

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.06.008

高效液相色谱法测定3种剂型黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量*

王 谦, 赖 慧, 陈 立, 李 建, 米晓琴, 赵福兰[△]

(西南医科大学附属中医医院药剂科, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 比较3种剂型黄芪中有效成分的含量。方法 采用高效液相色谱蒸发光散射检测法测定黄芪甲苷含量,采用高效液相色谱紫外光检测法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量。结果 黄芪饮片、黄芪配方颗粒、黄芪最细粉中黄芪甲苷的平均含量分别为 $(0.0746 \pm 0.0035)\%$, $(0.056 \pm 0.0045)\%$, $(0.129 \pm 0.0051)\%$, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均含量分别为 $(0.031 \pm 0.0021)\%$, $(0.022 \pm 0.0024)\%$, $(0.025 \pm 0.0019)\%$ 。结论 3种剂型黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量均达到2015年版《中国药典(一部)》规定标准。黄芪最细粉中黄芪甲苷的含量最高,黄芪饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量最高。本研究建立的方法操作简便,可用于3种黄芪剂型中有效成分的含量测定。

关键词: 黄芪; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 饮片; 配方颗粒; 最细粉; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)06-0023-04

Content Determination of Astragaloside IV and Calycosin Glycoside in Three Dosage Forms of *Astragalus Membranaceus* by HPLC

WANG Qian, LAI Hui, CHEN Li, LI Jian, MI Xiaoqin, ZHAO Fulan

(Department of Pharmacy, Hospital < T. C. M > Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To compare the contents of active ingredients in three dosage forms of *Astragalus membranaceus*. **Methods** The content of astragaloside IV was determined by HPLC-ELSD method, and the content of calycosin glycoside was determined by HPLC-UV method. **Results** The average content of astragaloside IV in decoction pieces of *Astragalus membranaceus*, dispensing granules of *Astragalus membranaceus* and the finest powder of *Astragalus membranaceus* was $(0.0746 \pm 0.0035)\%$, $(0.056 \pm 0.0045)\%$ and $(0.129 \pm 0.0051)\%$. The average content of calycosin glycoside in decoction pieces of *Astragalus membranaceus*, dispensing granules of *Astragalus membranaceus* and the finest powder of *Astragalus membranaceus* was $(0.031 \pm 0.0021)\%$, $(0.022 \pm 0.0024)\%$ and $(0.025 \pm 0.0019)\%$. **Conclusion** The content of astragaloside IV and calycosin glycoside in three dosage forms of *Astragalus membranaceus* meets the standard of *Chinese Pharmacopoeia* (Volume I, 2015 edition). The content of astragaloside IV in the finest powder of *Astragalus membranaceus* is the highest, and the content of calycosin glycoside in the decoction pieces of *Astragalus membranaceus* is the highest. The established method is simple and can be used for the content determination of active ingredients in three dosage forms of *Astragalus preparations*.

Key words: *Astragalus membranaceus*; astragaloside IV; calycosin glycoside; decoction pieces; dispensing granules; the finest powder; HPLC; content determination

中药黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. 或蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsio 的干燥根, 主要含皂苷类、氨基酸、多糖等成分。研究表明, 黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷为黄芪的活性指标成分, 故2015年版《中国药典(一部)》以黄芪药材中黄芪甲苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量作为其质量评价指标^[1]。中药配方颗粒生产中均采用企业自拟标准, 至今尚未形成国家统一的质量标准^[2-3]。中药最细粉是利用超微粉碎技术将药物粉碎至粒径小于 $50 \mu\text{m}$, 使动植物细胞膜破裂, 显著提高了有效成分的溶出度及其生物利用率^[4]。

本研究中采用高效液相色谱法测定黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量, 以评价黄芪饮片、最细粉和配方颗粒的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪、AUW120D 型电子天平(日本岛津公司); Alltech 3300 型蒸发光散射检测器(ELSD, 瑞士步琦公司); BM1926 型索氏提取器(成都寰宇鑫成特种玻璃有限公司)。

1.2 试剂

黄芪甲苷对照品(批号为 111920-201203)、

*基金项目: 泸州医学院自然科学基金[泸医院科[2012]2号]。

第一作者: 王谦, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药制剂学, (电话)0830-3161542(电子信箱)437435273@qq.com。

[△]通信作者: 赵福兰, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药事管理学, (电子信箱)lyfzzr@126.com。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号为119348-201432),均购自成都市食品药品检验所;黄芪饮片(四川禾一天然药业有限公司,批号为140901),黄芪配方颗粒(委托四川新绿色药业科技发展股份有限公司加工,每袋1.4 g,相当于黄芪药材10 g),黄芪最细粉(委托泸州百草堂中药饮片有限公司加工),3种剂型均为同一批次黄芪药材制得;乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余制剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

黄芪甲苷:色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(32:68, V/V);柱温为40℃;流速为1.0 mL/min;ELSD检测器流动气体压力为350 kPa;漂移管温度为45℃^[1,5]。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷:色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.2%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min时A为20%→40%,20~30 min时A为40%);检测波长为260 nm;柱温为40℃;流速为1.0 mL/min^[1,6]。

2.2 溶液制备

2.2.1 黄芪甲苷

对照品溶液:称取黄芪甲苷对照品7.64 mg,精密称定,用甲醇定容至10 mL,制备成质量浓度为0.764 g/L的溶液,即得。

黄芪配方颗粒供试品溶液:取黄芪配方颗粒0.56 g,精密称定,置索氏提取器中,加入甲醇40 mL,冷却过夜,加入适量甲醇,加热回流4 h,浓缩至干,残渣加10 mL水,微热使溶解,以水饱和的正丁醇40 mL提取4次,合并正丁醇液;氨试液40 mL洗涤2次,弃氨液,蒸干,残渣加水5 mL使溶解,通过D101型大孔吸附树脂柱(1.5 cm × 12 cm),加水50 mL洗脱,去水,40%乙醇30 mL洗脱,去洗脱液,加80 mL 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,甲醇溶解,置5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

黄芪最细粉供试品溶液:取黄芪最细粉4 g,精密称定,加水10 mL,微热使溶解,其余同配方颗粒供试品溶液项下方法制备。

黄芪饮片供试品溶液:同黄芪最细粉供试品溶液项下方法制备。

2.2.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

对照品溶液:称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品4.35 mg,精密称定,用甲醇定容至10 mL,制备成质量浓度为0.435 g/L的对照品溶液。

黄芪配方颗粒供试品溶液:取黄芪配方颗粒0.14 g,置圆底烧瓶中,加甲醇50 mL,称定质量,加热回流4 h,冷却,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,

取续滤液25 mL,回收溶剂,浓缩至干,甲醇溶解残渣,置5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

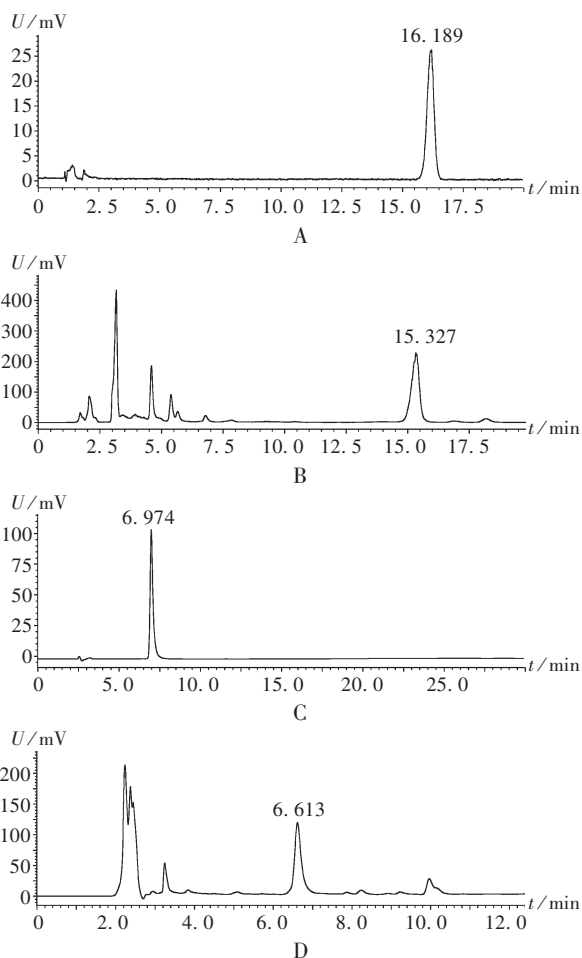
黄芪最细粉供试品溶液:取黄芪最细粉1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,其余同黄芪配方颗粒供试品溶液项下方法制备。

黄芪饮片供试品溶液:同黄芪最细粉供试品溶液项下方法制备。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,结果黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的理论板数均大于3 000,分离良好。在此条件下的色谱图见图1。

线性关系考察:分别吸取2种对照品溶液各2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μL,按2.1项下色谱条件进样分析。以峰面积(A)对数值为纵坐标(Y)、对照品进样量(μg)对数值为横坐标(X)进行线性回归,得黄芪甲苷与毛蕊异黄酮葡萄糖苷回归方程分别为 $Y_{\text{黄}} = 1.522 X_{\text{黄}} + 11.310$ ($r = 0.998 0$, $n = 5$), $Y_{\text{毛}} = 3.57 \times 10^6 X_{\text{毛}} + 11 728$



A. 黄芪甲苷对照品溶液 B. 黄芪 + 黄芪甲苷溶液
C. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液
D. 黄芪 + 毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶液

图1 高效液相色谱图

($r=0.9990$, $n=5$)。结果表明,黄芪甲苷与毛蕊异黄酮葡萄糖苷进样量分别在 $1.91 \sim 15.28 \mu\text{g}$ 和 $1.09 \sim 8.70 \mu\text{g}$ 范围内时,其对数值与峰面积对数值线性关系良好。

精密度试验:精密吸取黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$,在 2.1 项下色谱条件进样测定,分别重复进样 6 次,测定各自峰面积。结果的 RSD 分别为 1.56% 和 1.34% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:室温下精密量取 3 种供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$,室温下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样,测定黄芪甲苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积。结果的 RSD 均小于 3% ($n=6$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:称取 3 种样品,精密称定,同法制备供试品溶液,精密吸取 $10 \mu\text{L}$,共 6 份,分别测定黄芪甲苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷的峰面积。结果的 RSD 均小于 2% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知黄芪甲苷含量为 0.086% 的同一配方颗粒 6 份,每份 1 g ,加入黄芪甲苷对照品 0.5 mg ,依法制备供试品溶液,进样检测。取已知毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为 0.073% 的同一配方颗粒 6 份,每份 1 g ,加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 0.5 mg ,依法制备供试品溶液,同法测定。结果见表 1 和表 2。

表 1 黄芪甲苷加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.86	0.52	1.36	96.15	94.60	1.42
0.86	0.54	1.37	94.44		
0.86	0.54	1.36	92.59		
0.86	0.52	1.35	94.23		
0.86	0.51	1.35	96.08		
0.86	0.51	1.34	94.12		

表 2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.73	0.51	1.22	96.08	95.52	1.09
0.73	0.54	1.25	96.30		
0.73	0.51	1.21	94.12		
0.73	0.53	1.24	96.23		
0.73	0.52	1.22	94.23		
0.73	0.52	1.23	96.15		

2.4 样品含量测定

取黄芪不同剂型样品各 6 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果黄芪饮片、黄芪配方颗粒、黄芪最细粉中黄芪甲苷的平均含量分别为 $(0.0746 \pm 0.0035)\%$, $(0.056 \pm 0.0045)\%$, $(0.129 \pm 0.0051)\%$,毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均含量分别为 $(0.031 \pm 0.0021)\%$, $(0.022 \pm 0.0024)\%$, $(0.025 \pm 0.0019)\%$ 。

3 讨论

中药超微粉碎与传统中药打粉均为粉碎加工,但也不完全相同。中药材传统打粉的粒度一般为 $100 \mu\text{m}$,而中药微粉粒度可到几微米甚至更小^[6-7]。在此粒度下,植物细胞壁破碎产生的效应,以及颗粒的比表面积、表面活性、分散性等都起了综合变化^[8]。本研究结果显示,黄芪最细粉中黄芪甲苷的含量远高于黄芪饮片中的含量,可能是因为黄芪打成最细粉后,其细胞壁被破坏,有效成分更易溶出。

中药配方颗粒仍有值得深究的地方。从临床用药情况看,中药配方颗粒的药效与中药饮片的药效并无显著差异,但配方颗粒是单味中药的提取^[9-10],省去了药物间共同加热、缺少了药物间相互作用的过程,然而每味中药所含成分有几十种甚至几千种,这些成分可能是药方中的有效成分,但换到其他药方中,就无法起到应有的作用^[11-13]。

本研究旨在比较不同剂型黄芪的质量差异,结果显示,3 种剂型黄芪中黄芪甲苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量均符合 2015 年版《中国药典(一部)》规定,即黄芪饮片中含黄芪甲苷不得少于 0.040% ,毛蕊异黄酮葡萄糖苷不得少于 0.020% 。其中最细粉中黄芪甲苷含量最高,而 3 种剂型黄芪的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量差异不大,可能是因为毛蕊异黄酮葡萄糖苷暴露在空气中易氧化,所以饮片中含最高,配方颗粒和最细粉与空气接触面积增大,氧化率高,故较饮片含量略低,但无明显差异,且含量均超药典标准,不影响临床使用。另外,《中国药典》并未收载黄芪打粉使用的炮制方法,通过本试验可知,中药黄芪适合打粉使用^[14],同时本研究也为《四川省中药饮片炮制规范》(2015 版)^[15]新增黄芪炮制方法即粉碎成细粉使用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 贺爱玲. 中药配方颗粒临床应用现状分析及展望[J]. 中国药事, 2017, 31(10): 1205-1209.
- [3] 潘 昆, 金 浪. 我国中药配方颗粒存在的质量问题及其监管体系探究[J]. 卫生软科学, 2017, 31(9): 46-48.
- [4] 刘 芳, 傅超美, 李小红, 等. 中药饮片的研究与应用进展分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 222-225.
- [5] 张火旺, 蔡勇科, 吴志国, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定养阴生津片中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2016, 25(20): 53-55.
- [6] 宋成英, 封加福. HPLC 同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 115-117.
- [7] 刘志勤. 三种中药饮片的比较[J]. 中外医学研究, 2011,