

HPLC法同时测定益气祛白颗粒中2种成分的含量^Δ

康雷*, 顾圣莹, 朱冠华, 杨秋娅, 王玉珠, 吴佳琪, 李晓宇^{#a}, 刘皋林^{#b} (上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200082)

中图分类号 R283.627; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2918-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.14

摘要 目的: 建立同时测定益气祛白颗粒中黄芪甲苷IV和木通皂苷D含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为YMC-Pack ODS-AM(150 mm×4.6 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为0.8 ml/min, 检测波长为203 nm。结果: 黄芪甲苷IV和木通皂苷D的质量浓度分别在10~500、2.5~250 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 9和0.999 7); 平均加样回收率分别为106.09%、99.45%, RSD分别为1.81%、3.24% (n 均为6)。结论: 所建方法简单、稳定, 结果准确、可靠, 可为益气祛白颗粒的体内药动学研究提供依据。

关键词 益气祛白颗粒; 高效液相色谱法; 含量测定; 黄芪甲苷IV; 木通皂苷D

Simultaneous Determination of 2 Compounds in Yiqi Qubai Granules by HPLC

KANG Lei, GU Sheng-ying, ZHU Guan-hua, YANG Qiu-ya, WANG Yu-zhu, WU Jia-qi, LI Xiao-yu, LIU Gao-lin (Dept. of Clinical Pharmacy, The First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200082, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of astragaloside IV and akebia saponin D in Yiqi Qubai granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on a YMC-Pack ODS-AM (150 mm×4.6 mm, 3 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 203 nm. RESULTS: The linear ranges were 10-500 μg/ml for astragaloside IV ($r=0.999\ 9$) and 2.5-250 μg/ml for akebia saponin D ($r=0.999\ 7$). The average recoveries were 106.09% (RSD=1.81%, $n=6$) and 99.45% (RSD=3.24%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The established method is convenient, stable, accurate and reliable, and can provide reference for pharmacokinetic study of Yiqi qubai granules *in vivo*.

KEYWORDS Yiqi qubai granules; HPLC; Content determination; Astragaloside IV; Akebia saponin D

离效果较好、含量较高, 故选择210 nm作为检测波长。

本试验测定了贵州、湖北、浙江3个产地的雷公藤药材, 发现不同产地的雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量差别不大, 尚需更大样本量的试验来证明此结果的准确性。本方法简便、准确、重复性好, 适用于雷公藤药材及其制剂中雷公藤内酯甲的含量测定与质量控制。

参考文献

- [1] 齐晓娟, 刘志敏, 赵红晔. 雷公藤提取液对荷S180小鼠的抑瘤作用及其对IL-2活性的影响[J]. 中医学报, 2004, 32(4): 53.
- [2] Jang SY, Jang SW, Ko J. Celastrol inhibits the growth of estrogen positive human breast cancer cells through modulation of estrogen receptor alpha[J]. *Cancer Lett*, 2011,

300(1): 57.

- [3] Liu Y, Chen HL, Yang G. Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. protect dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced inflammatory damage[J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(4): 801.
- [4] Luo XL, Shao Q, Qu HB, *et al.* Simple method for determination of five terpenoids from different parts of *Tripterygium wilfordii* and its preparations by HPLC coupled with evaporative light scattering detection[J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(9): 1 284.
- [5] 蔡皓, 池玉梅, 姜海英, 等. 雷公藤药材存贮期间成分变化的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(4): 265.
- [6] 杨春欣, 周庭川. 雷公藤内酯醇不同季节的含量变化[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(1): 25.
- [7] 高丽, 聂中标, 岳晓华, 等. 不同产地雷公藤药材中雷公藤甲素含量测定[J]. 山西中医, 2012, 28(8): 42.
- [8] 张勇, 幸勇. 2种处理方法对雷公藤饮片中雷公藤内酯醇含量测定的影响比较[J]. 中国药房, 2006, 17(4): 299.
- [9] 何昱, 石森林, 张茹萍, 等. 雷公藤多苷主要有效成分的含量研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 197.

(收稿日期: 2014-05-04 修回日期: 2014-07-17)

^Δ 基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“十二五”项目子课题(No.2011ZX09302-007-02); 上海市科研计划项目课题(No.09dZ1974600)

* 药师, 硕士。研究方向: 临床药动学及药物代谢组学。电话: 021-37798313。E-mail: yuanlisjzz@163.com

^{#a} 通信作者: 副主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 临床药理学。电话: 021-37798312。E-mail: xyljaylxb@163.com

^{#b} 通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 临床药理学。电话: 021-63240090-4200。E-mail: gaolinliu@aliyun.com

益气祛白颗粒为我院院内制剂(批准文号:沪药制字Z05050804),是在我国著名皮肤病学专家朱光斗教授经验方的基础上,根据辨证施治原理并结合临床实践筛选出来的^[1]。该处方由黄芪、预知子、菟蔚子等中药材组方而成,具有益气固表、理气、活血、祛风的功效,临床主要用于治疗进行期白癜风。方中黄芪为君药,其所含黄芪甲苷IV(Astragaloside IV)为主要活性物质之一,是黄芪的指标成分。药理研究表明,黄芪甲苷具有免疫调节^[2]、抗炎^[3]、减少脂解、改善胰岛素耐受性、抗活性氧自由基、抑制细胞凋亡^[4]及神经保护^[5]等作用。预知子为臣药,木通皂苷D(Akebia saponin D)是其有效成分之一,具有心肌保护^[6]、抑制细胞凋亡^[7]、神经保护、抑制海马A β 的过量表达、治疗阿尔茨海默病等作用。笔者拟通过建立一种简单、稳定、准确、可靠的高效液相色谱(HPLC)分析方法,同时测定益气祛白颗粒中主要活性成分黄芪甲苷IV和木通皂苷D的含量,旨在为该复方制剂下一步的体内药动学研究提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

Prominence超快速液相色谱系统,包括CBM-20A型系统控制器、DGU-20A3型脱气机、LC-20AD型输液泵、SIL-20A型自动进样器、CTO-20A型柱温箱和SPD-M20A型二极管阵列紫外检测器(日本Shimadzu公司);SAVANT SPD2010型真空减压浓缩仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);B 2500S-MT型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司);G-560E型涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司);Centrifuge 5810R型高速离心机(德国Eppendorf公司);Milli-Q/Elix 5型超纯水系统(德国Merck Millipore公司);AL-104型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

益气祛白颗粒(上海交通大学附属第一人民医院提供,批号:111201、120302、1211002);黄芪甲苷IV对照品(中国食品药品检定研究院,纯度:99.0%,批号:110781-200613);木通皂苷D对照品(上海融禾医药科技发展有限公司,纯度:99.3%,批号:120627);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Merck公司);浓氨溶液(分析纯,苏州市三杰化学品科技有限公司,含量:25%~28%);正丁醇(分析纯,上海东懿实业公司化学试剂分公司,纯度 $\geq 99\%$);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC-Pack ODS-AM(150 mm \times 4.6 mm,3 μ m);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~15 min,30% \rightarrow 45% A; $>$ 15~15.2 min,45% \rightarrow 30% A; $>$ 15.2~25 min,30% A);流速:0.8 ml/min;检测波长:203 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ l。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 称取黄芪甲苷IV和木通皂苷D对照品各适量,分别以甲醇溶解并稀释制成黄芪甲苷IV、木通皂苷D质量浓度均为0.2 mg/ml的对照品贮备液。精密吸取两种对照品贮备液各适量,用甲醇依次稀释后按1:1(V/V)比例混合,制成混合对照品溶液(黄芪甲苷IV的质量浓度分别为10、20、50、100、200、500 μ g/ml;木通皂苷D的质量浓度分别为2.5、5、25、

50、100、250 μ g/ml)。

2.2.2 氨试液及水饱和的正丁醇溶液 取浓氨溶液40 ml,加水使成100 ml,即得氨试液^[8]。在50 ml的EP管中加入4 ml水和20 ml正丁醇,涡旋震荡后以1 811 \times g离心5 min,上层即为水饱和的正丁醇溶液。

2.2.3 供试品溶液 取益气祛白颗粒适量,研细混匀,准确称取0.4 g,置50 ml离心管中,加入氨试液2 ml,振摇使充分润湿,再加入水饱和的正丁醇溶液20 ml,封口膜密封后超声(功率:100 W,频率:42 kHz)提取15 min,以1 811 \times g离心5 min,倾出上层正丁醇液,下层再加入水饱和的正丁醇溶液20 ml,同法处理,合并2次正丁醇液,滤过,滤液用水洗涤2次,每次5 ml,分取正丁醇液,于45 $^{\circ}$ C真空减压蒸干,残渣用2 ml甲醇溶解,再以2 465 \times g离心10 min,即得供试品溶液。

2.3 专属性试验

取空白甲醇溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各适量,在上述色谱条件下进样测定。结果表明,各组分分离良好且空白无干扰。色谱见图1。

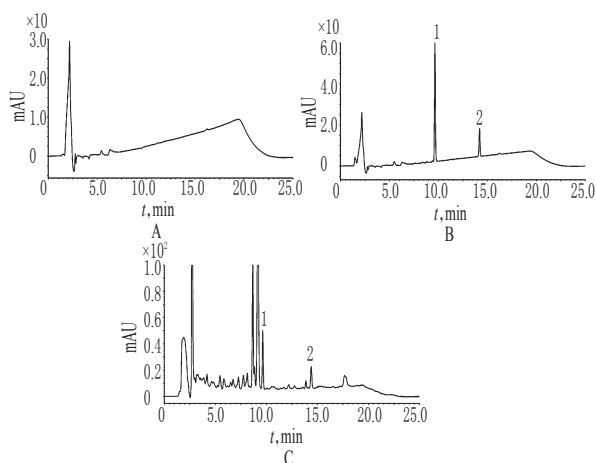


图1 高效液相色谱图

A.空白甲醇;B.混合对照品;C.供试品;1.木通皂苷D;2.黄芪甲苷IV

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank methanol; B.mixed control; C.test samples; 1.akebia saponin D; 2.astragaloside IV

2.4 线性关系考察

精密吸取不同质量浓度的混合对照品溶液,按上述色谱条件分别进样10 μ l,记录峰面积。以峰面积积分值(y)对对照品质量浓度(x)进行线性回归,得黄芪甲苷IV的回归方程为 $y=8.699 8 \times 10^2 x + 5.329 6 \times 10^3$ ($r=0.999 9, n=6$),木通皂苷D的回归方程为 $y=6.866 2 \times 10^3 x + 1.316 5 \times 10^4$ ($r=0.999 7, n=6$)。结果表明,黄芪甲苷IV和木通皂苷D的质量浓度分别在10~500、2.5~250 μ g/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取黄芪甲苷IV质量浓度为100 μ g/ml、木通皂苷D质量浓度为50 μ g/ml的混合对照品溶液,按上述色谱条件进样10 μ l,重复测定5次,计算日内精密度;再取上述混合对照品溶液连续测定3 d,每天连续测定3次,计算日间精密度。结果,黄芪甲苷IV、木通皂苷D日内精密度的RSD分别为0.08%、0.07%(n均为5),日间精密度的RSD分别为1.60%、2.22%(n

均为3),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一益气祛白颗粒供试品溶液(批号:111201),分别于0、2、4、8、12、24 h进样10 μ l,按上述色谱条件测定峰面积。结果,黄芪甲苷IV、木通皂苷D的RSD分别为5.17%、3.86%(n 均为6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批益气祛白颗粒(批号:111201)适量,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样10 μ l,测定峰面积,代入线性回归方程计算样品含量。结果,样品中黄芪甲苷IV、木通皂苷D的平均含量分别为1.156、0.227 mg/g,RSD分别为2.24%、0.76%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

称取已知含量的同一批益气祛白颗粒样品(批号:111201)适量,共6份,分别精密加入一定量的黄芪甲苷IV和木通皂苷D对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

化合物	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
黄芪甲苷IV	0.058 8	0.149 0	0.214 0	104.16	106.09	1.81
	0.059 6	0.150 0	0.218 0	105.60		
	0.060 6	0.151 0	0.217 0	103.58		
	0.058 2	0.149 0	0.219 0	107.92		
	0.058 3	0.149 0	0.219 0	107.85		
	0.058 8	0.151 0	0.221 0	107.42		
木通皂苷D	0.032 4	0.027 2	0.058 9	97.43	99.45	3.24
	0.032 2	0.027 4	0.059 3	98.91		
	0.032 5	0.026 9	0.059 3	99.63		
	0.032 3	0.028 0	0.059 6	97.50		
	0.032 9	0.027 7	0.059 9	97.47		
	0.033 6	0.024 3	0.059 3	105.76		

2.9 样品含量测定

取3批益气祛白颗粒样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,每批平行测定3份,记录峰面积,代入线性回归方程计算样品含量。结果,3批样品(批号:111201、120302、1211002)中黄芪甲苷IV的平均含量分别为1.152、1.137、1.074 mg/g($n=3$),木通皂苷D的平均含量分别为0.226、0.228、0.222 mg/g($n=3$)。

3 讨论

益气祛白颗粒由多味中药材组成,成分多且相互干扰大。笔者在试验初期曾尝试采用甲醇直接超声、乙酸乙酯萃取的方法提取样品,发现杂质峰较多且回收率低;后经过多次试验并参考相关文献^[9-10],利用黄芪甲苷IV和木通皂苷D这类水溶性皂苷能够溶于极性较大而又能与水分层的有机溶剂正丁醇的性质,采用氨试液溶解提取物后再经水饱和正丁醇溶液反复萃取的方法,使目标化合物与强亲水性的杂质得以分离,再通过减压蒸干正丁醇使皂苷类的成分得以富集。本方法省略了《中国药典》中索氏提取及大孔吸附树脂富集纯化的过程,改进了黄芪甲苷IV和木通皂苷D的提取、富集方法,大

大缩短了样品处理时间,简化了操作步骤,避免了繁复操作上的误差对定量分析的影响。

在流动相的选择中,笔者在试验初期尝试使用甲醇-水(40:60, V/V)作为流动相进行等度洗脱,发现黄芪甲苷IV和木通皂苷D的分离度较低;后将甲醇替换为乙腈并调节流动相体积比为30:70,黄芪甲苷IV和木通皂苷D的分离度良好,但黄芪甲苷IV的保留时间过长且出现色谱峰展宽;为了改善黄芪甲苷IV的峰形并缩短保留时间,最终确定采用梯度洗脱的方法,使乙腈在流动相中的初始比例为30%,随着溶剂洗脱能力的逐渐增强,黄芪甲苷IV的出峰时间由原来等度洗脱时的17.54 min缩短至14.27 min,保留时间适中,色谱峰峰形良好,且与供试品溶液中其他水溶性杂质的分离度较好。

综上所述,本方法简单、稳定,结果准确、可靠,可为益气祛白颗粒的体内药理学研究提供依据。

参考文献

- [1] 吴佳琪,周芳军,刘泉林,等.正交设计优选益气祛白颗粒提取工艺[J].中国药师,2010,13(4):489.
- [2] Wang YP, Li XY, Song CQ, *et al.* Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(3):263.
- [3] Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR, *et al.* Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression [J]. *Thromb Haemost*, 2003, 90(5):904.
- [4] Xiong M, He Q, Lai H, *et al.* Astragaloside IV inhibits apoptotic cell death in the guinea pig cochlea exposed to impulse noise[J]. *Acta Otolaryngol*, 2012, 132(5):467.
- [5] 谢利霞,刘宏乐,夏志红,等.黄芪甲苷对帕金森病体外、体内模型的神经保护作用研究[J].中国药房,2010,21(23):2132.
- [6] Li C, Liu Z, Tian J, *et al.* Protective roles of Asperosaponin VI, a triterpene saponin isolated from *Dipsacus asper* Wall on acute myocardial infarction in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 627(1/3):235.
- [7] Jeong SI, Zhou B, Bae JB, *et al.* Apoptosis-inducing effect of akebia saponin D from the roots of *Dipsacus asper* Wall in U937 cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(11):1399.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录172.
- [9] 陈有根,辛敏通,杨滨,等.黄芪药材中黄芪甲苷含量测定方法的改进[J].中国新药杂志,2008,17(21):1857.
- [10] 刘浩文,刘嘉仪,杨妙荣,等.黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究[J].中药新药与临床药理,2011,22(6):659.

(收稿日期:2013-09-12 修回日期:2014-05-10)