

高效毛细管电泳法测定黄芪中黄芪甲苷的含量

杨天鸣 裴 婷 付海燕* 黄 灿 王云英
(中南民族大学药学院 湖北 武汉 430074)

摘 要: 为了建立能分离测定黄芪甲苷含量的胶束毛细管电泳法, 采用美国 Beckman 公司 P/ACEMDQ 毛细管电泳系统, 二极管阵列检测器, 未涂层弹性石英毛细管(75 μm \times 60 cm, 有效分离长度 50 cm), 检测波长 203 nm, 进样时间 5 s, 分离电压 20 kV, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 分离时间 15 min, 缓冲体系: 20 mmol/L 磷酸二氢钠—40 mmol/L 硼砂—30 mmol/L SDS—10% 乙腈(pH = 8.5)。结果表明: 黄芪甲苷在 0.035 ~ 0.7 mg/mL 与峰面积线性关系良好($r = 0.9992$)。黄芪甲苷的回收率为 98.30%。该法简单、快速、准确、消耗少、重现性好, 可用于黄芪药材的质量控制。

关键词: 黄芪; 黄芪甲苷; 高效毛细管电泳; 胶束毛细管电泳法

中图分类号: O657.33 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2012.06.001

0 引 言

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) 的干燥根; 春、秋二季采挖, 除去须根及根头, 晒干; 具补气固表, 利尿托毒, 排脓, 敛疮生肌的作用^[1]。黄芪甲苷是黄芪的主要有效成分之一, 常作为黄芪药材和含黄芪中成药的质量指标。文献报告测定黄芪甲苷含量的方法有很多, 如高效液相色谱法^[2], 薄层扫描法^[3]等, 但未见用高效毛细管电泳(HPCE)法对黄芪甲苷进行定量分析的报道。本研究对高效毛细管电泳仪测定黄芪甲苷的含量的分析条件进行了研究, 得到较好结果。

1 实验部分

1.1 仪器

P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司, 二极管阵列检测器); 弹性未涂层石英毛细管柱(75 μm \times 60 cm, 有效分离长度 50 cm, 河北永年光导纤维厂)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心), 十二烷基硫酸钠(SDS)(分析纯, 上海试一化

学试剂有限公司), 黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所), 蒙古黄芪购于武汉市德仁堂药店, 经中南民族大学药学院万定荣教授鉴定。其它试剂均为分析纯, 实验用水均为超纯水。

1.3 对照品溶液制备

精密称取一定量黄芪甲苷, 用体积分数 50% (下同) 的乙醇配制成 0.70 mg/mL 对照品溶液。

1.4 供试品溶液制备

精密称取约 2 g 的黄芪药材粉末, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加 50% 乙醇 50 mL, 密塞, 用超声—微波协同萃取 30 min, 放冷后过滤, 滤液转移到 50 mL 容量瓶内, 用 50% 乙醇定容到刻度, 摇匀。取滤液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即得黄芪供试品溶液。

1.5 电泳条件及测试方法

分离电压 20 kV, 进样压力(0.5 psi, 时间 5 s), 温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 分离时间 15 min, 检测波长 203 nm, 运行缓冲液(pH = 8.5)组成: 20 mmol/L 磷酸二氢钠—40 mmol/L 硼砂—30 mmol/L SDS—10% 乙腈。毛细管使用前用 NaOH 溶液(0.10 mol/L)冲洗 2 min、纯水冲洗 5 min、pH = 8.5 缓冲溶液冲洗 10 min; 两次运行之间分别用纯水冲洗 3 min 和用 pH = 8.5 缓冲溶液冲洗 5 min。用黄芪甲苷对照品溶液在波长 190 ~ 330 nm 之间进

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAI27B00); 中央高校科研专项资助重点项目(CZZ10005); 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验开放基金(2011111)

作者简介: 杨天鸣(1962-), 男, 湖北黄冈人, 教授, 研究方向: 药物分析, 化学生物学。

* 通信联系人: 付海燕, 女, 讲师, 博士, 研究方向: 化学计量学、药局分析。

行二极管阵列扫描,发现检测波长为 203 nm 时,对黄芪甲苷的检测灵敏度最高。

2 结果与讨论

2.1 电泳模式的选择

通过比较在毛细管区带电泳(CZE)和毛细管胶束电动色谱(MECC)两种模式下黄芪供试品溶液的电泳分离效果,发现在含有表面活性剂 SDS 的 MECC 模式下分离效果较好。

2.2 缓冲溶液浓度对分离的影响

电泳分离过程中,若缓冲溶液电解质浓度过低,分离度达不到要求;缓冲溶液电解质浓度过高,则供试液中酸性成分负电荷密度可能增加,会使迁移时间过长。通过研究不同浓度的硼砂溶液(10~40 mmol/L)、 NaH_2PO_4 溶液(10~40 mmol/L)、SDS 溶液(10~40 mmol/L)的混合缓冲溶液对黄芪供试品溶液电泳分离的影响,选择混合缓冲溶液的组成为:20 mmol/L 磷酸二氢钠—40 mmol/L 硼砂—30 mmol/L SDS 溶液为背景电解质,电流稳定,峰型较好。

2.3 缓冲溶液 pH 值对分离的影响

选择 pH 值在 6.0~9.0 之间变化的缓冲液进行实验,发现缓冲液 pH 值小时,各组分峰重叠较多;缓冲液 pH 值大时,峰型差且迁移时间延长。当缓冲液 pH 值约为 8.5 时,电泳分离效果较好。

2.4 改性剂用量的影响

以乙腈作缓冲液改性剂,当乙腈在体积分数为 5%~20%(v/v)之间变化时,发现随着乙腈含量的增加,电渗流降低,迁移时间延长。当缓冲液中加入 10% 乙腈时,电泳分离效果较好,迁移时间适中。

2.5 运行电压选择

试验了分离电压在 15~25 kV 之间变化时黄芪甲苷的分离情况,结果表明,电压为 20 kV 时分离效果和峰形较好,分离时间长短合适。

2.6 黄芪甲苷峰的定性

将黄芪甲苷对照品溶液和黄芪供试品溶液在毛细管电泳仪上进样分析(毛细管电泳图见图 1),在黄芪甲苷对照品溶液电泳图中 5.26 min 处出现一个尖峰,对比二者的迁移时间,可知在黄芪供试品溶液的电泳图中与其相对的 2 号峰为黄芪甲苷。在黄芪供试品溶液中加入黄芪甲苷对照品溶液,进样分析 2 号电泳峰增益明显,证明上述结论正确。

2.7 标准曲线

精密吸取黄芪甲苷对照品溶液用 50% 乙醇稀

释成系列浓度的对照品标准溶液,分别进样,按 1.5 条件和方法进行测试。测定峰面积积分值,以对照品峰面积积分为纵坐标(Y)相应对照品标准溶液浓度(X)为横坐标绘制标准曲线。通过回归分析,黄芪甲苷在 0.035 0~0.700 0 mg/mL 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系,线性回归方程为: $Y = 209\,735.472\,24X + 6\,877.674\,42$ 相关系数 $r = 0.999\,2$ 。

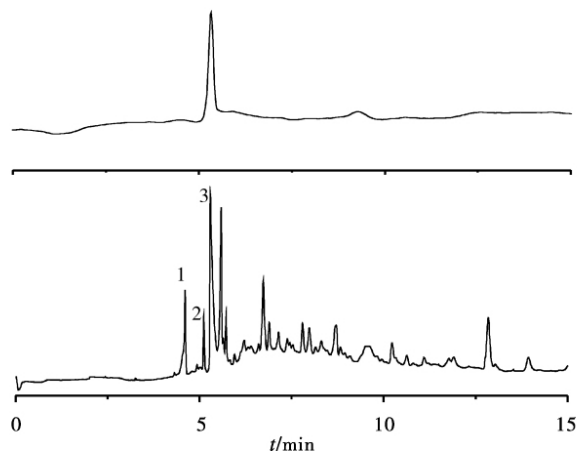


图 1 黄芪甲苷对照品溶液电泳图(上)和黄芪供试品溶液的电泳图(下)

Fig. 1 The electropherograms of astragaloside IV (up) and the electropherograms of the extract of Astragali Radix (low)

2.8 精密度考察

精密吸取 1.3 黄芪甲苷对照品溶液,按 1.5 条件和方法进行测试。日内重复进样 5 次,日内迁移时间的相对标准偏差(RSD)为 0.50%;连续 5 d 进样,日间的 RSD 为 0.99%;峰面积的日内测量和日间测量的 RSD 分别为 1.18% 和 2.65%,达到定量分析精密度的要求。

2.9 样品测定

分别取 5 个批次的黄芪药材,按 1.4 黄芪供试品溶液制备方法处理后,按 1.5 条件和方法进行测试。黄芪中黄芪甲苷的含量测定结果见表 1。

表 1 黄芪中黄芪甲苷的含量测定结果

Table 1 Determination of the Astragaloside IV of

Astragali Radix		n = 6
批次	黄芪甲苷/(mg/g)	RSD/%
1	0.500 6	1.19
2	0.532 0	1.44
3	0.602 0	0.66
4	0.614 1	1.11
5	0.651 1	1.30

2.10 加样回收率

采用加样回收法,精确量取 1.4 黄芪供试品溶液样品 6 份,精确加入一定量 1.3 对照品溶液,

进样,记录电泳图,计算平均回收率为 98.30% 相对标准偏差(RSD)为 1.17% .

3 结 语

本研究分析结果与文献[4-5]报道的 HPLC 内标法测定结果的回收率和相对标准偏差(RSD)相近,表明用 HPCE 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量完全符合分析要求. 高效毛细管电泳(HPCE)避免了 HPLC 分析中药成分分析常遇到一些问题^[6]: 色谱柱易受复杂中药成分污染,柱寿命短,且难以再生; 色谱柱上沉积的污染物经常以杂质峰的形式出现. 本研究结果表明,HPCE 方法快速灵敏、精密度好、回收率高、结果准确可靠,可用于黄芪药材及其制剂的质量控制.

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 中国医药科

技出版社: 2010. http://view.china.alibaba.com/cms/promotion/jiadianfhc.html?cosite=pipi_buyer&button_click=top&location=300_250_613defc_banner9.

- [2] 胡芳弟,赵健雄,封士兰等. 黄芪的高效液相色谱指纹图谱及主成分含量测定[J]. 中药材,2004,27(11): 831-834.
- [3] 梁旭明,唐耀书,张小梅. 薄层扫描法测定黄芪胶囊剂中黄芪甲苷的含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(1): 22-23.
- [4] 裴彩云,王宗权,贾继明,等. HPLC-ELSD 内标法测定 8 个产地黄芪药材、饮片黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(14): 1982-1984.
- [5] 吕涛,姚希贤,孙泽明. 药物血清内黄芪甲苷含量测定及其抑制 HSCs 活化增殖的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(12): 2770-2773.
- [6] 孙毓庆,阮婧华,马欣. 中药的毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 色谱,2003,21(4): 303-306.

Determination of astragaloside IV in *Astragali Radix* preparations by high efficiency capillary chromatography

YANG Tian-ming, PEI Ting, FU Hai-yan, HUANG Can, WANG Yun-ying

(College of Pharmacy, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: A rapid and simple method was used to determine Astragaloside IV in *Radix astragali* by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). Separations were carried out in a fused-silica capillary tube with peak detection at 203 nm. Operating voltage was 20 kV and temperature was maintained at 25 °C while injection was 5 s and separation time was 15 min. The buffer was composed of 20 mmol/L Sodium Dihydrogen Phosphate + 40 mmol/L Borax + 30 mmol/L SDS + 10% Acetonitrile (pH = 8.5). Under the chosen condition, the linear concentration of Astragaloside IV ranged from 0.035 to 0.700 mg/mL ($r = 0.9992$). The method was used for analysis of Astragaloside IV with recovery of 98.30%. This method is simple, good repeatability and rapidity and could be used as quality control for *Radix astragali*.

Key words: *Radix astragali*; Astragaloside IV; high efficiency capillary electrophoresis; MECC

本文编辑: 张 瑞