

高效液相色谱法测定玉屏风口服液中黄芪甲苷含量的研究

蔡丽青¹, 鄢连和², 林绿冬², 陈忠伟¹

1. 青田县人民医院, 浙江 青田 323900; 2. 丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法测定玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量, 为控制玉屏风口服液的质量提供参考依据。方法: 采用 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-水 (30:70) 为流动相, 流速: 1 mL/min; 以蒸发光散射检测器: 气体流速: 2.4 L/min; 漂移管温度: 108℃。对 3 批玉屏风口服液中的主要活性成分黄芪甲苷的含量进行测定。结果: 黄芪甲苷在 0.002~0.2 mg/mL 范围内呈现良好的线性关系; 回收率为 99.1%, RSD 值为 2.08%; 3 批玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量分别为 0.136 mg/mL、0.142 mg/mL、0.137 mg/mL。结论: 采用高效液相-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 法测定玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量, 具有快速、简便、准确、可靠等优点, 能够用于玉屏风口服液的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 玉屏风口服液; 黄芪甲苷; 含量检测

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0225-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.105

Determination of Astragaloside in *Yupingfeng* Oral Liquid by HPLC

CAI Liqing, YAN Lianhe, LIN Ludong, et al

Abstract: **Objective:** To establish a method for detecting the content of astragaloside in *Yupingfeng* oral liquid by high performance liquid chromatography (HPLC), so as to provide references for controlling the quality of *Yupingfeng* oral liquid. **Methods:** HPLC was performed on Hypersil ODS2 C18 column with acetonitrile - water(30 : 70) as the mobile phase, flow rate of 1mL/min, evaporative light scattering detector with gas flow rate of 2.4 L/min, and drift tube temperature at 108 °C. Astragaloside content of three batches of *Yupingfeng* oral liquid was determined. **Results:** Astragaloside within the range of 0.002~0.2 mg/mL showed good linear relationship with the recovery of 99.1% and RSD of 2.08%. Astragaloside content of the three batches was 0.136 mg/mL, 0.142 mg/mL, 0.137 mg/mL, respectively. **Conclusion:** HPLC- evaporative light scattering detection(HPLC-ELSD) is quick, simple, accurate, and reliable for detecting Astragaloside content in *Yupingfeng* oral liquid, and can be used for the quality control of *Yupingfeng* oral liquid.

Keywords: High performance liquid chromatography(HPLC); *Yupingfeng* oral liquid; Astragaloside; Content determination

玉屏风口服液是较为常用的非处方药, 该方系由黄芪、防风和白术 3 味中药组成, 具有良好的敛汗固表、预防感冒、调节人体免疫功能的功效, 在中成药中有“两种球蛋白”的美誉, 故在日常防治疾病的过程中具有较为广泛的用途。黄芪是玉屏风口服液的重要成分之一, 其含有的活性成分黄芪甲苷具有十分重要的药理活性, 故常将其作为质量控制的重要指标^[1-5]。笔者采用高效液相-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法对玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量进行测定, 建立测定黄芪甲苷含量的基本方法, 为控制玉屏风口服液的质量提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料 黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批

号: 110708-201224); 玉屏风口服液(江苏某中药厂生产, 批号分别为: 20131112001, 20131112002, 20131112003), 乙腈(山东禹王试剂有限公司禹成化工厂, 色谱纯, 批号: 201310001), 甲醇(上海振兴化工一厂, 色谱纯, 批号: 2013111007)。试验中使用的其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(Agilent 1200 色谱泵, Agilent 1200 自动进样器紫外检测器, Agilent 1200 色谱工作站); ELSD2000 检测器; AL104/01 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); TG16-WS 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

[收稿日期] 2014-10-06

[作者简介] 蔡丽青 (1964-), 女, 主管(中)药师, 研究方向: 中药。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件^[6] 色谱柱为迪马公司生产的 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱; 黄芪甲苷的色谱条件为: 以乙腈-水(30:70)为流动相, 流速: 1 mL/min; 蒸发光散射检测器: 气体流速: 2.4 L/min; 漂移管温度: 108℃, 进样量: 20 μL。

2.2 黄芪甲苷对照品溶液的制备 精密称定黄芪甲苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 即得黄芪甲苷对照品溶液, 浓度为 0.400 mg/mL, 备用。

2.3 阴性样品的制备^[7] 取防风 200 g, 加 10 倍量的纯化水浸泡 2 h, 置于挥发油提取器中提取挥发油, 收集蒸馏后所得的水溶液, 剩余的防风药渣与炒白术 200 g, 同置于提取容器中, 加入 8 倍量的水, 回流提取 2 次, 第一次为 1.5 h, 第二次为 1 h, 合并提取液, 滤过, 滤液浓缩至适量, 加适量的乙醇, 醇沉 12 h, 将上清液浓缩至适量即可。另取 400 g 蔗糖制成糖浆, 与挥发油共同加入浓缩液中, 加适量的纯化水调节至 1000 mL, 搅拌均匀, 过滤, 灌装, 灭菌即得。精密量取玉屏风空白口服液 20 mL, 用水饱和的正丁醇振摇提取 5 次, 每次 25 mL, 合并正丁醇提取液, 用氨试液洗涤 3 次, 每次 20 mL, 用旋转蒸发仪回收正丁醇提取液至溶剂挥干, 残渣加适量的甲醇溶解并转移至 10 mL 的量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀、离心、取上清液, 即得玉屏风阴性样品, 备用。

2.4 供试品溶液的制备 精密量取玉屏风口服液 20 mL, 用水饱和的正丁醇振摇提取 5 次, 每次 25 mL, 合并正丁醇提取液, 用氨试液洗涤 3 次, 每次 20 mL, 用旋转蒸发仪回收正丁醇提取液至溶剂挥干, 残渣加适量的甲醇溶解并转移至 10 mL 的量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀、离心、取上清液, 即得, 备用。

2.5 空白试验 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液、玉屏风口服液样品溶液和阴性样品溶液各 20 μL, 按照色谱条件进行测定。由结果可知, 玉屏风口服液阴性样品溶液对样品溶液的含量测定无任何干扰。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系的考察 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 0.05、0.5、1、2、5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 定容, 吸取对照品溶液 20 μL, 按照色谱条件测定, 以浓度(X)的常用对数为横坐标, 峰面积(Y)的常用对数为纵坐标, 绘制黄芪甲苷的标准曲线, 经回归得到黄芪甲苷的标准曲线为: $Y=1.9432X+5.5686$, $r=0.9996$ 。结果表明, 黄芪甲苷在 0.002~0.2 mg/mL 范围内呈现良好的线性关系。

2.6.2 精密度实验 取供试品溶液, 在色谱条件下, 连续进样 5 次, 每次进样 20 μL, 测定黄芪甲苷的峰面积。测定结果显示: RSD 值为 1.22%, 表明该方法的精密度良好。

2.6.3 稳定性实验 取供试品溶液, 在色谱条件下, 每隔 2 h 精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 连续进样 7 次, 测定峰面积。测定结果显示: RSD 值为 0.89%, 表明供试品溶液

中黄芪甲苷在 12 h 内基本稳定。

2.6.4 重复性实验 取同一批样品, 按照“2.3”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 按照黄芪甲苷的色谱条件测定黄芪甲苷的峰面积, 计算含量。测定结果显示, RSD 值为 1.84%, 表明采用该方法测定玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量, 重现性良好。

2.6.5 加样回收率实验 精密量取玉屏风口服液 20 mL, 按比例加入黄芪甲苷对照品, 按照“2.3”项下方法制备溶液, 溶液制备好之后, 分别精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 按照色谱条件测定黄芪甲苷的峰面积, 计算回收率。测定结果显示: 黄芪甲苷的回收率为 99.1%, RSD 值为 2.08%, 表明该方法的回收率符合相关规定。

2.6.6 含量测定 精密吸取玉屏风口服液(批号分别为: 20131112001, 20131112002, 20131112003)各 20 mL, 每个批号的样品平行制备 6 份, 按照“2.4”项下供试品溶液的制备方法制备样品, 精密吸取 20 μL 玉屏风口服液样品溶液注入高效液相色谱仪, 按照色谱条件测定黄芪甲苷的峰面积, 计算样品中黄芪甲苷的含量。结果显示, 3 批样品中黄芪甲苷的含量分别为 0.136 mg/mL、0.142 mg/mL、0.137 mg/mL, RSD 值分别为 1.64%、1.33%、1.96%。

3 讨论

玉屏风出自元代著名医家危亦林所著的《世医得效方》, 该方由防风、黄芪、白术 3 味中药材合理配伍而成, 具有益气、固表、止汗等功效, 临床主要用于表虚不固、自汗恶风、体虚易感风邪等的治疗。现代药理研究表明, 玉屏风中的活性成分黄芪甲苷可增强机体免疫、提高抗氧化能力及促进生长等, 为玉屏风方中的重要活性物质。为提高患者的顺应性, 采用现代制剂工艺将原方改为口服液, 具有服用简单、口感较好、携带方便的优点, 受到了广大患者的青睐。因黄芪为方中的重要成分, 故现行版《中华人民共和国药典》的质量标准中主要考察黄芪中黄芪甲苷的含量, 将其作为评价玉屏风口服液质量标准的重要指标。

黄芪甲苷的结构比较特殊, 为四环三萜皂苷化合物, 在紫外吸收的末端比较弱, 如采用紫外检测器进行含量测定, 对检测的准确性有比较大的影响, 故常采用蒸发光散射检测器对其进行含量测定^[8]。笔者采用蒸发光散射检测器对玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量进行检测, 进行了方法学方面的考察, 结果显示, 采用该方法测定玉屏风口服液中活性成分黄芪甲苷的含量, 具有良好的线性关系, 可快速、准确测定黄芪甲苷的含量, 适用性较好。由此可见, 建立的黄芪甲苷含量的测定方法可比较准确地测定玉屏风口服液中黄芪甲苷的含量, 为控制玉屏风口服液的质量提供了一定的依据。

[参考文献]

[1] 邹龙, 刘辉, 李仲秋, 等. HPLC 测定补阳还五汤总苷中

- 黄芪甲苷和芍药苷的含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(5): 39-42.
- [2] 王宗权, 贾继明, 裴彩云. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定不同产地黄芪中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2013, 22(19): 10-12.
- [3] 聂颖兰, 范斌, 郭娜, 等. HPLC-ELSD 法测定健脾益肾胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 130-132.
- [4] 何德云, 钟元高, 廖海燕, 等. 蒸发光散射测定扶正益胃口服液黄芪甲苷的含量[J]. 解放军药学学报, 2013, 29(4): 367-368, 371.
- [5] 游维丽, 张玲. 高效液相色谱法测定芪芍安胃胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(2): 32-33.
- [6] 张宗保, 张霄岳, 柳新, 等. 阳春肾舒胶囊制备及淫羊藿苷和黄芪甲苷含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(9): 61-63.
- [7] 姜辉, 高家荣, 张家富, 等. 超高效液相色谱-蒸发光散射法测定新风胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 安徽中医药大学学报, 2013, 32(5): 75-77.
- [8] 李焕丹, 朱颖虹, 陈晓颖, 等. 玉屏风颗粒剂中黄芪甲苷的含量测定[J]. 广东药学院学报, 1998, 14(1): 7-9.
- (责任编辑: 刘淑婷, 吴凌)

补中益气汤对 A549 荷瘤小鼠脾组织 Fas 蛋白表达的影响

孙志彬¹, 井欢², 李璐璐¹, 王哲², 刘春英²

1. 辽宁中医药大学研究生院, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110847

[摘要] 目的: 研究补中益气汤对 A549 荷瘤小鼠脾组织中 Fas 蛋白表达的影响。方法: 建立 A549 荷瘤小鼠模型进行体内抗肿瘤实验, 采用随机对照法将 30 只 BALB/c 小鼠分为正常组、空白对照组、中药高剂量组、中药低剂量组、西药组, 除正常组外, 余组荷瘤, 成功后, 每天灌胃相应药物 1 次, 连续 10 天后取材。采用免疫组织化学检测脾组织中 Fas 蛋白的表达; 逆转录-多聚酶链式反应 (RT-PCR) 法检测脾组织中 Fas 的 mRNA 表达。结果: 正常组中 Fas 蛋白在细胞膜有表达, 空白对照组出现较多棕黄色颗粒, 与正常组比较, Fas 表达明显升高 ($P < 0.01$); 补中益气汤及顺铂作用后, Fas 蛋白表达减少, 与空白对照组比较, 中药低剂量组、西药组 Fas 表达明显下降 ($P < 0.05$), 中药高剂量组下降最显著 ($P < 0.01$)。中药高剂量组、中药低剂量组、西药组比较, Fas 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。与正常组比较, 空白对照组 Fas 的 mRNA 的表达量明显增加 ($P < 0.01$); 经补中益气汤及顺铂作用后, Fas mRNA 的表达减少, 中药高剂量组、中药低剂量组及西药组与空白对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而该 3 组的 Fas mRNA 的表达与正常组无明显差异。结论: 补中益气汤可下调 A549 荷瘤小鼠脾脏中 Fas 蛋白的表达, 从而促进机体免疫系统对肺癌细胞的杀伤。

[关键词] 补中益气汤; Fas 蛋白; A549 细胞株; 脾组织

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 02-0227-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.02.106

Effect of *Buzhong Yiqi* Decoction on Fas Protein Expression in Splenic Tissue of A549 Tumor Bearing Mice

SUN Zhibin, JING Huan, LI Lulu, et al

Abstract: **Objective:** To investigate the effect of *Buzhong Yiqi* Decoction on the protein expression of Fas in splenic tissue of A549 tumor bearing mice. **Methods:** Lung cancer A549 mouse model was established for anti-lung cancer experiment. Thirty BALB/c mice were randomly divided into normal group, blank control group and high-dose Chinese medicine (CM) group,

[收稿日期] 2014-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81072743); 辽宁省教育厅项目 (L2010355)

[作者简介] 孙志彬 (1981-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药抗肿瘤。

[通讯作者] 井欢, E-mail: huanj99@163.com。