

中药研究

高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定
黄七胶囊中黄芪甲苷的含量杜 鹏¹ 顿宝生² 杨新杰³ 彭修娟²

(1 陕西省医疗机构药品采购中心,西安,710065; 2 陕西国际商贸学院中药研究院,咸阳,712046; 3 陕西中医学院,咸阳,712046)

摘要 目的:评价高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)黄七胶囊中黄芪甲苷的含量测定。方法:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-水(32:68)为流动相;蒸发光散射检测器;柱压11.2~12.3 MPa;流速:1.0 mL/min;柱温:室温。理论塔板数以黄芪甲苷峰计算应不低于4 000;峰拖尾因子为1.02。结果:HPLC-ELSD法精密度、重复性、稳定性、回收率良好。黄芪甲苷对照品进样量在1.0528~10.528 μg 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9, n=7$)。结论:高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定黄七胶囊中黄芪甲苷含量是可行的。

关键词 黄七胶囊;高效液相色谱-蒸发光散射检测器法;黄芪甲苷

Contents of Astragaloside in Huangqi Capsules Measured by HPLC-ELSD

Du Peng¹, Dun Baosheng², Yang Xinjie³, Peng Xiujuan²

(1 Shaanxi Medical Institutions and Drug Procurement Center, Xi'an 710065, China; 2 Chinese Medicinal Research Institute, Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China; 3 Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract Objective: To evaluate contents of astragaloside in Huangqi Capsules measured by HPLC-ELSD. **Methods:** The octadecyl silane bonding silica gel was the filler, with acetonitrile-water (32:68) as mobile phase, and the detector was ELSD with the column pressure of 11.2~12.3 MPa and the flow rate of 1.0 mL/min. Column temperature: indoor temperature. Theoretical plate number was calculated by puerarin peak which should not be less than 4 000; Trailing factor was 1.02. **Results:** The method of HPLC-ELSD had good accuracy, repeatability, stability and recovery rate. A good linearity relationship of the sample size of astragaloside comparison products in the range of 1.0528-10.528 μg ($r=0.999\ 9, n=7$). **Conclusion:** Contents of astragaloside in Huangqi Capsules measured by HPLC-ELSD is feasible.

Key Words Huangqi Capsules; HPLC-ELSD; Astragaloside

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.053

中风又名“卒中”,其基本病机为阴阳失调、气血逆乱、上犯于脑,导致脑脉痹阻或血溢脑脉之外,临床以卒然昏仆、不省人事、半身不遂、口舌歪斜、语言不利、偏身麻木为主症的一种疾病^[1]。因本病起病急剧,变化迅速,与自然界善行而数变之风邪特性相似,故古人以此类比,名为中风^[2]。中风是中医学中的4大顽疾之一,具有发病率高、复发率高、致残率高、病死率高的特点,严重危害人民健康的疾病^[3]。中风初发时以风证为主;发病1~2周时,以痰湿证、血瘀证为多;恢复期以血瘀证、气虚证为多^[4]。现代血液流变学研究表明,中风患者血液存在着“浓”(红细胞比容增高)、“黏”(全血黏度比、血

浆黏度比和纤维蛋白原增高)、“聚”(红细胞时间性泳时间长)的情况^[5]。故益气活血法为中风、特别是中风恢复期的重要治疗法则。

黄七胶囊是在黄七汤的基础上研制而成,由黄芪、土鳖虫、三七、葛根4味药材组成,具有益气活血,化瘀通络之功效。用于气虚血瘀,脉络瘀阻所致的中风恢复期,对半身不遂,肢体麻木,口眼歪斜,言语不清或不语,感觉减退或消失治疗效果良好^[6]。方中君药黄芪是一味常用中药,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效。临床用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛、便血崩漏、表虚自汗、气虚水肿、痈疽难溃、久溃不敛、血虚痿黄、内热

基金项目:咸阳市2014年重大科技专项(2014k01-21)

作者简介:杜鹏(1978.03—),男,研究生,主管中药师,研究方向:制药工程及药物分析,E-mail:510720087@qq.com

通信作者:彭修娟(1981.01—),女,研究生,讲师,研究方向:中药药效物质基础研究,E-mail:935310836@qq.com

消渴,慢性肾炎蛋白尿、糖尿病等^[7]。现代研究表明,黄芪皂苷具有减少脑缺血再灌注(I/R)后神经元凋亡^[8-10]、降低Ca²⁺超载^[11-12]、减少活性氧的损伤^[13]、减轻炎症反应^[14]、促进修复^[15]等作用,在中风恢复期的抗细胞损伤和损伤后修复中发挥重要作用。在新药研制过程中,我们对黄七胶囊中君药黄芪的有效成分—黄芪甲苷的高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)含量测定进行方法学研究,为有效控制黄七胶囊的质量奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 P-3000 型高效液相色谱仪;ELSD-UM3000 型蒸发光散射检测器;Trisep-2003 色谱工作站,7725i 进样器。

1.2 试药 10 批样品由杨凌无为制药集团公司自制,黄芪甲苷对照品:中国药品生物制品检定所提供,批号:110781-200613,供含量测定用。3 批研究中试样品,批号:20100602、20100605、20100608,由该公司胶囊剂车间生产,乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,柱压 11.2 ~ 12.3 MPa;流速:1.0 mL/min;柱温:室温。理论塔板数以黄芪甲苷峰计算应不低于 4 000;峰拖尾因子为 1.02。

2.1.2 流动相的选择比例 将乙腈-水溶液的比例分别选为(28:72)(32:68)(36:64)(40:60),按正文方法用对照品溶液精密吸取 20 μL,作图,结果表明,乙腈-水溶液(32:68)为流动相的分离效果最佳。见表 1。

表 1 黄芪甲苷流动相的选择比例

流动相		峰面积
乙腈	水	
28	72	40 080
32	68	123 450
36	64	91 482
40	60	114 830

2.2 提取溶剂的选择 黄芪甲苷在甲醇和水中有较好的溶解度,试用水、25%、50%、75%、100%的甲醇超声提取,进行比较,选择出最佳的提取溶剂。分别称取样品(批号:20100406)5 份,(约 2.0 g),精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入水、25%、50%、75%、100%的甲醇 100 mL,超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz)30 min,离心(转速为 3 000 r/min),取

上清液置蒸发皿中,残渣分别用不同浓度的甲醇或水洗涤 3 次,每次 10 mL,洗液并入蒸发皿中浓缩至干,残渣加水 10 mL,微热使溶解,用水饱和的正丁醇液振摇提取 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 70% 乙醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,分别用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。精密吸取对照品溶液 10 μL、20 μL 与供试品溶液 15 μL,注入液相色谱仪测定,以外标两点法对数方程计算,测定结果见表 2。

表 2 提取溶剂的选择结果

溶剂	称样量 (mg)	峰 面积	Ln 称 样量	Ln 峰 面积	Ln 峰面积/ Ln 称样量
水	2005.6	266 166	7.603 70	12.491 88	1.64
25% 甲醇	2005.4	269 223	7.603 60	12.819 16	1.69
50% 甲醇	2001.4	435 595	7.601 60	12.984 47	1.71
75% 甲醇	2001.1	391 461	7.601 45	12.877 64	1.69
甲醇	2002.3	399 133	7.602 05	12.897 05	1.70

上述结果表明,用 50% 甲醇提取,黄芪甲苷提取率最高,故选择 50% 甲醇作为提取溶剂。

2.3 超声时间的确定 分别称取样品约 2.0 g (批号:20100406) 4 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,分别超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz) 15、30、45、60 min,测定结果见表 3。

表 3 超声时间的考察结果

时间 (min)	称样量 (mg)	峰面积 1	峰面积 2	平均峰 面积(A)	Ln 称 样量	Ln 峰 面积	Ln 峰面积/ Ln 称样量
15	2004.9	246 120	264 878	255 499	7.603 35	12.450 97	1.64
30	2002.8	293 220	259 608	276 414	7.602 30	12.529 66	1.65
45	2004.4	320 001	324 602	322 301.5	7.603 10	12.683 24	1.67
60	2007.1	290 221	292 852	291 536.5	7.604 45	12.582 92	1.65

上述结果表明,超声 45 min 提取效果最佳,故超声提取时间确定为 45 min。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取浓度为 0.5264 mg/mL 的黄芪甲苷对照品溶液 2、4、8、12、18、20 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,以 Ln 峰面积(Y)为纵坐标,Ln 含量(X)为横坐标,求得 2 点对数方程:Y = 1.374 38X + 9.90402, r = 0.999 9, n = 7。见表 4。结果表明,黄芪甲苷进样量在 1.052 8 ~ 10.528 2 μg 范围内线性关系良好。

2.5 稳定性试验 取本品(批号 20100406)精密称定,按正文中供试品制备方法制备样品,于 0、4、8、

12、24 h 按正文方法测定,即得。结果表明,本品溶液在 24 h 内稳定。见表 5。

表 4 黄芪甲苷含量测定线性关系

进样量对照品浓度 (μ L) (mg/mL)	含量 (μ g)	峰面积 1	峰面积 2	平均峰 面积	Ln 含量	Ln 峰面积
2	0.526 4	1.052 8	21812	21 647	21 729.5	0.051 453 9.986 43
4	0.526 4	2.105 6	51 181	57 984	54 582.5	0.744 60 10.907 47
8	0.526 4	4.211 2	143 368	143 233	143 300.5	1.437 75 11.872 70
12	0.526 4	6.316 8	261 325	252 148	256 736.5	1.843 21 12.455 81
18	0.526 4	9.475 2	452 793	447 344	450 068.5	2.248 68 13.017 16
20	0.526 4	10.528	498 117	493 371	495 744	2.354 04 13.113 81

表 5 稳定性试验

时间(h)	0	4	8	12	24
Ln 峰面积	12.654 19	1 267 976	12.701 44	12.726 44	12.721 37
RSD(%)			0.24		

2.6 精密度试验 取对照品溶液,在正文色谱条件下重复进样 5 次,记录峰面积,结果见表 6。表明本方法精密度良好。

表 6 精密度实验结果

进样量	10 μ L				
进样次序	1	2	3	4	5
峰面积对数值	11.749 92	11.756 04	11.740 07	11.770 16	11.741 72
RSD(%)			0.11		
进样量	20 μ L				
进样次序	1	2	3	4	5
峰面积对数值	12.603 73	12.601 45	12.591 42	12.606 66	12.599 38
RSD(%)			0.046		

2.7 重复性试验 取同一批号样品(批号:20100406)6 份,按正文中供试品溶液制备方法制备,按正文方法测定含量,结果表明,本方法重复性良好。见表 7。

表 7 重复性实验结果

编号	含量(mg/粒)	RSD(%)
1	0.640 8	0.24
2	0.642 9	
3	0.643 3	
4	0.645 1	
5	0.642 7	
6	0.641 5	
平均	0.642 7	

2.8 回收率试验 取已知含量的样品(批号:20100406,含量为 0.6427 mg/粒)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入黄芪甲苷对照品溶液(浓度为 0.596 4 mg/mL)2 mL,加入 50% 甲醇 98 mL,以下皆同正文,依正文方法测定,以下式计算回收率:

回收率(%) = $\frac{\text{测得总量(mg)} - \text{已知样品含量(mg)}}{\text{加入对照品的量(mg)}} \times 100\%$ 。

结果表明,本方法回收率良好。见表 8。

表 8 加样回收率实验结果

编号	称样量 (mg)	相当于黄 芪甲苷量 (mg)	加入对 照品量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	1005.2	1.428 3	1.192 8	2.606 9	98.81	98.90	0.40
2	1006.3	1.429 9	1.192 8	2.609 2	98.87		
3	1004.5	1.427 4	1.192 8	2.602 9	98.55		
4	1003.8	1.426 4	1.192 8	2.615 2	99.66		
5	1006.9	1.430 8	1.192 8	2.607 5	98.65		
6	1002.1	1.423 9	1.192 8	2.603 3	98.88		

2.9 样品测定 按处方量的 1/10,分别制备 7 批样品,连同成型工艺研究试验的 3 批样品,依据正文中含量测定方法,进行含量测定,结果见表 9,经对 10 批样品中黄芪甲苷的含量测定,平均值为 0.64 mg/粒,考虑到药材来源及大工业生产、贮藏等因素,故暂定本品每粒含黄芪甲苷(C41H68O14)不得少于 0.52 mg。

表 9 样品中黄芪甲苷的含量测定结果

序号	批号	测定值(mg/粒)		平均测得值 (mg/粒)
		1	2	
1	20100402	0.642 66	0.643 02	0.643
2	20100404	0.646 39	0.642 72	0.645
3	20100406	0.640 47	0.644 14	0.642
4	20100409	0.618 12	0.618 80	0.618
5	20100411	0.63534	0.640 97	0.638
6	20100414	0.635 00	0.644 24	0.640
7	20100419	0.633 92	0.634 62	0.634
8	20100423	0.644 47	0.659 58	0.652
9	20100425	0.626 05	0.617 39	0.622
10	20100428	0.638 98	0.627 62	0.633

2.10 验证实验 采用黑龙江产的蒙古黄芪投药,制得的 3 批中试样品,批号:20100602、20100605、20100608,对该黄七胶囊中黄芪所含黄芪甲苷进行了含量测定。另外,在该处方中取掉黄芪,按正文生产工艺投料制作,制成阴性对照品,分别进行含量测定,结果见表 10。

表 10 中试样品中黄芪甲苷含量测定结果

批号	测得值(mg/粒)		平均测得值 (mg/粒)
	1	2	
20100602	0.645	0.646	0.646
20100605	0.643	0.642	0.642
20100608	0.645	0.644	0.644

以上 3 批中试样品均符合规定,平均测得值为 0.644 mg/粒,含量测定成分黄芪甲苷的转移率为 93.33%,证明该标准所指定的黄芪甲苷含量限度可行,阴性对照品在相应部位未出峰,证明处方中其他药材对本含量测定无干扰。见图 1。

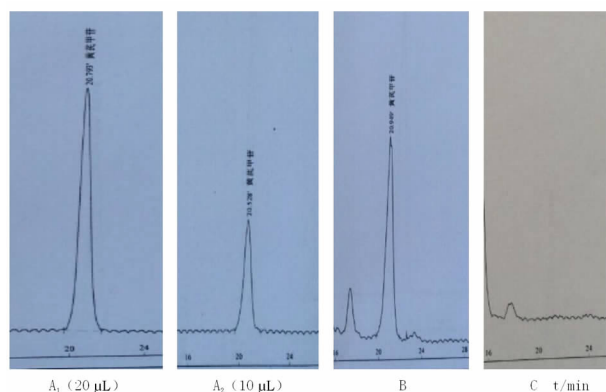


图1 对照品(A_1 、 A_2)、供试品(B)及阴性对照(C)色谱图

3 讨论

在提取溶剂的选择试验中,以外标两点对方程计算,用 $\ln$ 峰面积/ $\ln$ 称样量为筛选指标,优选出了最佳提取溶剂为 50% 甲醇,优于中华人民共和国药典 2010 年版一部黄芪药材中黄芪甲苷含量测定用甲醇作为提取溶剂^[5]。

中华人民共和国药典对黄芪药材中黄芪甲苷含量测定采用索氏提取器,加热回流提取 4 h,本实验采用超声提取 45 min,提取效果最佳,大大节省了提取时间,降低了能量的消耗。

HPLC-ELSD 法简便、灵敏、准确。精密度、重复性、稳定性、回收率及线性关系良好。黄芪甲苷的含量测定常采用薄层扫描法,但重现性差,且黄芪甲苷只在 201 nm 处呈现弱的末端吸收,若采用紫外(UV)检测器测定,干扰非常严重。本实验采用蒸发光散射(ELSD)检测器,对黄芪甲苷有通用响应,能有效的排除干扰。

在本实验条件下,稳定性、精密度、重复性、线性关系良好,平均回收率为 98.90% ($RSD = 0.40\%$),经 10 批样品及 3 批中试样品验证实验,证明该标准所制定的黄芪甲苷含量限度可行,阴性对照品在相应部位未出峰,说明处方中其他药材对本含量测定无干扰。

参考文献

[1] 闵小芬,李卫平,王绍斌,等. 黄芪提取物对局灶性脑缺血再灌注

损伤的抗氧化及线粒体保护作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(2):216-219.

[2] 高建,徐先祥,徐先俊,等. 黄芪总皂苷抗血栓形成作用实验研究[J]. 中成药,2002,24(2):116-118.

[3] 吴师竹,贺正全. 黄芪类品种的药理研究[J]. 中药药理与临床,1992,8(6):24-27.

[4] 王巧云,李金莲,刘永云,等. 黄芪注射液对大鼠静脉血栓形成的影响[J]. 中成药,2003,25(6):498-499.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:284.

[6] 曹雪艳,魏伟,黄举涛,等. HPLC-ELSD 测定起搏胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 安徽医药,2009,13(9):1036-1037.

[7] 单俊杰,王顺春,刘涤,等. 黄芪多糖的化学和药理研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2000,14(3):61.

[8] Yang J, Li J, Lu J, et al. Synergistic protective effect of astragaloside IV-tetramethylpyrazine against cerebral ischemic-reperfusion injury induced by transient focal ischemia[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140(1):64-72.

[9] 张霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液对脑缺血/再灌注大鼠海马神经元 caspase-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(6):867-871.

[10] 刘瑞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液抑制脑缺血再灌注大鼠海马组织 Apaf-1 表达[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(5):872-877.

[11] 颜玲,黄德斌. 黄芪多糖对缺血脑损伤大鼠海马神经递质及 c-fos mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(2):263-268.

[12] 汪茜,王明新,王洁,等. 黄芪多糖对缺血缺氧脑损伤大鼠脑组织 Ca^{2+} 和兴奋性氨基酸的影响[J]. 中国新药杂志,2006,15(12):975-977.

[13] Guo C, Tong L, Xi M, et al. Neuroprotective effect of calycosin on cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(3):768-774.

[14] Yao RQ, Qi DS, Yu HL, et al. Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway[J]. Neurochem Res, 2012, 37(12):2777-2786.

[15] 尹艳艳,李卫平,李维祖,等. 黄芪总苷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤后 BDNF、TrkB 和 p75NTRmRNA 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2009,25(5):672-676.

(2015-01-12 收稿 责任编辑:杨觉雄)