进行考察, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 范围内基线均平稳, 基线噪音较低, 为更好的保证柱效及分离效果, 本文选用 30 $^{\circ}\text{C}$ 作为分析柱温。

本研究采用 HPLC-ELSD 测定了更年调和颗粒中黄芪甲苷的含量, 建立了更年调和颗粒中黄芪甲苷的含量测定方法。本法操作简便, 经方法学考察, 精密度、稳定性及重现性均符合含量测定要求, 可作为更年调和颗粒中黄芪甲苷的定量分析方法。

参考文献:

[1] 高建, 夏泉, 黄赵刚, 等. HPLC-ELSD 同时测定当归补血总苷中黄芪甲苷和黄芪皂苷 II[J]. 中成药, 2012, 34(2): 268-271.
[2] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.
[3] 王辰, 侯连兵, 刘婵. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液黄芪甲苷的含量[J]. 中药材, 2006, 29(6): 618-619.
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283.

(编辑: 宋威)