

陇西产黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱的研究

李进¹, 陈涛¹, 王洋², 宋洁瑾², 马志平², 孟萌^{2*}

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 建立陇西产黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱, 为全面科学地控制药材质量提供方法。方法 采用 HPLC-DAD-ELSD 串联技术, 流动相 A: 10% 乙腈, B: 90% 乙腈; 检测波长: 265 nm; 体积流量: 1 mL/min, 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL; 增益值: 20; 漂移管温度: 55 °C; 加热器级别: 65%; 气体压力: 2.068 5 × 10⁵ Pa。以 10 批甘肃陇西不同产地的黄芪药材建立黄酮类和皂苷类化合物指纹图谱共有模式, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行数据处理。结果 建立的方法对黄芪药材中黄酮类成分、皂苷类成分均有良好的分离, 一次进样同时测定了两类不同成分的指纹图谱, 不同批次药材间的相似度符合相关规定。结论 该方法可用于黄芪中黄酮类成分和皂苷类成分指纹图谱的同时测定, 控制药材质量。

关键词: 黄芪; 指纹图谱; HPLC-DAD-ELSD

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)05-0804-03

HPLC-DAD-ELSD Fingerprint of *Radix Astragali* in Longxi

LI Jin¹, CHEN Tao¹, WANG Yang², SONG Jie-jin², MA Zhi-ping², MENG Meng²

(1. First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract : Objective To establish the HPLC-DAD-ELSD fingerprint of *Radix astragali*, provide new methods for science quality control of the medicinal materials. **Methods** Application of HPLC-DAD-ELSD techniques were connected in series. The mobile phase A: 10% acetonitrile, B: 90% acetonitrile, detecting wavelength: 265 nm, flow rate: 1 mL/min, column temperature: 35 °C, sample size: 20 μL, gain: 20, tube: 55 °C, neb: 65%, air pressure: 2.068 5 × 10⁵ Pa. The mutual mode was established depending on ten *Astragalus* samples from different growing areas in Gansu. The software “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica” was applied to analyzing. **Results** The established method is good for the separation of saponins, flavonoids from *Radix Astragali*, and simultaneous determination of the two different components in one sample injection. The similarity of different batches of medicinal materials is fit for the requirement. **Conclusion** The method is workable to simultaneously determine saponins and flavonoids fingerprint from *Radix Astragali*, and to control its quality.

Key words : *Radix Astragali*; fingerprint; HPLC-DAD-ELSD

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根。具补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌的作用^[1]。黄芪中的化学成分主要有黄酮类、皂苷类和多糖等。黄酮类成分具有清除氧自由基, 抑制脂质过氧化和维持血中一氧化氮浓度, 保护缺血再灌注损伤的作用^[2]。皂苷类成分具

有抗衰老、抗病毒、抗风湿、降压、强心、保护心肌细胞、抗生物氧化、抗肿瘤、抗肝纤维化、抗血栓等作用^[3]。丹芪偏瘫胶囊为国家中药 6 类新药, 黄芪为其处方中的主药。丹芪偏瘫胶囊中黄芪药材的有效成分为皂苷类成分, 黄酮类成分为辅助成分。现有控制黄芪药材质量的方法为检测其有效成分黄芪甲苷的量, 此方法不能很好地反映药材的全貌。指纹图谱技术是近年来发展起来的质量控制新方法, 其

* 收稿日期: 2008-08-23

基金项目: 天津市科技创新专项资金项目(06FZZDSH00408)

作者简介: 李进(1958—), 男, 天津人, 学士学位, 主任药师, 硕士生导师, 主要从事中药制剂与质量标准的研究工作。

Tel: (022) 23970930 E-mail: yf@shitian.com

特点为能全面客观地反映药材的质量^[4,5]。此外,由于黄芪品种较为混乱,为了保证丹芪偏瘫胶囊质量的稳定、可控,黄芪的产地应做到相对固定。甘肃陇西为丹芪偏瘫胶囊中黄芪的主产地,多年来黄芪药材一直来源于此,本实验通过研究 10 批陇西地区的黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱,为企业遴选并固定黄芪药材的产地提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: Waters 高效液相色谱仪,包括 Waters600 型 HPLC 泵,2420 蒸发光散射检测器(ELSD),2998 二级管阵列检测器(DAD),Waters In-Line 脱气机,Waters Empower 工作站,色谱柱: Waters Sunfire™ C₁₈ (250 mm ×4.6 mm,5 μm)。

1.2 试剂:乙腈(色谱纯),重蒸水(自制)。

1.3 试药:芒柄花素对照品(批号 111703-200501)购自中国药品生物制品检定所,黄芪甲苷对照品(批号 111703-200501)购自中国药品生物制品检定所。黄芪药材均采自甘肃陇西县 10 个不同地区,均来源于豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongolicus* (Bunge.) Hsiao 的干燥根,由天津中医药大学第一附属医院主任药师崔维利对以上品种进行鉴定。黄芪具体产地见表 1。

表 1 甘肃陇西不同地区的黄芪药材

Table 1 Radix Astragalidis origin in Gansu Longxi from different habitats

编号	产地	编号	产地
1	巩昌镇	6	双泉乡
2	首阳镇	7	齐峰镇
3	菜子镇	8	和平乡
4	权家湾乡	9	宏伟乡
5	渭阳乡	10	德关乡

2 方法与结果

2.1 黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱方法的建立

2.1.1 色谱条件:流动相 A:10%乙腈,B:90%乙腈,梯度洗脱,梯度时间 60 min,流动相变化 B:5%~100%。检测波长:265 nm;柱温:35℃;进样量:20 μL;增益值:20;漂移管温度:55℃;加热器级别:65%;气体压力:2.068 5 ×10⁵ Pa。

2.1.2 对照品溶液的制备

黄芪甲苷对照品溶液:取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 0.1 mg/mL 的溶液,摇匀,即得。

芒柄花素对照品溶液:取芒柄花素对照品适量,精

密称定,加甲醇制成 0.2 mg/mL 的溶液,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备:取黄芪药材粉末(过二号筛),精密称定 4 g,甲醇 50 mL 索氏提取 4 h,滤过,滤液蒸干,加入 60℃水 25 mL 溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇振摇提取 3 次(每次 25 mL),合并正丁醇液,氨试液 40 mL 洗涤 2 次,弃去氨试液,正丁醇液水浴蒸干,残渣加适量甲醇使溶解,转移至 5 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。上述样品置 0~4℃保存。

2.2 干扰试验:进样供试品溶液 20 μL,记录 120 min 的色谱图,发现 60 min 后无色谱峰。因此分析时间定为 60 min。吸取甲醇溶液 20 μL,进样,运行 60 min,没有发现影响指纹图谱共有峰的溶剂峰。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验:取黄芪 8 号供试品溶液,连续进样 6 次,对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,皂苷类、黄酮类各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 3%;皂苷类相对峰面积的 RSD 小于 5%,黄酮类相对峰面积的 RSD 小于 3%,符合指纹图谱的技术要求。

2.3.2 稳定性试验:取黄芪 8 号供试品溶液,于 0、2、4、6、12、24、48 h 进样,对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,皂苷类、黄酮类各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 3%;皂苷类相对峰面积的 RSD 小于 5%,黄酮类相对峰面积的 RSD 小于 3%,符合指纹图谱的技术要求。

2.3.3 重现性试验:选取黄芪 8 号药材粉末 6 份,按供试品制备方法制备,分别进样,对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,皂苷类、黄酮类各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 3%;皂苷类相对峰面积的 RSD 小于 5%,黄酮类相对峰面积的 RSD 小于 3%,符合指纹图谱的技术要求。

2.4 黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱:取 10 批陇西黄芪药材供试品溶液,分别进样,色谱图见图 1、2。

2.5 共有峰的标定:根据 10 批陇西产黄芪药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱,分别标定共有峰皂苷类 12 个,黄酮类 9 个。

2.6 相似度的计算:采用《中国药典》委员会出版的中药色谱指纹图谱相似度评价软件(版本 200A)进行相似度计算。设置样品 5 图谱为参照谱,自动匹配,生成对照。相似度计算,结果见表 2、3。

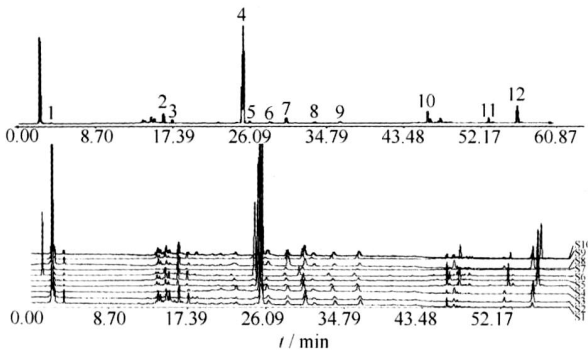


图 1 10 批陇西黄芪药材皂苷类成分指纹图谱(A)及叠加图(B)(S:黄芪甲苷)

Fig. 1 Fingerprint of ten batches of *Radix Astragalii* saponins in Longxi (A) and stacking chart (B) (S: stragaloside IV)

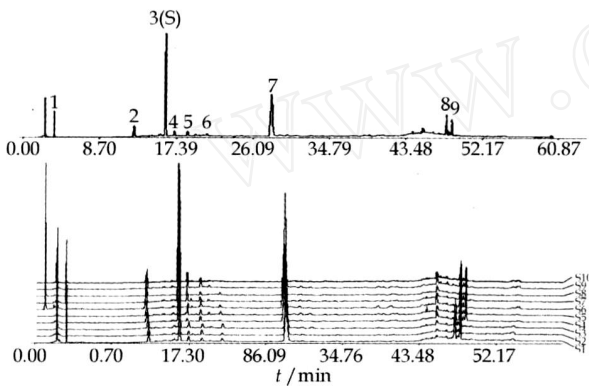


图 2 10 批陇西黄芪药材黄酮类成分指纹图谱及叠加图(S:芒柄花素)

Fig. 2 Fingerprint of ten batches of *Radix Astragalii* flavonoids in Longxi and overlapped chart (S: formononetin)

表 2 皂苷类成分指纹图谱相似度

Table 2 Fingerprint similarity of saponins

样品号	相似度	样品号	相似度
S ₁	0.973	S ₆	0.910
S ₂	0.952	S ₇	0.868
S ₃	0.829	S ₈	0.965
S ₄	0.990	S ₉	0.951
S ₅	0.973	S ₁₀	0.981
		对照	1.000

3 讨论

3.1 对超声、回流、索氏 3 种提取方法和不同的提取溶剂甲醇、70%乙醇、95%乙醇以及不同的提取时间进行了考察,以整体峰型、总峰数、分离度为考察

表 3 黄酮类成分指纹图谱相似度

Table 3 Fingerprint similarity of flavonoids

样品号	相似度	样品号	相似度
S ₁	0.957	S ₆	0.909
S ₂	0.964	S ₇	0.961
S ₃	0.991	S ₈	0.957
S ₄	0.943	S ₉	0.966
S ₅	0.990	S ₁₀	0.966
		对照	1.000

对象,通过比较发现本实验最终确定的提取方法可同时有效提取供试黄芪药材中黄酮类、皂苷类成分。

3.2 选择了几组不同的流动相,A:水,B:甲醇;A:10%甲醇,B:90%甲醇;A:10%甲醇,B:甲醇;A:水,B:乙腈;A:10%乙腈,B:90%乙腈进行考察,并对不同的梯度条件进行了系统考察,通过对皂苷类成分和黄酮类成分指纹图谱的综合考虑,选择了现有的流动相和梯度条件。

3.3 10 批陇西黄芪皂苷类成分的相似度中除黄芪 3 号、7 号药材外均符合相似度大于 0.9 的要求,分析原因可能与药材的生长年限不同有关,另外 ELSD 条件不稳定,也是原因之一,而黄酮类成分指纹图谱的相似度符合要求。甘肃陇西大部分批次药材均符合规定,考虑今后黄芪药材指纹图谱比较时,可相应对照 DAD 指纹图谱来考察。此外,药材采集时,尽量统一生长年限,并重点采集相似度高的地域的黄芪。

3.4 对黄芪药材黄酮类成分指纹图谱进行了 190~400 nm 的全波长扫描,重点考察了 203、230、254、265、280 nm 进行检测。结果显示,265 nm 条件下,黄酮类成分整体峰型、分离度良好,且总峰数多。

3.5 ELSD 的设定参数包括漂移度温度、载气压力、加热器级别和增益值。对上述参数条件进行了优化,选定了本试验所用条件。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 刘晋华,陈静然,尤光甫. 黄芪对心肌保护作用的药理学研究进展[J]. 中成药, 2002, 24(8): 623.
- [3] 郭宪清,张丽香,姜秉荣. 黄芪皂苷类组分的现代药理研究进展[J]. 中国药业, 2006, 15(12): 66-67.
- [4] 周艳林,严海,钟小清,等. 菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1246-1248.
- [5] 刘鄂湖,蔡光明,朱海升,等. 小叶黑柴胡药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 中药材, 2008, 39(10): 1560-1562.