

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.11

HPLC-ELSD 法测定五加芪粉中黄芪甲苷的含量

张 聪¹, 杨 强², 樊丽博¹, 张继颖¹, 张晓会¹

(1. 国家兽药药品工程技术研究中心/洛阳惠中兽药有限公司, 洛阳 471000; 2. 贵州省兽药饲料监察所, 贵阳 550004)

[收稿日期] 2017-03-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0062-05 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了建立五加芪粉中黄芪甲苷的含量测定方法, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测 (HPLC-ELSD) 法, 色谱柱为 Kromasil 100-5C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 35 : 65, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C; 采用 ELSD 检测器, 漂移管温度为 60 °C, 喷雾器温度为 36 °C, 氮气压力为 25 psi。结果显示黄芪甲苷在 1.524~10.16 μg ($r=0.9991$) 之间的对数值与峰面积的对数值呈良好线性关系, 平均加样回收率为 99.4%, $RSD=4.6%$ ($n=6$)。本方法重复性良好, 能准确测定五加芪粉中黄芪甲苷的含量, 对其质量进行控制。

[关键词] 五加芪粉; 黄芪甲苷; HPLC-ELSD 法

Determination of Astragaloside in Wujiq Powder by HPLC-ELSD

ZHANG Cong¹, YANG Qiang², FAN Li-bo¹, ZHANG Ji-ying¹, ZHANG Xiao-hui¹

(1. National Research Center for Veterinary Medicine/Luoyang Huizhong Veterinary Medicine Co., Ltd, Luoyang 471000, China;

2. Guizhou Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Guiyang 550004, China)

Abstract: To establish the method for determining of astragaloside in Wujiq powder by HPLC-ELSD, C18 column (Kromasil 100-5C18, 150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisted of acetonitrile-water (35 : 65), the flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 30 °C, Evaporative light scattering detection condition: drift tube temperature was 60 °C, spray tube temperature was 36 °C, the nitrogen pressure was 25 psi. The calibration curve was linear at a range of 1.524~10.16 μg for astragaloside ($r=0.9991$), the average recovery was 99.4% and RSD was 4.6% ($n=6$). The method was accurate with a good reproducibility and can be used as a quantitative analysis of astragloside in Wujiq powder.

Key words: Wujiq powder; astragaloside; HPLC-ELSD

五加芪粉具有补中益气、扶正祛邪的功效, 用于提高禽的机体免疫力, 配合疫苗使用提高疫苗免疫效果。五加芪粉处方由黄芪和刺五加两味药材组成, 其中黄芪为君药。黄芪主要化学成分为多糖类^[1]、皂苷类^[2]及黄酮类^[3]等, 现代药理学研究表

明黄芪具有显著的免疫增强作用^[4-5], 可提高畜禽免疫力, 广泛用于现代化畜禽养殖。黄芪甲苷做为黄芪提升免疫的主要活性成分^[6], 是控制黄芪及其制剂质量的重要指标, 因此将其做为控制五加芪粉质量的指标。本文研究建立了高效液相色谱-蒸发

光散射法(HPLC-ELSD)测定五加芪粉中黄芪甲苷的含量,为其质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱系统(Waters e2695 型 HPLC;2424 型 ELSD;Empower 2 色谱工作站软件);Kromasil 100-5C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),瑞典 AKZO NOBLE 公司;AB265-S 电子分析天平,瑞士梅特勒托利多公司;HS3120 型超声波清洗器;甲醇、正丁醇、氨水为分析纯;乙腈为色谱纯;水为超纯水。

1.2 试剂 黄芪甲苷对照品,含量:100%,批号:110781-200613,中国食品药品检定研究院;五加芪粉,规格:1 g 相当于 3.3 g 生药,批号:20120201、20120202、20120203,由洛阳惠中兽药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Kromasil 100-5C18(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(35:65);流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃;ELSD 检测器:漂移管温度为 60 ℃,喷雾器温度为 36 ℃,氮气压力为 25 psi。理论塔板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 4000。

2.2 溶液配制

2.2.1 黄芪甲苷对照品溶液制备 取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取供试品 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 50 mL 甲醇超声提取 30 min,抽滤,滤渣连同滤纸放回锥形瓶中,再加 50 mL 甲醇超声提取 30 min,抽滤,用 30 mL 甲醇洗涤滤渣和滤纸,合并滤液,减压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 2 次,每次约 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度、摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液制备 取制备的缺黄芪阴性样品适量(相当于刺五加 1.2 g),置具塞锥形瓶中,

照 2.2.2 项下操作制备成阴性对照溶液。

2.3 测定法 分别精密吸取对照品溶液 5、15 μL,供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,测定,用外标两点法对数方程计算,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 照上述 2.1 项下色谱条件,分别精密吸取对照品溶液 15 μL、供试品溶液 10 μL、阴性对照溶液 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,阴性对照溶液在黄芪甲苷对照品相应的保留时间处无干扰,见图 1。

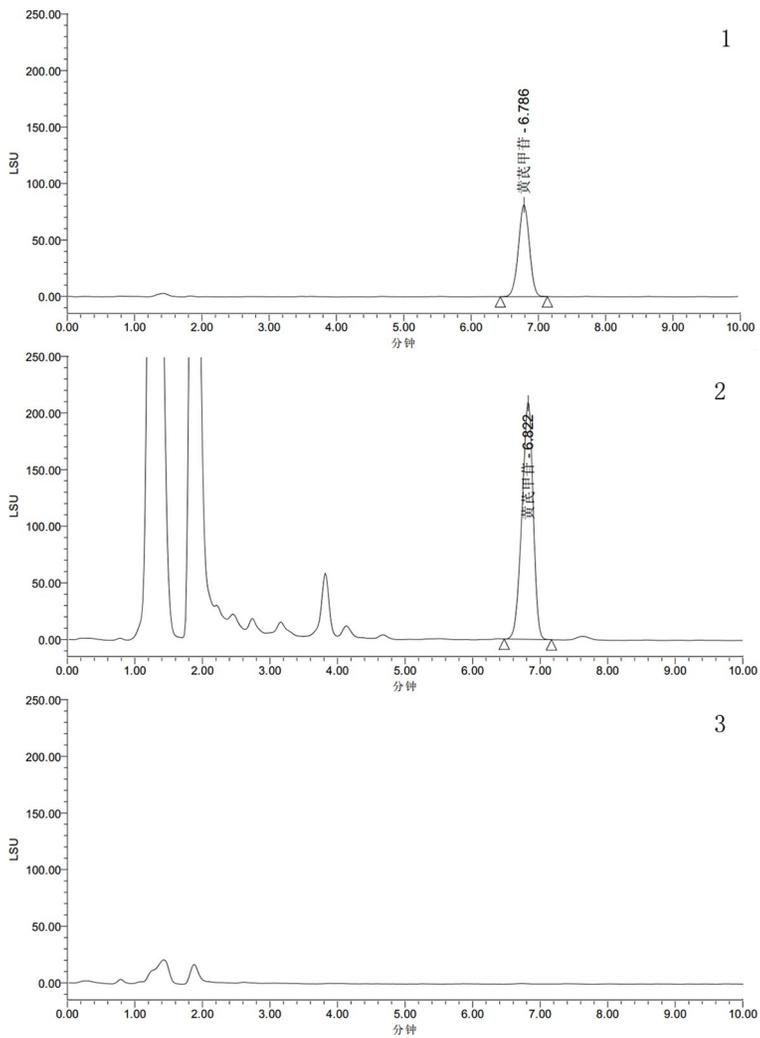
2.4.2 线性 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇溶解制成浓度为 0.5080 mg/mL 的对照品溶液,依次精密吸取 3、5、10、15、20 μL,注入液相色谱仪,以黄芪甲苷峰面积的对数值(y)为纵坐标、黄芪甲苷进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y = 1.4828x + 5.312$ ($r = 0.9991$)。结果表明,在 1.524~10.16 μg 范围内,黄芪甲苷峰面积对数值与进样量对数值线性关系良好,结果见图 2。

2.4.3 精密度试验 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,连续进样 6 次,测得黄芪甲苷峰面积 RSD 为 0.8%,结果表明,本方法精密度良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取同一批号的供试品(批号:20120201)2 g,按上述 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,测得黄芪甲苷的平均含量为 $2.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.6%,表明本方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,测得黄芪甲苷含量的 RSD 为 2.8%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的供试品(批号:20120201)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 0.5380 mg/mL 的黄芪甲苷对照品溶液 5 mL,平行操作 6 份,按 2.2.2 项下方法制备加样回收供试品溶液,测定并计算加样回收率,测得平均回收率为 99.4%, RSD 为 4.6%,表明方法准确度良好,结果见表 1。



1. 黄芪甲苷对照品 2. 供试品 3. 阴性对照

1. Reference Substance of Astragaloside 2. Test sample 3. negative control

图 1 专属性考察色谱图

Fig 1 The chromatogram of Specific inspection

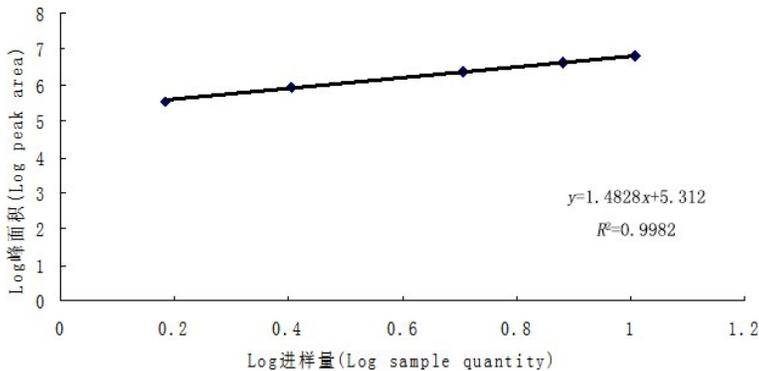


图 2 黄芪甲苷标准曲线

Fig 2 The standard curve of Astragaloside

表 1 回收率试验结果

Tab 1 The results of recovery test

编号 No.	样品称量/g Amount of sample	对照加入量/mg Amount of reference substance	测得总量/mg Amount of measured	回收率/% Recovery	平均值/% mean	RSD/%
1	1.0104	2.69	5.26	95.73	99.4	4.6
2	0.9709	2.69	5.14	95.25		
3	0.9672	2.69	5.13	95.15		
4	1.0496	2.69	5.60	104.45		
5	1.0264	2.69	5.47	101.78		
6	1.0198	2.69	5.51	104.17		

2.4.7 样品测定 取 3 批供试品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液并测定,计算黄芪甲苷的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 The results of sample content determination

批号 Batch No.	样品含量/(mg · g ⁻¹) sample content	相对偏差/% relative deviation
20120201	2.7	1.6
20120202	2.6	1.6
20120203	2.6	0.9

3 讨论

3.1 黄芪甲苷含量测定方法的选择 文献报道的黄芪甲苷含量测定方法有荧光分光光度法^[7]、薄层色谱扫描法^[8]、高效液相色谱法^[9]等,其中高效液相色谱法准确、快速、灵敏度高,且使用蒸发光散射检测器可解决黄芪甲苷紫外吸收弱的缺点,是黄芪甲苷含量测定的常用方法。

3.2 提取溶剂和提取方法的选择 五加芪粉为黄芪和刺五加经水提、纯化、喷雾干燥制成的粉剂,含有较多的多糖类成分,为了充分提取其中的黄芪甲苷,参考同类制剂的供试品溶液制备方法^[10-11],选择甲醇作为提取溶剂,分别对热回流法和超声提取法进行对比,结果表明两种方法提取效果相当,考虑超声提取较为简便,因此选择超声提取法。试验过程中发现,超声提取 1 次不能将黄芪甲苷提取完

全,提取 2 次和提取 3 次结果差别不大,因此选择超声提取 2 次,并且最后用甲醇洗涤残渣,以保证黄芪甲苷充分转移。

3.3 萃取次数的选择 参考黄芪药材中黄芪甲苷的含量测定方法^[9],对正丁醇萃取次数进行了考察,分别进行 3 次、4 次、5 次萃取,结果发现萃取 4 次之后,黄芪甲苷基本完全转移,因此确定采用正丁醇萃取 4 次。试验发现,正丁醇萃取液蒸干后再通过 D101 型大孔吸附树脂柱纯化,黄芪甲苷的回收率相对较低,而且未经大孔吸附树脂柱纯化的样品在含量测定过程中不受其他杂质的影响,因此,确定正丁醇后不再通过大孔吸附树脂柱纯化,直接用甲醇溶解测定。

3.4 色谱条件的考察 参考黄芪药材中黄芪甲苷的含量测定色谱条件^[9],分别对流动相的比例、柱温、流速、柱子型号进行考察,结果表明黄芪甲苷的色谱行为受流动相比例影响较大,其他条件对其影响相对较小,综合系统适用性各指标,确定流动相的比例为乙腈-水(35 : 65),此时黄芪甲苷保留时间约 7 min,更加适合该产品的检测。此外,对蒸发光散射检测器漂移管温度进行了考察,60 ℃、70 ℃、80 ℃条件下黄芪甲苷峰各项指标差别不大,因此设定漂移管温度为 60 ℃。

本研究建立了高效液相色谱-蒸发光散射法测定五加芪粉中黄芪甲苷的含量,在该色谱条件下,黄芪甲苷分离度良好,保留时间适宜,方法学考察

表明该方法专属性、精密度、重复性良好,可准确测定黄芪甲苷的含量,从而有效控制五加芪粉的质量。

参考文献:

- [1] 刘杨,包华音,刘德丽. 黄芪多糖提取工艺正交试验优选与含量测定[J]. 食品与药品, 2014, 16(5): 318-320.
Liu Y, Bao H Y, Liu D L. Optimization of extraction technology by orthogonal test and determination of polysaccharides in astragalus radix[J]. Food and Drug, 2014, 16(5): 318-320.
- [2] 卞云云,管佳,毕志明,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(16): 1217-1221.
Bian Y Y, Guan J, Bi Z M, *et al.* Studies on chemical constituents of astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2006, 41(16): 1217-1221.
- [3] 马晓丰,田晓明,陈英杰,等. 内蒙黄芪中黄酮类成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(9): 1293-1296.
Ma X F, Tian X M, Chen Y J, *et al.* Flavonoid constituents of astragalus membranaceus var. mongholicus [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(9): 1293-1296.
- [4] 刘必旺,吉海杰,许凯霞,等. 黄芪甲苷对免疫低下糖尿病大鼠的影响[J]. 山西中医, 2013, 29(8): 45-49.
Liu B W, Ji H J, Xu K X, *et al.* The effect of astragaloside on hypofunction of immunity of diabetes rat [J]. Shanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 29(8): 45-49.
- [5] 王德云,胡元亮,孔祥峰,等. 中药成分对雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化的影响[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(6): 578-580.
Wang D Y, Hu Y L, Kong X F, *et al.* Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral T lymphocyte transformation in chicken [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2004, 24(6): 578-580.
- [6] 段立军,孙博航. 黄芪甲苷的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(5): 410-416.
Duan L J, Sun B H. Research reviews on astragaloside IV [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2011, 28(5): 410-416.
- [7] 韩素琴,刘养清,任荣芳. 香兰素荧光法测定黄芪口服液中的黄芪甲苷[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2002, 22(1): 75-77.
Han S Q, Liu Y Q, Ren R F. Determination of astragaloside in huangqi oral liquid by spectrophotofluorimetry [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Nature Science Edition), 2002, 22(1): 75-77.
- [8] 倪晟,赵培洁,郑燕,等. 薄层扫描法测定扶正胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(1): 45-47.
Ni S, Zhao P J, Zheng Y, *et al.* Determination of astragaloside in Fuzheng capsules by TLC scanning [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1999, 34(1): 45-47.
- [9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版 [S]. The Chinese Veterinary Drug Standard Committee. Veterinary drug standard of the People's Republic of China, 2010 [S].
- [10] 陈锡琨. HPLC-ELSD 法测定玉屏风胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国医药指南, 2013, 11(23): 8-9.
Chen X K. Determination of astragaloside the content in jade screen capsules by HPLC-ELSD [J]. Guide of China Medicine, 2013, 11(23): 8-9.
- [11] 农业部兽药评审中心. 兽药质量标准汇编(2012 年) [S]. The Ministry of Agriculture Veterinary Drug Evaluation center. Veterinary drug quality standards 2012 [S].

(编辑:陈希)