中药研究

HPLC－ELSD 测定黄芪生络复康丸中黄芪甲苷的含量

武爱玲[1]　赵新杰[2]
（1 河南省洛阳正骨医院，洛阳，471002；2 河南省洛正制药厂，洛阳，471013）

摘要　目的：采用 HPLC－ELSD 法建立黄芪生络复康丸中黄芪甲苷的含量测定方法。方法：色谱柱为 Diamonsic C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈－水（35∶65）为流动相，流速为 1.0 mL·min^{-1}，柱温为 40 ℃。ELSD 检测器，雾化器温度 80 ℃，蒸发器温度 100 ℃，载气流速 1.5 mL·min^{-1}。结果：黄芪甲苷进样量在 1.62～8.10 μg 时线性关系良好，r＝0.999 9，平均加样回收率为 99.08%（RSD＝1.63%）。结论：本方法简便、准确、专属性强，可用于本品的质量控制。

关键词　HPLC－ELSD；黄芪生络复康丸；黄芪甲苷；含量测定

HPLC-ELSD Determination of Astragaloside in Huangqi Shengluo Fukang Pill

Wu Ailing[1], Zhao Xinjie[2]
(1 *Henan Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital*, *Luoyang* 471002, *China*;
2 *Henan Luozheng Pharmaceutical Factory*, *Luoyang* 471013, *China*)

Abstract　**Objective**: To establish a content determination method of Astragaloside in Huangqi Shengluo Fukang Pill by HPLC-ELSD. **Methods**: The chromatographic Column Diamonsic C_{18} (4.6mm×250mm, 5μm) was set. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (35:65), and the flow rate was 1.0mL·min^{-1}. The column temperature was 40℃, and the content was determined with evaporate light scattering detector (ELSD). The temperature of spray chamber was 80℃ and the temperature of evaporator was 100℃. The gas flow rate of parameter of ELSD was 1.5mL·min^{-1}. **Results**: The linear range of Astragaloside was within 1.62 to 8.10μg (r=0.9999). The average recovery rate was 99.08% (RSD=1.63%. **Conclusion**: The established method is convenient and accurate and highly specific, and it can be used for the quality control of Huangqi Shengluo Fukang Pill.

Key Words　HPLC-ELSD; Huangqi Shengluo Fukang Pill; Astragaloside; Determination
中图分类号：R286.0　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2014.05.031

黄芪生络复康丸是本院的内部制剂，由黄芪、淫羊藿、丹参、赤芍、川芎、桃仁等药组成，具有补气益肾生髓，活血化瘀生络的作用，用于不完全性周围神经损伤及周围神经变性。原标准中采用薄层扫描法对黄芪甲苷进行含量测定[1]，因薄层扫描法含量测定重现性较低，操作繁琐，测定周期长。为了更有效地控制其产品质量，本文应用高效液相色谱法测定黄芪生络复康丸中黄芪甲苷的含量，并对其进行方法学考察。结果表明，该法简便快速，结果准确。

1　仪器与试药

shimadzu LC－20A 高效液相色谱仪（日本岛津公司），LC Workstation，配有四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、自动进样器；ELSD－2000ES 型蒸发光散射检测器（美国 Alltech 公司）。AB135－S 型梅特勒拖利多电子天平，METTLER AE200 电子分析天平。黄芪甲苷对照品（批号：110781－200613）购自中国药品生物制品检定所。试剂均为分析纯。六批样品均由河南省洛阳正骨医院制剂科生产并提供。

2　方法与结果[2－13]

2.1　色谱条件　Diamonsic C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；以乙腈－水（35∶65）为流动相进行洗脱，流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：40 ℃；ELSD 检测器，雾化器温度 80 ℃，蒸发器温度 100 ℃，载气流速 1.5 mL·min^{-1}。色谱柱的理论塔板数以黄芪甲苷峰计不低于 3 000。进样量：10 μL。

2.2　系统适用性试验　在选定条件下，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，有相同保留时间的色谱峰，且与其他相邻色谱峰分离度大于 1.5。理论塔板数以黄芪甲苷峰计在 3 000 以上，而阴性对照在此保留时间无干扰（见图 1）。

作者简介：武爱玲（1978—），女，河南省洛阳正骨医院，主管药师，硕士，主要从事医院制剂开发与研究工作
通信作者：赵新杰（1972—），男，河南省洛正制药厂，副研究员，地址：河南省洛阳市白马寺车站路北 1 号河南省洛正制药厂，E－mail：wal2317@163.com

2.3 对照品溶液的制备 精密称取在 60 ℃真空干燥 4 h 的黄芪甲苷对照品适量,用甲醇溶解,制成每 1 mL 含黄芪甲苷 700 μg 的溶液作为对照品 1,吸取对照品 1 溶液适量,甲醇稀释制成每 1 mL 含黄芪甲苷 260 μg 的溶液作为对照品 2,即得。

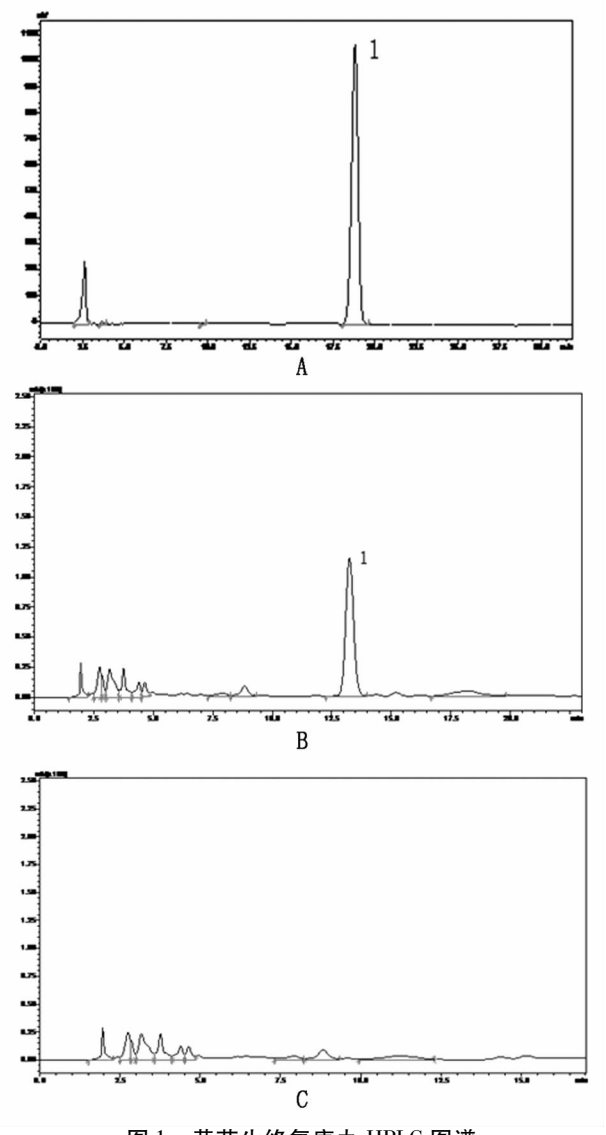

图 1 黄芪生络复康丸 HPLC 图谱

注:A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 黄芪甲苷

2.4 阴性对照液的制备 取缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液的制备方法进行处理,制得阴性对照液。

2.5 供试品溶液的制备 取本品研细,取约 5 g,精密称定,加水 10 mL,微热溶解,转移至分液漏斗中,水饱和正丁醇 40 mL,萃取 4 次,合并正丁醇层,再取氨试液 40 mL,萃取 2 次,弃去氨水层。减压浓缩回收正丁醇至干,残渣用甲醇溶解定容于 10 mL,摇匀,即得。

2.6 线性关系考察 精密称取黄芪甲苷对照品 1 620 mg,置 10 mL 的棕色量瓶中,加甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀。精密吸取 2.5,2.0,1.5,1.0,0.5 mL 置 5 mL 的量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取 10 μL 进样,测定其峰面积,以黄芪甲苷进样量的对数为横坐标,以峰面积的对数为纵坐标,绘制标准曲线,进行回归分析,得黄芪甲苷的回归方程 Y = 0.998 7X + 6.640 7,r = 0.999 9,线性范围为 1.62 ~ 8.10 μg。

2.7 精密度试验 精密吸取“2.3”项下对照品 2 溶液 10 μL,重复进行 5 次,测定黄芪甲苷峰面积积分值。结果其相对标准差 RSD 为 1.56%。

2.8 重现性试验 取同一批号供试品,按“2.5”项下方法制成供试品溶液 5 份,分别进样 10 μL,测定黄芪甲苷峰面积积分值。结果 RSD 为 1.38%。

2.9 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 10 μL,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 时进样,测定黄芪甲苷峰面积积分值。结果 RSD 为 1.67%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.10 加样回收率试验 精密称取已测定含量的黄芪生络复康丸细粉(批号:120601)2.5 g,共 6 份,各加入黄芪甲苷浓度为 1.402 mg/mL 的混合对照液 2 mL,分别用与“2.5”项下方法制得供试品溶液,各进样 10 μL,进行测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果(n = 6)

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.510 3	2.861 7	2.804 0	5.605 7	97.86	99.08	1.63
2.501 0	2.851 1		5.644 4	99.62		
2.457 6	2.801 7		5.615 5	100.35		
2.489 7	2.838 3		5.559 0	97.03		
2.502 0	2.852 3		5.693 0	101.31		
2.496 7	2.846 2		5.603 7	98.34		

2.11 样品测定 取 6 个批号的样品,按“2.5”项下方法制成供试品溶液,分别精密吸取两个浓度的对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,外标两点法计算,即得。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n = 2)

批号	黄芪甲苷含量/mg · g^{-1}	批号	黄芪甲苷含量/mg · g^{-1}
120601	1.14	120604	1.19
120602	1.04	120605	1.08
120603	1.15	120606	1.45

3 讨论

黄芪甲苷含量测定方法较多,主要有高效液相色谱法、薄层扫描法、比色法、荧光法等几大类方法[14]。但大多数制剂由于成分复杂,干扰严重;近年来,随着新型检测器 ELSD 的出现,使原本无紫外吸收的黄芪甲苷也得以很好的分离,HPLC 法因操作简单、快速、灵

敏度高、重现性好而优于其他方法。

黄芪生络复康丸是本院的内部制剂，原标准中采用薄层扫描法对黄芪甲苷进行含量测定，工作中经常出现展开系统不稳定，分离效果欠佳的情况，另因薄层扫描法含量测定重现性较低，操作繁琐，测定周期长。故本方法采用了 ELSD－HPLC 法。

样品处理方法文献上有索氏提取脱酯后萃取法、超声提取后萃取法、大孔树脂提取法、KOH 回流提取法、中性氧化铝柱法[15－16]。本研究分别比较了溶剂两相萃取、大孔吸附树脂和中性氧化铝柱 3 种方法。结果表明，大孔吸附树脂法在洗脱过程中易产生气泡，且保留率较低。中性氧化铝柱可吸附大部分水溶性及脂溶性杂质，能有效除去样品溶液中较多杂质，但操作繁琐。而溶剂萃取法操作简便，且能除去大部分杂质，使样品溶液得到较好的精制效果。故选用溶剂萃取法。

流动相的选择，考察了 5 种展开系统对黄芪生络复康丸中黄芪甲苷的分离及含量测定的影响。曾采用甲醇－水（80∶20）、甲醇－水（75∶25）、乙腈－水（30∶70）、乙腈－水（32∶68）、乙腈－水（35∶65）等不同流动相，结果测定流动相为乙腈－水（35∶65）时黄芪甲苷峰形良好，可达到基线分离，与相邻峰分离度较好。本试验也对柱温条件进行了考察，结果表明柱温在 40 ℃时峰形较好。

ELSD 检测器参数的确定：经多次试验，并按 ELSD 检测器设置要求，确定了雾化器温度 80 ℃，蒸发器温度 100 ℃，载气流速 1.5 mL·min^{-1}。因为温度过高或过低直接影响溶剂的挥发程度，进而影响基线的稳定性。

综上所述，本方法操作简便、结果准确，重复性好，加样回收率高，可用于黄芪生络复康丸的含量测定。

参考文献

[1]刘晓红，谢艳，王志国. 黄芪生络复康丸的质量标准研究[J]. 中医药信息，2005，22(4)：81－82.

[2]施佳平. 高效液相色谱－蒸发光散射检测法测定芪黄胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药学，2006，17(13)：1013－1014.

[3]李飞，周洪雷，杜吴忱，等. 高效液相色谱—蒸发光散射检测法测定心脑补益口服液中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业，2011，20(5)：16－17.

[4]张伟，马久太，王晓梅. HPLC—ELSD 法测定宫瘀净胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 世界中医药，2011，6(4)：349－350.

[5]何江敏，丁洁，叶虹. 高效液相色谱—蒸发光散射法测定养胃颗粒中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业，2010，19(22)：43－44.

[6]朱克旭，李永宏，刘冰冰. HPLC－ELSD 法测定芪心合剂中黄芪甲苷的含量[J]. 安徽医药，2011，15(1)：1364－1365.

[7]雷健，胡雪莲，金一南，等. 高效液相色谱－蒸发光散射法测定益生胶囊中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业，2012，21(16)：47－48.

[8]张凤瑞，周贤，刘炎. 当归补血汤中黄芪的鉴别及黄芪甲苷的含量测定[J]. 吉林中医药，2013，33(3)：289－291.

[9]潘宏林，张坦，赵元元. 不同提取方法对黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的影响[J]. 中药材，2004，27(10)：774－775.

[10]张蔷，高文远，满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 2013，37(21)：3203.

[11]王迅，李辉，陈方超. 健肾片Ⅱ号中黄芪甲苷含量测定的影响因素[J]. 中国药师，2009，12(8)：1155－1157.

[12]代丽萍，石任兵，梁吉春. 芪芍方有效部位中黄芪甲苷和黄芪总皂苷质量控制方法的建立[J]. 北京中医药大学学报，2010，33(4)：270－273.

[13]张杰，张凌艳，李贺一. 生血康口服液黄芪甲苷含量测定方法学研究[J]. 黑龙江医药，2011，24(1)：23－24.

[14]欧阳春华. 黄芪甲苷含量测定几种常用方法的比较[J]. 中国现代药物应用，2009，3(15)：139－141.

[15]于慧斌，张晓燕，雷龙，等. “前愈”浓缩丸中黄芪甲苷含量测定的预处理方法[J]. 中国药业，2007，10(9)：935.

[16]刘浩文，刘嘉仪，杨妙荣，等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究[J]. 中药新药与临床药理，2011，22(6)：659－662.

（2013－05－29 收稿 责任编辑：徐颖）

（上接第 570 页）

[14]马素娜，谢世平，郭会军，等. 艾滋病及病毒携带者 282 例咳嗽病例回顾性分析[J]. 中医学报，2011，26(5)：513－516.

[15]桑海艳，谢世平，武兴伟. 艾滋病腹泻病例回顾的因子分析[J]. 光明中医，2011，26(3)：457－459.

[16]王艳春，彭勃，李雁，等. 艾滋病与非艾滋病发热的流行病学对照调查研究[J]. 中华中医药杂志，2012，27(4)：1201－1205.

[17]姜枫，符林春，马建萍，等. 艾滋病中医病因病机中的地域因素[J]. 中国中西医结合杂志，2012，32(6)：748－750.

[18]姜枫，彭勃，谢世平，等. 基于“艾毒伤元”假说的艾滋病中医病因病机临床调查表的制定[J]. 时珍国医国药，2011，22(11)：2777－2778.

[19]彭勃，王丹妮. 对艾滋病无症状 HIV 感染期的认识[J]. 中华中医药杂志，2006，21(11)：663－665.

[20]何慧婧，徐鹏，辛倩倩，等. 艾滋病单阳家庭安全套使用情况及影响因素[J]. 中华疾病控制杂志，2013，17(5)：392－395.

[21]崔兆麟. 河南省 3 个艾滋病疫情高发村 HIV 家庭内传播规律队列研究[D]. 北京：中国疾病预防控制中心，2009.

[22]陈晓楠. “同气相求”理论内涵及其对中医基本理论的影响[J]. 中医学报，2011，26(12)：1454－1455.

[23]朱文锋. 证素辨证学[M]. 2 版. 北京：人民卫生出版社，2008：88.

[24]姜枫，符林春，马建萍，等. HIV 感染者和艾滋病患者的中医证素分布特点[J]. 中西医结合学报，2011，9(9)：955－964.

（2014－03－17 收稿 责任编辑：洪志强）