

HPLC-ELSD 法测定参子安胎片中黄芪甲苷的含量

李 娅, 汪 蓉, 李凯锋, 王秀芳*
(昆明学院 化学化工学院, 云南 昆明 650214)

摘要: 黄芪甲苷是黄芪的质控指标, 而黄芪是参子安胎片中的重要组成部分. 为此建立了高效液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 联用法, 对参子安胎片中黄芪甲苷的含量进行测定. 结果表明, 黄芪甲苷在进样量范围内线性关系良好, 其平均回收率为 99.54%, *RSD* 为 2.58%. 所建立的 HPLC-ELSD 联用法能够有效测定参子安胎片中黄芪甲苷的含量, 测定方法准确可靠.

关键词: 参子安胎片; HPLC-ELSD 法; 黄芪; 黄芪甲苷; 含量测定

中图分类号: O656.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2022) 03 - 0121 - 05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2022.03.023

Determination of the Content of Astragaloside IV in Shenzi Antai Tablets by HPLC-ELSD

LI Ya, WANG Rong, LI Kaifeng, WANG Xiufang*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: Astragaloside IV is the quality control index of *Astragalus membranaceus*, an important component of Shenzi'an fetal tablets. So a HPLC-ELSD method was established to determine the content of astragaloside IV in Shenzi Antai tablets. The results show that Astragaloside IV has good linear relations in injection volume with the average recovery rate 99.54%, and *RSD* 2.58% so that the HPLC-ELSD method is effective and reliable for the determination of astragaloside IV in Shenzi Antai tablets.

Key words: Shenzi Antai tablets; HPLC-ELSD; *Astragalus membranaceus*; Astragaloside IV; content determination

黄芪中的重要成分是多糖类和黄芪苷, 其中黄芪苷又可以细分为黄芪I、黄芪II、黄芪IV, 黄芪苷中生物化学活性最高的部位为黄芪IV, 亦称黄芪甲苷. 黄芪甲苷 (化学结构式见图 1) 为环阿尔廷型三萜皂苷类化合物, 是黄芪专属性活性成分, 其作为黄芪质量控制指标被历版《中华人民共和国药典》 (以下简称《中国药典》) 所刊载^[1]. 黄芪甲苷对人体具有良好的机体免疫调控、抗炎、耐药、抗病毒、器官保护^[2] 和神经细胞保护等功能^[3-4]. 其不仅完全具备其他黄芪植物多糖的特殊功效, 而且还具有一些新的特点使它拥有其他常规黄芪植物多糖中所无法与之相比较的强大功效, 其中所具有的抗病毒功效和抗菌作用反应强度大约相当于其他多

种常规药用黄芪植物多糖的 2 倍多, 对于多种病毒的抗菌作用更是其他常规黄芪植物多糖的 30 倍多, 由于它的成分含量少, 效果好, 因此使它拥有“超级黄芪多糖”的美誉. 黄芪甲苷的含量测定检验方法最常见的有薄层扫描法、近红外波谱法^[5]、高效液相色谱法、高效液相色谱-蒸发光散射法等.

参子安胎片是昆明市中医医院制剂室研制生产的中药制剂, 原名保产达生片, 主要由当归、黄芪等药材组成. 具有养气血、益阴精、充盈胞脉冲任、强健母体的功效^[6]. 由于该样品为院内制剂, 在《中国药典》中没有关于参子安胎片的黄芪甲苷含量测定的记录, 为此, 本研究建立了高效液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 联用法对其含

收稿日期: 2022 - 05 - 04

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2020J0505).

作者简介: 李娅 (1998—), 女, 云南文山山人, 2017 级本科生, 主要从事有机化合物的表征研究.

*通信作者: 王秀芳 (1980—), 女, 河南周口人, 讲师, 博士, 主要从事有机化学研究, E-mail: wangxf@kmu.edu.cn.

量进行测定, 以期参子安胎片中黄芪甲苷的含量测定提供参考。

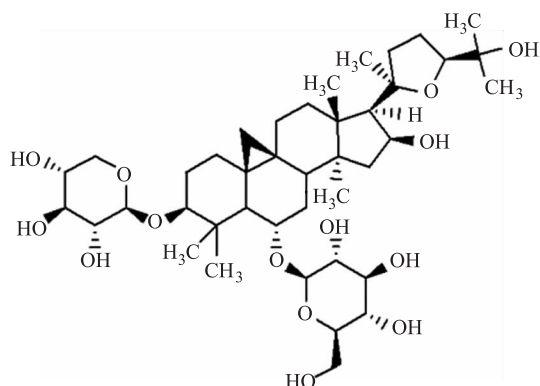


图1 黄芪甲苷结构式

1 试剂和仪器

分析纯试剂购于国药集团化学试剂有限公司; 色谱纯试剂购于 Fisher Chemical; 黄芪甲苷对照品(纯度 96.9%) 购于中国食品药品检定研究院; 参子安胎片的产来自昆明市中医药制剂中心(编号: 200825, 200827, 200828)。HPLC-ELSD 仪(Agilent 1260, 安捷伦科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取黄芪甲苷对照品 0.005 421 g 于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 配制每 1 mL 中含 0.216 8 mg 的溶液, 即得黄芪甲苷对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备

取参子安胎片粉末 9 g, 精密称量其质量, 置于 250 mL 的具塞锥形瓶中, 用量筒量取甲醇 100 mL 加入其中, 放置在水浴锅上冷凝回流 1.5 h。取出放冷, 取上清液过滤, 过滤后的滤纸重新放入锥形瓶中, 再加入 50 mL 甲醇于该锥形瓶中, 然后放入超声波清洗机中, 100 W 超声 20 min。放冷后再次取上层清液过滤, 滤纸重新放入锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 再放入同一台超声

波清洗机中超声。合并甲醇提取液于蒸发皿中, 在水浴锅上蒸发至近干, 加入 25 mL 热水溶解, 用玻璃棒将溶解后所得的溶液转移至分液漏斗中, 用水饱和的正丁醇溶解提取 4 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇提取液。再用氨试液洗涤正丁醇提取液 2 次, 每次 50 mL, 弃去氨试液, 合并正丁醇溶液。合并后的正丁醇溶液在水浴锅上蒸发至近干, 用甲醇溶解残渣, 移入 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 有机滤膜和注射器缓慢推入液相小瓶里, 摇匀, 即得到供试品溶液。

2.1.3 阴性样品的制备

参子安胎片阴性样品指参子安胎片中除没有黄芪成分外, 其他成分都不变的样品。称取 9 g 左右的参子安胎片阴性样品, 精密称量, 其他步骤与“2.1.2”项下的步骤一致。

2.1.4 色谱条件

色谱柱为安捷伦 SB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 V (乙腈): V (水) = 32:68, 流速为 0.8 mL/min, 雾化器工作温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 蒸发管工作温度 90 $^{\circ}\text{C}$, 气体流速 1.6 L/min, 运行时间 45 min。

2.2 测定方法

分别精密吸取 20 μL 的供试品溶液以及 3, 10 μL 对照品溶液, 注入高效液相色谱仪中, 则可得其色谱图。以外标两点法对数方程计算, 即可得到供试品的含量。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性实验

取阴性样品, 按照“2.1.3”项下阴性样品的制备工艺制成阴性供试品溶液。精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 20 μL , 分别注入高效液相色谱仪中, 记录色谱图。从图 2 ~ 图 4 可以看出, 在与对照品的色谱峰共同相应曝光位置上, 供试品溶液同样具有与对照品色谱峰相应的曝光时间和相同的色谱峰, 而阴性样品溶液则在此处对应的位置上无任何色谱峰。

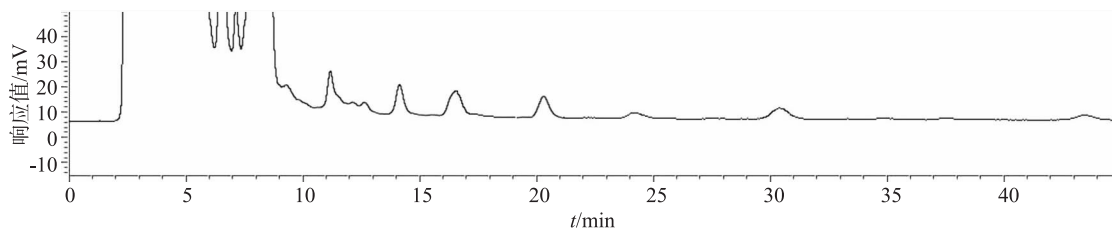


图2 参子安胎片阴性样品色谱图

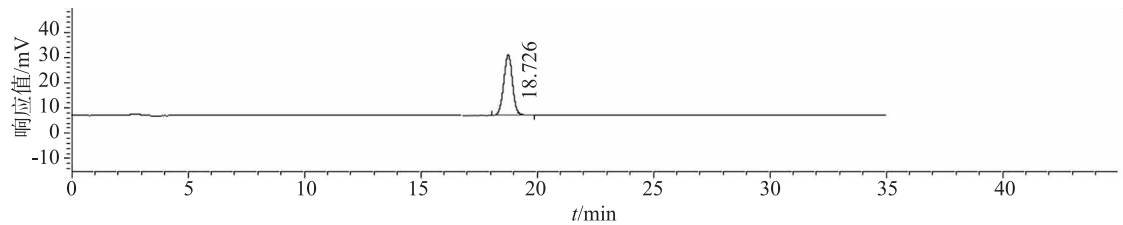


图3 黄芪甲苷对照品色谱图

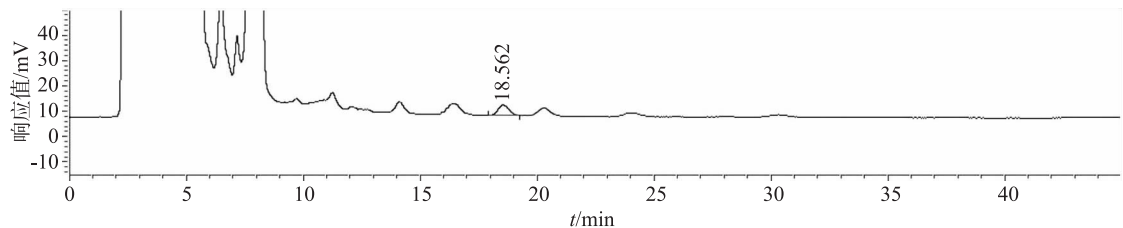


图4 参子安胎片供试品色谱图

2.3.2 线性关系考察

精密吸取配制好的对照品溶液 3, 6, 10, 15, 20, 25, 30 μL , 分别注入高效液相色谱仪中, 按照“2.1.4”色谱条件测定峰面积. 以 $\lg \rho$ (进样

量) 为横坐标, $\lg S$ 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $y=1.790\ 7x+1.691\ 6$, $R^2=0.999\ 8$. 测定结果显示, 进样量在 $0.630\ 3\sim6.303\ 3\ \mu\text{g}$ 的范围内具有非常高的线性关系, 结果见表 1 与图 5.

表 1 线性范围考察结果

ρ (进样量)/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.317 7	0.635 4	1.059 0	1.588 5	2.118 0	2.647 5	3.177 0
$\lg \rho$ (进样量)	-0.200 4	0.100 6	0.322 4	0.498 5	0.623 5	0.720 4	0.799 6
$\lg S$	1.324 3	1.888 7	2.262 9	2.581 3	2.809 2	2.982 5	3.121 7

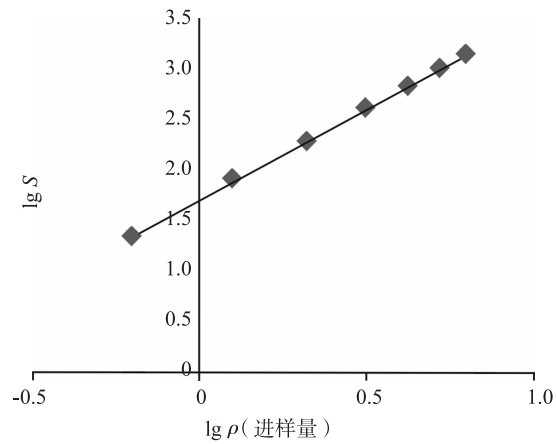


图5 标准曲线

2.3.3 精密度实验

取批号为 200825 的样品, 按“2.1.2”项下供试品溶液的制备工艺方法进行制备, 然后精密吸取 20 μL 的供试品溶液, 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定色谱峰面积, 结果见表 2. RSD 为 0.93%, 表明所检测的数据精密度良好.

2.3.4 稳定性实验

取批号为 200827 的供试品, 按照“2.1.2”项下供试品溶液的制备工艺方法进行制备, 分别在规定的配制后 0, 4, 8, 12, 16 h, 按照规定的方法进行测定, 结果见表 3. 结果显示, 供试品溶液在 16 h 内稳定.

表 2 精密度实验结果

序号	1	2	3	4	5	6	平均值	$RSD/\%$
峰面积	631.40	629.30	636.80	644.50	637.00	641.30	635.80	0.93

表 3 稳定性实验结果

t/h	0	4	8	12	16	平均值	$RSD/\%$
峰面积	131.40	137.50	147.00	145.70	154.70	143.26	6.29

2.3.5 重复性实验

取批号为 200827 的样品，并按照“2.1.2”项下供试品的制备工艺方法，平行制备 6 份实验用的供试品溶液，然后用相同方法对其进行测定，得到平均含量为 0.117 4 mg/g，*RSD* 为 1.73%。表明所采用方法的测定工艺具有较高的重复性。

2.3.6 加样回收率实验

精密称取 200827 批号中已知含量的参子安胎片样品 6 份（其中黄芪甲苷的含量为 0.117 4 mg/g），分别在样品中准确加入黄芪甲苷对照品适量，按照“2.1.2”项下供试品溶液制备工艺方法混合成供试品溶液，用相同方法进行测定，同时计算样品的回收率，得到平均回收率为 99.54%，*RSD* 为 2.58%（*n* = 6）。结果见表 4。

表 4 加样回收率实验结果

序号	取样量/g	样品量/(mg · g ⁻¹)	加入量/(mg · g ⁻¹)	测得量/(mg · g ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
1	5.007 8	0.507 9		1.013 4	101.27		
2	5.007 8	0.507 9		1.014 1	101.42		
3	5.007 6	0.507 9		1.014 1	101.43		
4	5.007 6	0.507 9	0.420 2	0.991 8	96.13	99.54	2.58
5	5.007 6	0.507 9		0.992 8	96.36		
6	5.007 6	0.507 9		1.010 6	100.65		

2.3.7 定量限和检出限实验

1) 定量限. 取 9.005 5 g 供试品，按照“2.1.2”项下方法进行制备，依次取 1 mL 的对照品溶液定容至 5 mL 的容量瓶中，摇匀。用 0.45 μm 的有机滤膜和注射器缓慢推入液相小瓶中，进样 20 μL，测定其峰面积，结果见表 5。

2) 检出限. 取 9.005 5 g 供试品，按照“2.1.2”项下方法进行制备，依次取 0.5 mL 对照品溶液，用甲醇定容至 5 mL 的容量瓶中，摇匀。然后用 0.45 μm 的有机滤膜和注射器将其缓慢推入液相小瓶中，进样 20 μL，测定其峰面积，结果见表 5。

表 5 定量限和检出限

项目	批号	取样量/g	峰面积	<i>w</i> /(mg · g ⁻¹)
定量限	200827	9.005 5	122.037 4	0.030 7
检出限	200827	9.005 5	33.334 0	0.018 0

2.4 样品含量测定

取 3 个批号的参子安胎片，并按照“2.1.2”项下供试品溶液的制备工艺方法制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液 20 μL，注入

高效液相色谱仪中进行测定，同时计算黄芪甲苷的含量。从表 6 可以看出，不同批号的参子安胎片中黄芪甲苷的含量不同，其平均值为 0.087 8 mg/g。

表 6 黄芪甲苷的含量测定结果

编号	批号	<i>w</i> /(mg · g ⁻¹)	<i>RSD</i> /%	<i>w</i> (平均)/(mg · g ⁻¹)
1	200825	0.075 8	0.44	
2	200827	0.115 5	1.56	0.087 8
3	200828	0.072 1	2.61	

3 讨论与小结

3.1 讨论

3.1.1 溶剂的选择

在溶剂的选择方面, 本研究分别使用甲醇和 80% 甲醇考察参子安胎片样品的处理效果. 结果表明, 用 80% 甲醇处理的样品所得结果在本检测条件下均出现不同程度的干扰, 且所测得的含量较低, 因此最终选择使用甲醇溶液处理样品. 实验结果显示, 本方法提取效率高、分离速度快, 测定时无明显的干扰, 稳定性和重现性均能够满足分析的要求. 值得注意的是, 正丁醇萃取液合并在一起后应再采用氨试液萃取 2 次, 以提高其检测含量, 降低目标峰的干扰.

3.1.2 色谱柱的选择

本研究分别考察了 Agilent SB-C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 和 XBridge C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 两种色谱柱的分离效果, 发现两种色谱柱均可对样品进行有效的分离, 但相较于 XBridge C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), Agilent SB-C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 的分离效果更加明显, 分离度更高, 最终采用 Agilent SB-C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 色谱柱.

3.1.3 流动相的选择

参考《中国药典: 一部》(2015 年修订版) 中黄芪含量测定实验项下的方法, 采用乙腈-水为流动相, 考察了 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 32:68$ ^[7]、 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 30:70$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 80:20$ 这 3 种流动相. 结果显示, 供试品溶液在采用

$V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 32:68$ 的色谱测定体系中能有效地洗脱黄芪甲苷后充分取出, 且能够达到很好的基线分离, 因此选择 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 32:68$ 作为流动相.

3.2 小结

本研究建立了高效液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 联用法对参子安胎片中黄芪甲苷的含量进行测定. 结果表明, HPLC-ELSD 法能够有效测定参子安胎片中黄芪甲苷的含量, 方法准确可靠.

[参考文献]

- [1] 曹庆伟, 杜鹃, 罗晋平. 黄芪甲苷含量测定方法的优化及对不同产地、不同等级黄芪中黄芪甲苷含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (13): 2813-2819.
- [2] 吴红伟, 李东辉, 张育贵. 黄芪甲苷对心脏保护作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (1): 81-83.
- [3] 杜澍金, 高维娟. 黄芪甲苷对急性缺血性脑卒中神经保护作用研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27 (9): 32-35.
- [4] 郑清炼, 楚世峰, 许鑫. 黄芪甲苷的神经保护作用研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33 (10): 877-878.
- [5] 战皓, 吴宏伟, 张东. 近红外光谱法测定不同产地黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37 (5): 1391-1396.
- [6] 徐静逍, 徐学艾, 熊丽娟. 保产达生片质量标准初步试验研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33 (4): 67-69.
- [7] 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, 2015: 302-303.

