

• 技术方法 •

## 高效液相色谱-蒸发光散射检测梯度洗脱法测定黄芪药材中黄芪甲苷的含量

李翔<sup>1</sup>, 朱臻宇<sup>1</sup>, 朱东亮<sup>1</sup>, 柴逸峰<sup>1</sup>, 娄子洋<sup>2\*</sup>

(1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 药学院分析测试中心)

**[摘要]** **目的:** 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)梯度洗脱法测定膜荚黄芪中黄芪甲苷含量。**方法:** 黄芪药材经甲醇-氨水(9:1, V/V)超声提取 60 min, 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(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A 相为乙腈, B 相为水, 梯度洗脱; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μl。蒸发光散射检测器条件: 漂移管温度: 40℃, 载气(空气)压力: 3.5 bar(1 bar=10<sup>5</sup> Pa), 增益值: 7。**结果:** 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。回归方程为  $Y=1.415 X+7.509$ ,  $r=0.999 4$ , 线性范围在 6.930~693.0 μg/ml 之间。方法学考察结果表明, 日内和日间精密度的 RSD 均小于 2.0%, 48 h 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% ( $n=5$ ), 最低检测限为 0.693 0 μg/ml, 加样回收率为 97.05%, RSD=0.17% ( $n=3$ )。膜荚黄芪中黄芪甲苷的含量均符合《中国药典》标准。**结论:** 该方法缩减了黄芪药材的前处理步骤, 测定结果准确, 适用于黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的研究。

**[关键词]** 高效液相色谱-蒸发光散射检测; 黄芪; 黄芪甲苷

**[中图分类号]** 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0331-03

### High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection method for determination of astragaloside IV in *Radix astragali*

LI Xiang<sup>1</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>1</sup>, ZHU Dong-liang<sup>1</sup>, CHAI Yi-feng<sup>1</sup>, LOU Zi-yang<sup>2\*</sup> (1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Testing Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To determine the content of astragaloside IV in *Radix astragali* by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection (HPLC-ELSD). **Methods:** *Radix astragali* was extracted with MeOH-NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (9:1) for 60 min. The experimental condition was confirmed and the validation of the method was also tested. The chromatography condition was as follows: Hypersil ODS 2 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm); mobile phase was A: ACN, B: H<sub>2</sub>O, gradient elution; flow speed was 1.0 ml/min; temperature of column was room temperature; and the injection volume was 20 μl. The ELSD conditions were as follows: the temperature of drift tube was 40℃, the gas pressure was 3.5 bar (1 bar=10<sup>5</sup> Pa), and the value of gain was 7. **Results:** The theoretical plate number of astragaloside IV was 214 798, the resolution was 1.858 and the tailing factor was 1.011. The calibration curves were linear in the range of 6.930-693.0 μg·ml<sup>-1</sup>,  $Y=1.415 X+7.509$ ,  $r=0.999 4$ . The intra-day and inter-day precision (RSD) were all less than 2.0%. The stability (RSD) was 1.24% in 48 h and the recurrence (RSD) was 1.26% ( $n=5$ ). The limit of detection was 0.693 0 μg·ml<sup>-1</sup> and the recovery was 97.05% (RSD=0.17%,  $n=3$ ) for astragaloside IV. The contents of astragaloside IV in 10 different batch of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. were consistent to the standard of *Chinese Pharmacopoeia*. **Conclusion:** HPLC-ELSD can shorten the process and time of *Radix astragali* pretreatment. It is a simple and reliable method to determine the content of astragaloside IV in *Radix astragali*.

**[KEY WORDS]** high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection; *Radix astragali*; astragaloside IV

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 331-333]

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。

《中国药典》(2005 版) 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD) 等度洗脱测定黄芪中黄芪甲苷的含量, 样

**[基金项目]** 上海市科委科研项目(02419125, 2403DZ19548)。Supported by Project of Shanghai Science and Technology Committee (02419125, 2403DZ19548)。

**[作者简介]** 李翔, 硕士, 药师。

\* Corresponding author. E-mail: louziyang@126.com

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<sup>[3,4]</sup>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 材料和方法

1.1 仪器和试剂 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。黄芪甲苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号:0781-9807,纯度≥99.6%);10 批次黄芪药材由上海华宇药业有限公司提供,并由本院生药学教研室陈万生副教授鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根;甲醇和乙腈为色谱纯;水为重蒸水。

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

1.3 色谱条件 色谱柱:依利特 Hypersil ODS 2 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);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%(0~5 min),5%~30%(5~18 min,线性),30%~40%(18~40 min,线性),40%~85%(40~42 min,线性),85%~95%(42~60 min,线性);流速:1.0 ml/min;柱温:室温;进样量:20 μl。蒸发光散射检测器条件:漂移管温度:40℃,载气(空气)压力:3.5 bar(1 bar=10<sup>5</sup> Pa),增益值:7。

1.4 线性关系考察 将不同浓度的对照品溶液依次进样,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。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度试验 以 6.930、69.30、693.0 μg/ml 的黄芪甲苷对照品溶液,在 1 d 之内连续进样 5 次,以及连续 5 d 分别进样,根据所得峰面积分别计算日内精密度和日间精密度。

1.5.2 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 和 48 h 测定黄芪甲苷的峰面积,考察稳定性。

1.5.3 重复性试验 精密称取同一批次黄芪药材样品 5 份,各约 1.0 g,分别按 1.6 项下条件制成样品溶液,进样分析。

1.5.4 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。

1.5.5 加样回收率试验 精密称取已知黄芪甲苷含量分别

为 0.997 0 mg/g 的黄芪药材粗粉 3 份,各约 1.0 g,分别精密加入 693.0 μg/ml 黄芪甲苷对照品溶液 1.1、1.4、1.7 ml,分别按 1.6 项下条件制成样品溶液,每份测定 3 次,计算加样回收率。

1.6 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 1.0 g(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 90 ml,氨水 10 ml,密塞,超声处理 60 min,滤过,滤渣用甲醇洗涤 3 次,每次 20 ml,合并滤液减压回收至干,残渣用适量甲醇溶解,转移至 5 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得,置于 4℃ 冰箱保存。

2 结果

在“1.3”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。黄芪甲苷的回归方程为  $Y=1.415 X+7.509, r=0.999 4$ ,在 6.930~693.0 μg/ml 之间的线性关系良好。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。黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.24%。结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定。黄芪药材中黄芪甲苷的平均含量为 0.995 2 mg/g,RSD = 1.26%(n=5),表明方法的重复性良好。黄芪甲苷的最低检测限为 0.693 0 μg/ml。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。10 批次黄芪药材中黄芪甲苷的含量为 0.712 0~2.831 mg/g。

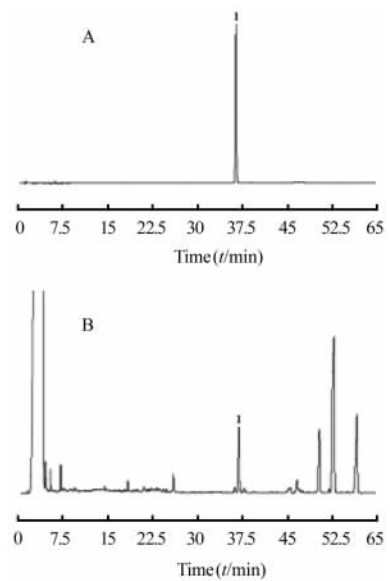


图 1 对照品及黄芪药材的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms of reference substances and *Radix astragali*

1: Astragaloside IV; A: Standard; B: Sample

### 3 讨论

通过调节蒸发光散射检测器的载气压力和漂移管温度可以使检测器达到最高灵敏度。通过实验发现,在 1.0 ml/min 的流速条件下,设定 3.5 bar 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。当漂移管温度过低时,流动相的蒸发不完全,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,可以使信号响应增高,且基线的噪音不会对检测产生任何影响。

直接以峰面积值对样品浓度计算标准曲线时,得到线性结果较差,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,这种现象与蒸发光散射检测器的检测机制一致。当颗粒与光发生作用时会有多个类型的散射过程,均与颗粒的大小及波长有关,其散射光的强度是由不同程度类型组合而成,与样品的质量呈现双对数线性关系。

采用梯度洗脱的方法测定黄芪甲苷较等度洗脱具有更好的柱效,避免色谱峰的展宽,有利于获取峰形较好的色谱峰,保证测定结果的准确性。

对未经氨水处理的黄芪药材检测中发现黄芪甲苷的含

量偏低,而经过氨水处理后的药材黄芪甲苷的含量明显增高。分析其原因主要为,用氨水处理样品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<sup>[3]</sup>。按照《中国药典》(2005 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。

将氨水与甲醇直接混合提取黄芪药材中的黄芪甲苷,具有和《中国药典》采用的先提取再萃取后水解的作用相同,而且操作简单,样品的处理时间由 24 h 减少到 4 h,且测定结果更加准确,稳定性较好。

### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:212-213.
- [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,2002,17:143-146.
- [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,2000,20:199-120.
- [4] 周春玲,鲁静. 高效液相色谱-蒸发光散射检测测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志,2000,25:166-168.

[收稿日期] 2005-10-10

[修回日期] 2006-01-10

[本文编辑] 尹茶

### 17beta-estradiol attenuates alpha, beta-meATP-induced currents in rat dorsal root ganglion neurons

Ma B, Rong W, Dunn PM, Burnstock G (Department of Physiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] The effects of 17beta-estradiol on the alpha, beta-me ATP-induced currents were studied on dorsal root ganglion (DRG) neurons using whole-cell recording technique. Three types of currents (transient, sustained or biphasic) were evoked by alpha, beta-me ATP in acutely dissociated DRG neurons. When neurons were pre-incubated with 17beta-estradiol (10-1000 nM) for 4 min, an inhibition of the transient current and the transient component of the biphasic current was observed. In contrast, 17beta-estradiol did not have any significant effect on the sustained current evoked by alpha, beta-meATP. The inhibitory effects were concentration-dependent, reversible and could be blocked by the estradiol receptor inhibitor, ICI 182,780 (1 microM). However, bovine serum albumin-conjugated 17beta-estradiol (17beta-estradiol-BSA, 10 nM) failed to mimic the effects of 17beta-estradiol. 17alpha-estradiol, the inactive isoform, did not have significant effects on alphabeta-meATP-induced currents, either. Sustained currents induced by ATP (100 microM) in nodose ganglion (NG), superior cervical ganglion (SCG) and otic ganglion (OTG) neurons were not affected by 17beta-estradiol. These results suggest that the female gonadal hormone, 17beta-estradiol, might participate in control of pain by modulating P2X3 receptor-mediated events in sensory neurons.

[Life Sci, 2005,76: 2547-2558]