

高效液相色谱-蒸发光散射检测黄芪药材中黄芪甲苷的含量

纪松岗¹, 李翔², 朱东亮², 张国庆³, 王彬³, 姜子洋² (1. 中国人民解放军第401医院药局, 山东青岛266071; 2. 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海200433; 3. 第二军医大学东方肝胆医院药局, 上海200438)

摘要 目的:采用高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)测定膜荚黄芪中黄芪甲苷的含量 **方法:**黄芪药材经甲醇-氨水(v/v 9:1)超声提取, 确定实验条件并进行方法学考察, 色谱条件: 依利特 Hypersil ODS 2 色谱柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相: A相为乙腈, B相为水, 梯度洗脱; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L。ELSD检测器条件: 漂移管温度: 40 $^{\circ}$ C, 载气(空气)压力: 3.5Bar, 增益值: 7 **结果:**方法学考察结果表明, 黄芪甲苷低、中、高3个进样量的日内精密度和日间精密度的RSD均小于2.0%, 48h内稳定性试验的RSD分别为1.24%, 重复性试验的RSD分别为1.26% (n=5), 最低检测限分别为0.6930mg/mL, 加样回收率结果分别为97.05%, RSD=0.17% (n=3) 膜荚黄芪中黄芪甲苷的含量均符合药典标准 **讨论:**该方法缩减了黄芪药材的前处理步骤, 测定结果准确, 能够用于黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的研究

关键词 HPLC-ELSD; 黄芪药材; 黄芪甲苷; 含量测定

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0111(2005)05-0295-03

Determination astragaloside IV in *Radix Astragali* by HPLC-ELSD

Ji Song-gang¹, Li Xiang², Zhu Dong-liang², Zhang Guo-qing³, Wang Bin³, Liu Zi-yang²

(1. Department of pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. Department of pharmaceutical analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

ABSTRACT Objective: To determine astragaloside IV in *Radix Astragali* by HPLC-ELSD. **Methods:** *Radix Astragali* was extracted with MeOH-NH₃·H₂O (v/v 9:1), the condition was confirmed and the validation of the method was also tested. The chromatography condition was with Hypersil ODS 2 column (4.6mm×250mm, 5 μ m); mobile phase was A: ACN, B: H₂O, gradient elution, flow speed was 1.0 mL/min, temperature of column was room temperature, inject volume: 20 μ L. The ELSD conditions were as follows: the temperature of drift tube was 40 $^{\circ}$ C, the gas pressure was 3.5Bar, the value of gain was 7. **Results:** The intra-day and inter-day precision (RSD) at low, middle and high injection amount were all less than 2.0%. The stability (RSD) was 1.24% in 48h. The recurrence (RSD, n=5) was 1.26%. The limit of detection was 0.6930mg/mL. The recoveries were 97.05% (RSD=0.17%, n=3) for astragaloside IV. The contents of astragaloside IV in ten different batch of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. were accord to the standard of Chinese Pharmacopoeia. **Conclusion:** The method could shorten the process and time of *Radix Astragali* pretreatment with character of simple, suitable and reliable. The studies could apply to determine the content of astragaloside IV in *Radix Astragali*.

KEY WORDS HPLC-ELSD; *Radix Astragali*; astragaloside IV; determination

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有补气固表、利尿排毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1]。多年的研究表明, 黄芪皂苷是黄芪药效物质基础的重要组成部分之一, 在抗衰老、调节免疫功能、保护心肌和大脑缺血等多方面具有显著作

用^[2]

中国药典2005年版采用HPLC-ELSD等度洗脱测定黄芪中黄芪甲苷的含量, 样品前处理需经过正丁醇萃取、氨试液处理、大孔树脂吸附除杂等步骤, 过程繁琐, 直接导致方法的回收率较低、重现性较差。文献^[3,4]报道的方法与药典基本类似。由于采用等度洗脱的方法, 使黄芪甲苷的色谱峰理论塔板数较低, 峰展开比较严重, 导致定量检测的准确性较差。

本实验采用HPLC-ELSD梯度洗脱的方法测定药材中黄芪甲苷的含量, 同时简化了样品的制备过

基金项目: 上海市科委科技攻关基金(02419125); 中药质量控制的现代化研究。

作者简介: 纪松岗(1964-), 男, 副主任药师

通讯作者: 姜子洋, Tel: (021)25070400, E-mail: louziyang@126.com

程,缩短前处理时间和步骤,具有方法回收率高、精密度好等优点。

1 材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪:510 型 HPLC 双泵,Rheodyne 7725i 进样器;迪马 SEDEX 75 型蒸发光散射检测器;SrA3dv 色谱数据工作站;METTLER AE240 电子天平;CQF-I-6 型超声仪;上海淀久 DJ-04 药材粉碎机;BüCHI R-200 型旋转蒸发仪。

1.2 试剂 黄芪甲苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号:0781-9807);黄芪药材由上海华宇药业有限公司提供,并鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根;甲醇和乙腈为色谱纯;水为重蒸水。

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱:依利特 Hypersil ODS 2 柱(4.6mm×250mm,5 μ m);流动相:A 相为乙腈,B 相为水,梯度洗脱。A 相含量随时间的变化:5% (0~5min),5%~30% (5~18min,线性),30%~40% (18~40min,线性),40%~85% (40~42min,线性),85%~95% (42~60min,线性);流速:1.0mL/min;柱温:室温;进样量:20 μ L。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 6.93mg,置 10mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每 1mL 中含黄芪甲苷 693.0 μ g)。精密量取对照品溶液 2.5、0.5、0.25、0.05mL,分别置 5mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得浓度为 346.5、69.30、34.65、6.930mg/mL 的对照品溶液,置于 4℃ 冰箱保存。

2.3 线性关系考察 分别将不同浓度的对照品溶液依次连续进样,分别重复 3 次,以对照品溶液浓度的自然对数为横坐标(X),峰面积的自然对数为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算回归方程。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 以 6.930、69.30、693.0 μ g/mL 的黄芪甲苷对照品溶液,在 1d 之内连续进样 5 次,以及连续 5d 分别进样,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。

2.4.2 稳定性试验 制备黄芪药材样品溶液,分别在 0、3、6、12、18、24、36、48h 测定黄芪甲苷的峰面积,考察稳定性。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批次黄芪药材样品 5 份,各约 1.0g,分别制成样品溶液,进样分析。

2.4.4 检测限考察 将黄芪甲苷对照品溶液进行

稀释,以信噪比为 3:1 时,确定其最低检测限。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取黄芪甲苷含量为 0.997 0mg/g(黄芪药材粗粉)3 份,各约 1.0g,分别精密加入 693.0 μ g/mL 黄芪甲苷对照品溶液 1.1、1.4、1.7mL,制成样品溶液,每份测定 3 次,计算加样回收率。

2.5 样品测定 对 10 批次黄芪药材进行含量测定。黄芪药材样品溶液的制备:取黄芪药材粗粉约 1.0g(过 40 目筛,60℃ 干燥至恒重),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 90mL,氨水 10mL,密塞,超声处理 60min,滤过,滤渣用甲醇洗涤 3 次,每次 20mL,合并滤液减压回收至干,残渣用适量甲醇溶解,转移至 5mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μ m 滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得,置于 4℃ 冰箱保存。

3 实验结果

3.1 标准曲线的制备 黄芪甲苷的回归方程为 $Y = 1.415 X + 7.509$, $r = 0.9994$,在 6.930~693.0 μ g/mL 之间的线性关系良好。

3.2 精密度考察 黄芪甲苷对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 1.65%、0.85%、0.49% 和 1.57%、0.43%、0.70%。结果表明方法的精密度良好。

3.3 稳定性考察 黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.24%。结果表明供试品溶液在 48h 内稳定。

3.4 重复性考察 黄芪药材中黄芪甲苷的平均含量为 0.995 2mg/g, $RSD = 1.26%$ ($n = 5$),表明方法的重复性良好。

3.5 最低检测限考察 黄芪甲苷的最低检测限为 0.693 0mg/mL。

3.6 加样回收率考察 黄芪药材中黄芪甲苷的加样回收率结果为 97.05%, $RSD = 0.17%$ ($n = 3$)。黄芪药材色谱图见图 1。结果见表 1。

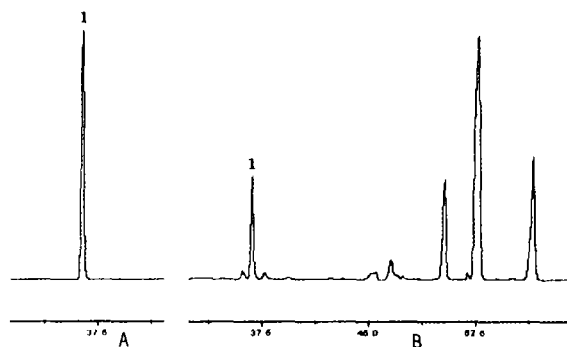


图 1 对照品(A)及黄芪药材(B)的 HPLC-ELSD 色谱图
1-黄芪甲苷

表 1 黄芪药材中黄芪甲苷含量的测定结果 ($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg/g}$)

批号	黄芪甲苷
H2003042903	0.9970 \pm 0.0148
H2003042904	1.200 \pm 0.0140
H2002080501	2.831 \pm 0.0142
H2003043008	1.670 \pm 0.0215
H2003070802	1.438 \pm 0.0140
H2003092201	2.647 \pm 0.0104
H2002070901	1.756 \pm 0.0243
H2003112801	1.425 \pm 0.0087
H2003043001	1.625 \pm 0.0095
H2003052001	0.7120 \pm 0.0093

4 讨论

4.1 在“2.1”项的色谱条件下,以对照品溶液进样,根据色谱参数计算系统适应性。黄芪甲苷的理论塔板数为 214 798;分离度为 1.858;拖尾因子为 1.011。

4.2 为了获得最高灵敏度,需要调节 ELSD 的检测器的载气压力和漂移管温度这 2 个最重要的参数。通过实验可以发现,在 1.0mL/min 的流速条件下,设定 3.5Bar 的载气压力和 40℃ 的漂移管温度可以获得最大的检测灵敏度。当载气压力较低时,会因喷出的雾滴不均匀产生色谱峰顶端尖刺的现象;而流速过高,则会因为雾滴的粒度过小,使灵敏度降低。当温度漂移管过低时,流动相的蒸发会不完全,直接由蒸发管流出,导致检测信号较低;温度过高,则会使形成的微粒大小不均匀,导致精密度较差。另外,设定增益值为 7,可以使信号的相应较高,且基线的噪音不会对检测产生任何影响。

4.3 直接以峰面积值与样品的浓度计算标准曲线

的线性较差,而将峰面积与样品浓度值分别取自然对数后可得到理想的线性关系,这种现象与 ELSD 的检测机理是一致的。当颗粒与光发生作用时,会有多个类型的散射过程,均与颗粒的大小(D)及波长(λ)有关,其散射光的强度是由不同类型组合而成的,与样品的质量呈现双对数线性关系。

4.4 对未经氨水处理的黄芪药材检测发现其中黄芪甲苷的含量偏低,而经过氨水处理后的药材中黄芪甲苷的含量明显增高,分析其原因主要为,氨水在样品处理中的主要作用是将黄芪醇类皂苷酯氨解为黄芪甲苷,从而明显增加药材中黄芪甲苷的含量³。按照中国药典 2005 年版规定黄芪中黄芪甲苷的含量不得低于 0.040% 的标准,10 批次 GAP 黄芪药材的质量均符合要求

4.5 将氨水与甲醇直接混合提取黄芪药材中黄芪甲苷,具有和药典中采用的先提取再萃取后水解相同的作用,而且简化操作步骤,将样品的处理时间由药典需要的 24h 减少到 4h,且测定结果较高,稳定性较好,能够保证测定结果的准确性,具有样品处理快速,操作简便的优点。

参考文献:

- [1] 中国药典 2005 年版 一部[S]. 2005:212.
- [2] 林琦,陆阳,陈泽乃. 黄芪属植物皂苷类成分研究进展[J]. 国外医药·植物药分册,2002,17(4):143.
- [3] 田南卉,杨国红,方颖,等. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定黄芪和制剂中黄芪甲苷的含量[J]. 药物分析杂志,2000,20(3):199.
- [4] 周春玲,鲁静. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志,2000,25(3):166.

收稿日期:2005-06-12

高效液相色谱法测定阿立哌唑片剂的含量

程颖¹,濮存海²,吴爱兰²,王波²(1. 江苏省药品检验所,江苏南京 210008;2. 南京中山制药厂,江苏南京 210012)

摘要 目的:采用高效液相法测定阿立哌唑片中阿立哌唑的含量。方法:用 Beckman C₁₈ 柱,以磷酸水溶液(0.1mL 磷酸,加水 500mL,加三乙胺调节 pH 至 3.0,摇匀)-乙腈(46:54)为流动相,用紫外检测器于 254nm 波长处检测。结果:线性范围为 2.088 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 66.816 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9999$)。平均回收率为 99.39%。结论:本法具有操作简便,分析快速准确、干扰小等优点。

关键词 高效液相色谱法;阿立哌唑

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2005)05-0297-03

作者简介:程颖(1965-),男,南京市人,研究方向:药物分析。
E-mail:11192@sina.com