

# UPLC法同时测定甘肃产蒙古黄芪皂苷类成分的含量

高攀峰\*, 胡明勋, 曹爱华(平顶山市平煤神马医疗集团总医院, 河南 平顶山 467000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)12-1708-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.12.44

**摘要** 目的:建立同时测定甘肃产蒙古黄芪药材中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Acquity, 流动相为乙腈-0.3% 甲酸溶液(梯度洗脱);蒸发光散射检测器(ELSD)参数为漂移管温度 70 °C, 喷雾器温度 42 °C, 氮气体积流量 2.07 L/min。结果:精密度、稳定性、重复性试验的 RSD ≤ 1.22%; 黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的加样回收率分别为 100.32%、99.51%、100.57%、100.21%, RSD 分别为 0.44%、0.39%、1.19%、0.65%。结论:该方法简便、快速,结果准确、可靠,重复性良好,可为甘肃黄芪的质量控制提供依据。

**关键词** 蒸发光散射检测器;黄芪;黄芪皂苷 I;黄芪皂苷 II;黄芪皂苷 III;黄芪甲苷

## Quality Analysis of Saponins of *Astragalus mongolicus* in Gansu

GAO Pan-feng, HU Ming-xun, CAO Ai-hua (General Hospital of Pingmei Shenma Medical Group in Pingdingshan City, Henan Pingdingshan 467000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of astragaloside I, astragaloside II, astragaloside III and astragaloside A from in the medicinal materials of *Astragalus mongolicus* in Gansu. METHODS: UPLC method was adopted. The column was Waters Acquity with the mobile phase of acetonitrile-0.3% formic acid solution (gradient elution). The evaporative light scattering detector (ELSD) parameters were as follows as drift tube temperature of 70 °C, sprayer temperature of 42 °C and nitrogen volume flow of 2.07 L/min. RESULTS: RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all ≤ 1.22%. The average recoveries of astragaloside I, astragaloside II, astragaloside III and astragaloside A were 100.32%, 99.51%, 100.57% and 100.21% with the RSD of 0.44%, 0.39%, 1.19% and 0.65%, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate, reliable and reproducible, and it can provide reference for the quality control of *Leguminosae* in Gansu.

**KEYWORDS** Evaporative light scattering detector; *Leguminosae*; Astragaloside I; Astragaloside II; Astragaloside III; Astragaloside A

品溶液,再按“2.1”项下色谱进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(n=2)

| 批号     | 平均含量,mg/粒 | 平均相对偏差,% |
|--------|-----------|----------|
| 310161 | 2.05      | 2.44     |
| 310182 | 2.87      | 1.39     |
| 310193 | 2.43      | 0.41     |
| 310236 | 1.44      | 0.69     |
| 310243 | 1.01      | 1.98     |
| 310251 | 0.96      | 0.00     |
| 310266 | 1.26      | 0.79     |
| 310267 | 0.97      | 1.03     |
| 310276 | 2.12      | 1.89     |
| 310282 | 1.58      | 1.90     |

## 3 讨论

### 3.1 提取条件的考察

笔者参考有关文献<sup>[1-4]</sup>,考虑三七以粉末入药,加溶剂后浸泡过夜再提取更加合理,故在提取供试品溶液时,对样品进行了浸泡过夜处理。笔者又分别考察了水饱和正丁醇、甲醇、70%乙醇 3 种提取溶剂,结果发现以 70%乙醇提取时含量较

高;尤以 70%乙醇提取后,蒸去水液中的乙醇后,再用水饱和正丁醇提取效果更好,故采用 70%乙醇作为提取溶剂。

### 3.2 色谱柱的选择

笔者参考相关文献<sup>[1-4]</sup>,分别考察了 CAPCELLPAK C<sub>18</sub>、Sunfire C<sub>18</sub>、AlltimaTM C<sub>18</sub> 3 个不同品牌的色谱柱,并考察了仪器的稳定性,结果发现 CAPCELLPAK C<sub>18</sub> 所测成分峰形良好,且与其他成分峰可达到较好的基线分离。

综上所述,本方法操作简便、准确性高、重复性好,可用于三七伤药胶囊中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>b</sub><sub>1</sub> 的含量测定。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010 版. 北京:中国医药科技出版社,2010:451-452.
- [2] 张永,俞发. HPLC法测定活血止痛片中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub> 含量[J]. 中药材,2008,31(5):771.
- [3] 黎耀东,卢军. HPLC法测定千斤肾安宁片中的人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub> 及三七皂苷 R<sub>1</sub> 含量[J]. 中成药,2008,30(11):1631.
- [4] 李兵,张文成,任少伟,等. HPLC法同步测定三七粉中人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、R<sub>b</sub><sub>1</sub> 及三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量[J]. 安徽化工,2014,40(3):83.

(收稿日期:2014-09-15 修回日期:2015-01-27)

(编辑:陈宏)

\* 主管中药师。研究方向:中药质量控制和临床应用。电话:0375-2799289。E-mail:1357204495@qq.com

黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根<sup>[1]</sup>。国内市场对黄芪的需求极大,50%用于生产黄芪饮片,50%用于中成药和提取物及制剂<sup>[2]</sup>。目前商品黄芪野生资源已近枯竭,药用黄芪多以人工栽培为主。黄芪是甘肃省5种大宗药材之一<sup>[3]</sup>,现已在全省范围广泛栽培,但由于气候和种植技术的原因,各地产黄芪质量差异大。本研究建立了超高效液相色谱(UPLC)法同时测定黄芪中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷含量的方法,并用建立的方法对甘肃省5个主要产地的黄芪样品进行了含量测定,以为甘肃黄芪的质量评价和多指标质量控制提供科学、可靠的参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Acquity UPLC System,配有二元泵处理器、蒸发光散射检测器(ELSD)(美国 Waters 公司);TP150 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);BS223S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);N-1001 旋转蒸发器(日本 Eylea 公司);OSB-2000 水浴锅(日本 Eylea 公司)。

### 1.2 试剂

黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷对照品购于天津马克生物科技有限公司(批号相同,批号:2012-A0413,纯度均>98%);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

共采集甘肃省岷县、宕昌县、陇西县、渭源县、漳县5个主要产地的黄芪样品17份,每份样品采集10~15株。全部样品经平煤神马医疗集团总医院中药房高攀峰主管中药师鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao,具体信息见表1。

表1 17批黄芪药材的样品信息

Tab 1 Information of 17 batches of Leguminosae herbs samples

| 编号  | 产地       | 样品信息 | 采集时间    |
|-----|----------|------|---------|
| G1  | 甘肃岷县中寨   | 鲜货   | 2013.08 |
| G2  | 甘肃岷县梅川   | 鲜货   | 2013.08 |
| G3  | 甘肃岷县梅川   | 饮片   | 2013.08 |
| G4  | 甘肃岷县梅川文斗 | 陈货   | 2013.08 |
| G5  | 甘肃宕昌县哈达铺 | 饮片   | 2013.11 |
| G6  | 甘肃陇西县蔡子镇 | 鲜货   | 2013.12 |
| G7  | 甘肃陇西县蔡子镇 | 饮片   | 2013.12 |
| G8  | 甘肃陇西县首阳  | 鲜货   | 2013.06 |
| G9  | 甘肃陇西县首阳  | 饮片   | 2013.06 |
| G10 | 甘肃陇西县首阳  | 饮片   | 2013.11 |
| G11 | 甘肃陇西县首阳  | 饮片   | 2013.11 |
| G12 | 甘肃陇西县碧岩  | 鲜货   | 2013.12 |
| G13 | 甘肃渭源县会川  | 陈货   | 2013.05 |
| G14 | 甘肃渭源县莲峰乡 | 鲜货   | 2013.05 |
| G15 | 甘肃渭源县莲峰乡 | 陈货   | 2013.05 |
| G16 | 甘肃漳县大草滩  | 鲜货   | 2013.05 |
| G17 | 甘肃漳县大草滩  | 陈货   | 2013.11 |

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC(150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.3% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0 min, 20% A; 4 min, 33% A; 7 min, 33% A; 8 min, 41% A; 11 min, 44% A; 12 min, 45% A; 14 min, 45% A; 16 min, 65% A; 18 min, 65% A);流速:0.2 ml/min;柱温:30 °C;ELSD 参数:漂移管温度为 70 °C,喷雾器温度为 42 °C,氮气体积流量为 2.07 L/min。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷对照品适量,用甲醇溶解,摇匀,制成 0.096 0、0.020 2、0.007 6、0.008 8 mg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称定黄芪粉末 2.0 g,置于烧瓶中,加入 60 ml 甲醇,盖上塞子,冷浸过夜,水浴回流提取 3 h,提取液回收并浓缩至干,残渣加水 5 ml,微热溶解,过固相萃取柱(1 000 mg/6 ml, 20 ml 甲醇和 5 ml 水预处理)<sup>[4]</sup>,先用 5 ml 水洗涤,然后用 20% 甲醇溶液 5 ml 洗涤,弃去洗涤液。用 100% 甲醇 20 ml 洗脱,收集洗脱液,浓缩至干,残渣加甲醇使其溶解并定容至 5 ml 容量瓶中,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。在“2.1”项条件下,对照品及供试品色谱见图 1。

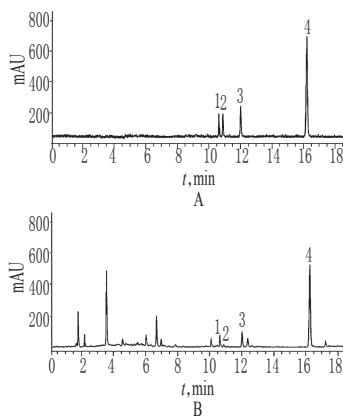


图1 超高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.黄芪甲苷;2.黄芪皂苷 III;3.黄芪皂苷 II;4.黄芪皂苷 I

Fig 1 UPLC Chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. astragaloside A; 2. astragaloside III; 3. astragaloside II; 4. astragaloside I

### 2.3 线性关系考察

分别精密称取黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷对照品适量,用甲醇溶解,摇匀,分别制成质量浓度为 0.096 0、0.020 2、0.007 6、0.008 8 mg/ml 的对照品溶液 E。精密量取对照品溶液 E 1 ml,定容至 5 ml 的量瓶中,制成贮备液 F。精密吸取上述对照品溶液 E 2、3、5 μl,贮备液 F 2、3、5、6 μl,分别注入液相色谱仪测定。以进样量(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程及其线性范围详见表 2。

### 2.4 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液连续进样 6 次,按 4 种皂苷成分的峰面积积分值分别计算其 RSD 值。结果,黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的 RSD 分别为 0.20%、1.14%、0.77%、0.60%,表明仪器精密度良好。

### 2.5 稳定性试验

表2 回归方程及其线性范围

Tab 2 Regression equations and linear range

| 待测成分     | 回归方程                                      | 线性范围, $\mu\text{g}$ | $r$     |
|----------|---|---------------------|---------|
| 黄芪皂苷 I   | $y=3.10 \times 10^4 x - 1.01 \times 10^6$ | 0.038 4~0.576 2     | 0.999 9 |
| 黄芪皂苷 II  | $y=3.27 \times 10^4 x - 2.95 \times 10^5$ | 0.009 7~0.145 0     | 0.999 8 |
| 黄芪皂苷 III | $y=2.29 \times 10^4 x - 2.83 \times 10^5$ | 0.003 1~0.045 1     | 0.999 9 |
| 黄芪甲苷     | $y=1.99 \times 10^4 x - 2.97 \times 10^5$ | 0.003 6~0.053 4     | 0.999 8 |

取同一供试品溶液,分别于0、2、4、8、10、12 h精密吸取2  $\mu\text{l}$ 进样检测,按4种黄芪皂苷成分的峰面积分别计算RSD值。结果,黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的RSD分别为0.56%、0.25%、1.22%、1.15%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

### 2.6 重复性试验

精密称取供试品粉末2.0 g,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果,黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的RSD分别为0.12%、0.32%、1.17%、0.56%,表明方法重复性良好。

### 2.7 加样回收率试验

称取已知含量的黄芪供试品1.0 g,共6份,于每份供试品中分别精密加入适量的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果( $n=6$ )Tab 3 Results of sample recovery test( $n=6$ )

| 待测成分     | 样品含量,mg | 加入量,mg  | 测得量,mg  | 平均加样回收率,% | RSD,% |
|----------|---------|---------|---------|-----------|-------|
| 黄芪皂苷 I   | 0.278 0 | 0.277 1 | 0.556 0 | 100.32    | 0.44  |
| 黄芪皂苷 II  | 0.060 8 | 0.061 1 | 0.121 6 | 99.51     | 0.32  |
| 黄芪皂苷 III | 0.017 7 | 0.017 6 | 0.035 4 | 100.57    | 1.19  |
| 黄芪甲苷     | 0.048 3 | 0.048 2 | 0.096 6 | 100.21    | 0.65  |

### 2.8 各个产地的样品中4种黄芪皂苷成分的含量测定

分别制备各产地样品的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样5  $\mu\text{l}$ 测定,计算黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷的含量,每批供试品平行2份,结果见表4。不同产地样品黄芪皂苷成分的平均值见表5。

表4 样品含量测定结果(mg/g)

Tab 4 Results of samples content determination(mg/g)

| 编号  | 黄芪皂苷 I  | 黄芪皂苷 II | 黄芪皂苷 III | 黄芪甲苷    | 皂苷总和    |
|-----|---------|---------|----------|---------|---------|
| G1  | 0.360 4 | 0.131 4 | 0.040 3  | 0.045 0 | 0.577 1 |
| G2  | 0.507 7 | 0.236 1 | 0.036 3  | 0.038 3 | 0.818 4 |
| G3  | 0.395 7 | 0.097 1 | 0.020 4  | 0.026 1 | 0.539 3 |
| G4  | 0.444 9 | 0.094 5 | 0.026 9  | 0.037 8 | 0.604 1 |
| G5  | 0.368 3 | 0.100 8 | 0.022 1  | 0.032 8 | 0.524 0 |
| G6  | 0.360 9 | 0.086 7 | 0.018 5  | 0.035 8 | 0.501 9 |
| G7  | 0.532 2 | 0.169 8 | 0.030 8  | 0.082 3 | 0.815 1 |
| G8  | 0.291 1 | 0.072 4 | 0.025 5  | 0.031 7 | 0.420 7 |
| G9  | 0.353 9 | 0.118 7 | 0.022 8  | 0.036 9 | 0.532 3 |
| G10 | 0.183 4 | 0.057 7 | 0.011 0  | 0.017 0 | 0.269 1 |
| G11 | 0.323 6 | 0.055 6 | 0.008 5  | 0.035 9 | 0.423 6 |
| G12 | 0.411 9 | 0.106 3 | 0.023 2  | 0.016 3 | 0.557 7 |
| G13 | 0.415 7 | 0.095 6 | 0.024 6  | 0.030 5 | 0.566 4 |
| G14 | 0.457 3 | 0.120 8 | 0.029 8  | 0.035 1 | 0.643 0 |
| G15 | 0.226 7 | 0.099 3 | 0.031 3  | 0.038 2 | 0.385 5 |
| G16 | 0.388 8 | 0.112 3 | 0.025 6  | 0.034 8 | 0.561 5 |
| G17 | 0.354 6 | 0.083 8 | 0.037 3  | 0.042 1 | 0.517 8 |

表5 不同产地黄芪皂苷成分的平均值(mg/g)

Tab 5 Average values of astragaloside ingredients from different origins(mg/g)

| 产地    | 黄芪皂苷 I  | 黄芪皂苷 II | 黄芪皂苷 III | 黄芪甲苷    | 皂苷总和    |
|-------|---------|---------|----------|---------|---------|
| 甘肃岷县  | 0.427 2 | 0.139 8 | 0.031 0  | 0.036 8 | 0.634 8 |
| 甘肃宕昌县 | 0.368 3 | 0.100 8 | 0.022 1  | 0.032 8 | 0.524 0 |
| 甘肃陇西县 | 0.351 0 | 0.095 3 | 0.020 0  | 0.036 6 | 0.502 9 |
| 甘肃渭源县 | 0.366 6 | 0.105 2 | 0.028 6  | 0.034 6 | 0.535 0 |
| 甘肃漳县  | 0.371 7 | 0.098 1 | 0.031 5  | 0.038 5 | 0.539 8 |

由表4可见,蒙古黄芪中皂苷成分的含量具有一定的规律:黄芪皂苷 I > 黄芪皂苷 II > 黄芪甲苷 > 黄芪皂苷 III,与文献[5-6]报道一致。由表5可见,甘肃产蒙古黄芪中总皂苷含量平均值均大于0.5 mg/g;不同产地总皂苷含量平均值大小如下:岷县 > 漳县 > 渭源县 > 宕昌县 > 陇西县。

## 3 讨论

黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III和黄芪甲苷的基本结构相同,区别在于木糖端基上多了1个或2个乙酰基,碱性条件下乙酰基易于脱落,得到黄芪甲苷<sup>[7]</sup>。本文主要测定黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III和黄芪甲苷4种皂苷的含量,在提取过程中就不能按照《中国药典》的方法用氨试液洗涤<sup>[1]</sup>。

黄芪皂苷类成分通常采用正丁醇萃取、D101大孔树脂吸附纯化<sup>[4]</sup>,操作复杂烦琐,样品中杂质较多。本文采用C<sub>18</sub>固相萃取柱纯化样品,方法简单易行,所得的供试液干扰物少、重现性好。

综上所述,该方法简便、快速,结果准确、可靠,重复性良好,可为甘肃黄芪的质量控制提供依据。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:284.
- [2] 张兰涛,郭宝林,朱顺昌,等.黄芪种植资源调查报告[J]. 中药材,2006,29(8):771.
- [3] 赵明,段金殿,黄文哲,等.中国黄芪属(*Astragalus* Linn.)药用植物资源现状及分析[J]. 中国野生植物资源,2000,19(6):5.
- [4] 夏广萍,刘鹏,韩英梅.不同处理方法和不同产地黄芪药材中黄芪甲苷的含量测定[J]. 中药材,2008,31(3):385.
- [5] 覃红萍,鲁静,林瑞超.HPLC-ELSD法测定黄芪药材中黄芪皂苷 I、II、III、IV[J]. 中草药,2009,40(3):471.
- [6] 胡明勋,郭宝林,周然,等.山西浑源仿野生栽培蒙古黄芪的质量研究[J]. 中草药,2012,43(9):1 829.
- [7] 原田正敏,姜顺善.日本常用生药的定量方法:黄芪[J]. 国外医药植物药分册,1990,5(5):201.

(收稿日期:2014-10-19 修回日期:2015-02-03)

(编辑:余庆华)