

HPLC 分析不同基源 产地黄芪中黄芪甲苷的含量

张娜 张拓 白易 任炳浩 陈燕福 祁春雷* 柳志刚*

陕西天芪生物科技有限责任公司

DOI:10.12238/fcmr.v6i4.11019

[摘要] 目的: 分析黄芪的基源不同、产地不同,其甲苷含量的差异。方法: 用HPLC法分析,色谱柱为ThermoscientificC18(5 μ m,4.6mm \times 250mm),流动相为乙腈-水(32: 68)、乙腈(A)、0.2%甲酸溶液(B),检测波长260nm、柱温30 $^{\circ}$ C、流速1.0ml/min、进样量10 μ l。线性范围较好(R²0.998),精密度、稳定性、重复性RSD低于2.0%,加样回收率91.33%。试验结果: 内蒙古喀喇沁旗产地膜荚黄芪、陕西省靖边县蒙古黄芪、甘肃陇西多序岩黄芪分别为2.2565 \pm 0.3091mg/g、1.4914 \pm 0.0253mg/g、1.0856 \pm 0.2711mg/g。结论: 黄芪甲苷平均含量: 内蒙古喀喇沁旗产地膜荚黄芪>陕西省靖边县蒙古黄芪>甘肃陇西多序岩黄芪。

[关键词] 黄芪; 含量测定; 不同基源; 不同产地; HPLC; 黄芪甲苷

中图分类号: R927.2 文献标识码: A

HPLC analysis of the astragaloside content in different base sources

Na Zhang Tuo Zhang Yi Bai Binghao Ren Yanfu Chen Chunlei Qi* Zhigang Liu*

Shaanxi Tianqi Biological Technology Co., LTD.

[Abstract] Objective: Analysis of the differences in the content of astragaloside A among different sources and origins of *Astragalus membranaceus*. Method: HPLC was used for analysis, with Thermoscientific C18 (5 μ m, 4.6mm \times 250mm) as the chromatographic column and acetonitrile water (32) as the mobile phase. 68) Acetonitrile (A), 0.2% A acid solution (B), detection wavelength 260nm, column temperature 30 $^{\circ}$ C, flow rate 1.0ml/min, injection volume 10 μ l. The linear range is good (R²0.998), with precision, stability, and repeatability RSD below 2.0%, and a sample recovery rate of 91.33%. Experimental results: 2.2565 \pm 0.02 3091mg/g, 1.4914 \pm 0.0253mg/g, 1.0856 \pm 0.2711mg/g. Conclusion: The average content of Astragaloside IV in Huangqi is as follows: Huangqi from Kalaqin Banner, Inner Mongolia>Huangqi from Jingbian County, Shaanxi Province>Huangqi from Duoxuyan in Longxi, Gansu Province.

[Key words] *Astragalus membranaceus*; Content determination; Different sources; Different origins; HPLC; astragaloside iv

黄芪,别名戴芪,《神农本草经》上品^[1]。黄芪,为豆科、蒙古黄芪*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge多年生植物,味甘,性微温,归肺,脾经。var. 黄芪(BGE.) 黄芪或薄膜荚甲。*Membranaceus* (Fisch.) BGE. 干燥之根,有补气固表、升阳止汗、养血消肿、利水生津、行滞排脓、托毒通痹、生肌敛疮之功效,被李时珍誉为“补药之长”,临床上多用于体虚表弱、阳气虚弱所致的表虚自汗、气虚乏力、痈疽难溃、久溃不敛、中气下陷等症^[2]。现代药理研究表明,黄芪含有皂苷、黄酮类、多糖类和氨基酸类成分,皂苷和多糖类是其活性成分,具有消炎、增强机体免疫力、抗病毒、抗衰老等药理作用^[3]。红芪是多序岩黄芪的干燥之根,南北朝时作为黄芪的品种之一^[4],近代我国港澳台地区和东南亚地区都采用红芪作为黄芪的优良品种^[5]。《中

国药典2020版》含量测定指标成分为黄芪甲苷^[2]。

陕西为黄芪主产区之一,主要为子洲及其周边地域,其药材市场认可度高,畅销国内,远销日本、韩国等东南亚国家。采用HPLC法测定不同产地(甘、陕、晋、蒙、吉)和不同基源黄芪的有效成分含量,为优质黄芪产业发展和资源开发利用提供依据,以客观评价黄芪品质,充分认识黄芪品质形成机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

戴安UltiMate3000高效液相色谱仪、ALLCHROMELSD6000检测器、紫外检测仪、Chromeleon色谱工作站(USA); FA6103C(瑞士Metler-Torco公司)类型电子分析天平; KQ5200DE超声清洗机(昆山超声仪表有限公司超声清洗机); CS-700多功能粉碎机(五

义海纳电器); 电热式鼓风烘干箱(电热式鼓风烘干箱, 上海一恒科仪生产); KQ5200DE超声清洗仪(昆山超声仪器有限公司); (常州国华电器)HH-4型恒温浴盆; SHB-III循环水真空泵(郑州长城科工贸有限公司); RE-5203旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试剂

质量 $\geq 98\%$ 的黄芪甲苷类对照品(成都普菲德生物科技股份有限公司18111603号批号); 色谱乙腈(美国FISHER公司); 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团股份有限公司)(以下简称娃哈哈纯净水); 氨水, 甲醇, 都属于纯分析性质。

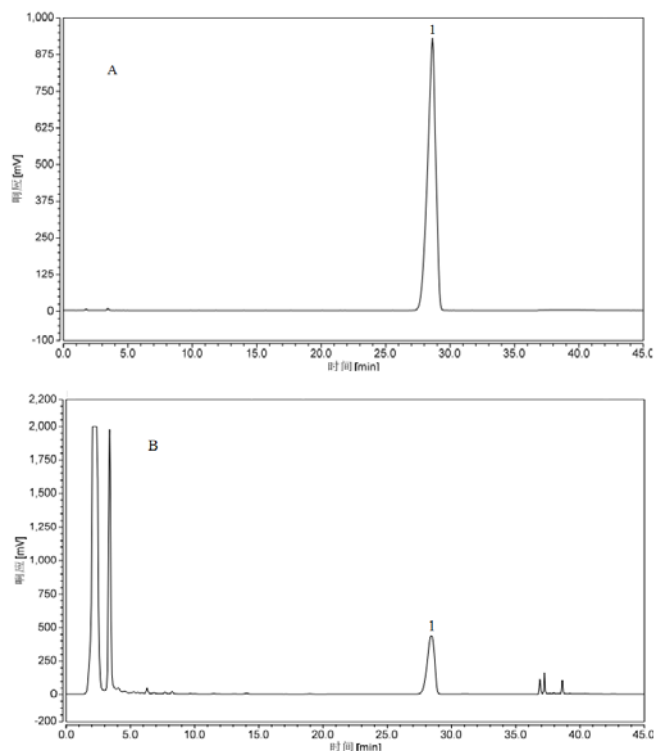
1.3 材料

子洲县黄芪种质资源采自2020年5月, 共采自甘肃、山西、内蒙古、吉林、陕西5省, 生长周期为1年半, 每份分3个批次, 共36份样品; 经鉴定, 为蒙古黄芪*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao或膜荚黄芪*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 及同科同属植物多序岩黄芪*H. polybotrys* Hand. -Mazz.。每批次除去地上部分, 阴干, 除去芦头, 去根, 切薄片, 粉碎, 粉过四号筛备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

测定条件: 色谱柱为赛默飞C18(5 μ m, 4.6mm \times 250mm) 色谱柱; 流相: 乙腈-水(32: 68), 流速1.0ml/min, 检测波长225nm, 柱温30 $^{\circ}$ C, 进样量10 μ L。在上述色谱条件下分析, 按黄芪甲苷峰计算理论板数不低于4000张, 如图1所示为黄芪甲苷对照品及样品色谱图。



注: 1. 黄芪甲苷

图1 黄芪核糖核酸对照品HPLC色谱图(A)及样品(B)

2.2 对照品溶液制备

配制对照品溶液: 精密称量取黄芪甲苷类对照品适量, 置于容量10ml的瓶内, 用80%甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 在4 $^{\circ}$ C的温度下, 制成质量浓度为0.516mg/ml, 保存备用的对照品备用液。

2.3 供试品溶液制备

供应试品溶液制备: 参考文献^[2]取黄芪样品干燥, 粉碎成细末(经四号筛), 混匀, 精密称量1.0000g, 置圆底烧瓶250ml, 精密加80%甲醇溶液50ml, 含4%浓氨试液, 称定重。加热回流1.5h(温度70 $^{\circ}$ C), 放至室温, 再称定重量, 将减重与含4%浓氨试液的80%甲醇溶液补齐, 摇匀, 过滤, 取精密量25ml的取续焦液, 蒸熟, 将残渣溶于80%甲醇, 调至5ml容量瓶中, 加80%甲醇至刻度, 摇匀。0.22微孔滤膜合格, 待检。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

分别从黄芪甲苷2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 μ L溶液中精确吸收, 并记入色谱图。以黄芪甲苷对照品溶液进样量为横坐标(x), 峰面积积分为纵坐标(y), 其线性回归方程为 $Y=11.015X-22.399$, $R=0.999$, 绘制标准曲线。黄芪甲苷采样量在1.08~18.66 μ g, 具有较好的线性关系。

2.4.2 精密度试验

取黄芪核糖苷对照品溶液, 连续6次采样, 每次采样10 μ L, 记录黄芪核糖苷峰面积积分值, 计算RSD为0.98%, 小于2.00%, 说明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验

取同一黄芪供试品溶液, 分别于配制后0 μ L、2、4、8、12、16、24h, 记录色谱峰面积, 计算其RSD为1.73%, 小于2.00%, 表明在24h内供试品溶液基本稳定。

2.4.4 重复性试验

取同一黄芪样品干燥粉末约1克, 精密称定, 共6份, 按“2.3”项下测定黄芪甲苷含量的供试品溶液制备方法平行制备供试品溶液, 按“2.1”项下测定黄芪甲苷含量的色谱条件分别, 测定峰面积, 计算黄芪质量平均分数的RSD为1.52%。说明这样的方式重复性很好。

2.4.5 加样回收率试验

表1 加样回收率(N=6)测定黄芪核糖苷

样品测出量/mg	样品中含/mg	加入量/mg	回收量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
7.226	1.688	5.962	5.5375	92.88	91.33	1.46
7.048	1.671	5.962	5.3771	90.19		
7.138	1.671	5.962	5.4667	91.69		
7.193	1.672	5.962	5.5218	92.62		
7.015	1.678	5.962	5.3363	89.51		
7.123	1.691	5.962	5.4318	91.11		

取同一批次已知黄芪甲苷含量(1.68mgg⁻¹)的样品干燥粉末约1g,共6份,精密加入黄芪甲苷对照品(0.516mgml⁻¹)各3ml,按“2.3”项下黄芪甲苷含量测定的供试品溶液制备方法平行制备供试品溶液,分别采样测峰面积。黄芪甲苷的平均回收率计算为91.33%(见表1),RSD为1.46%,说明方法准确度较好。

2.5样品定量测定

取黄芪干燥粉末样36个批次,每批次各平行取3份,分别按“2.3”项下黄芪甙含量测定和毛蕊异黄酮糖苷含量测定的供试品溶液制备方法制备供试品溶液,分别按“2.1”项下黄芪甙含量测定和毛蕊异黄酮糖苷含量测定的色谱条件测定。分别对黄芪核糖苷和毛蕊异黄酮糖苷峰面积进行测定,并对样品中黄芪核糖苷和毛蕊异黄酮糖苷质量分数进行测算。

含量测定结果表明,黄芪中的主要活性成分—黄芪甲苷,在所有待测样品中均可检出,基源不同的样品中含量存在差别。其中,基源是膜荚黄芪、蒙古黄芪、多序岩黄芪,含量大小分别是:2.2565 ± 0.3091mg/g、1.4914 ± 0.0253mg/g、1.0856 ± 0.2711mg/g。利用微软的OfficeExcel2007和SPSS23进行分析,所有均值均为三个样品重复的平均值±标准差。

3 讨论

中药材的质量好坏是多种评价体系共同作用的结果,单指标的评价只能为某一方面的中药材生产提供参考。通过对历代本草中黄芪性状描述的总结,但都有共同的特征“金井玉栏”^[6]。中药材产地与质量特性研究能够在源头上找出优质的中药材,提升药材质量可靠性、推进中医药标准化建设进程。

从黄芪中提取基源不同、产地不同的黄芪药材36批次,从黄芪中提取甲苷含量进行研究发现,在10个黄芪含量较高的产地中,黄芪平均含量达到1.28mg/g,如陕西靖边县西庄村、子洲县三川口镇、双湖峪镇、子洲县驼耳巷、双湖峪镇等。本研究进

一步表明,内蒙古喀喇沁旗和陕西省靖边县黄芪甲苷含量较高,推测与其生态气候环境密切相关。内蒙古喀喇沁旗、陕西靖边县均属大陆性季风气候,海拔500—1891米,年平均气温3.5—10℃,光照充足,温差大,气候干燥,为黄芪生长、仿野生种植和生产提供适宜的环境,从源头上保证黄芪药材的品质。

[基金项目]

企业创新争先青年人才托举计划项目(smxx20210408)。

[参考文献]

[1]顾观光重辑.神农本草经[M].北京:人民卫生出版社,1955:101.

[2]国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2020:315—316.

[3]HeXJ,NiuXY,LiJ,etal.Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides[J].JExpIntegrMed,2012,2(1):15—27.

[4]李俊岳,强正泽,李成义.红芪的本草考证[J].中国药房,2015,26(34):4860—4861.

[5]李广民,王维宁,胡妙申.中药红芪生药学研究[J].中药通报,1987,12(8):453—458.

[6]彭华胜,张贺廷,彭代银,等.黄芪道地药材辨状论质观的演变及其特点[J].中国中药杂志,2017,42(9):1646—1651.

作者简介:

张娜(1991—),女,汉族,陕西咸阳人,硕士,初级中药师,研究方向:中药鉴定、中药材产地加工。

*通讯作者:

祁春雷,高级工程师。

柳志刚,高级工程师。