

高效液相色谱法测定黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量

纪松岗¹,李 翔²,娄子洋³,朱臻宇²,柴逸峰^{2*}
(1.解放军第401医院药剂科,青岛 266071;2.第二军医大学药学院药物分析学教研室,上海 200433;3.药学院分析测试中心,上海 200433)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法测定膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量。方法:依利特 Hypersil ODS 2 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:A 相为乙腈-甲醇(体积分数 9:1),B 相为水,梯度洗脱;流速:1.0 ml/min;检测波长:260 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。黄芪药材以甲醇超声提取 2 次,每次 20 min。结果:毛蕊异黄酮苷和芒柄花素色谱峰的理论塔板数分别为 50 134 和 25 258。回归方程分别为 $Y=58\,924\,X-12\,352$, $r=0.999\,9$ 和 $Y=9\,237\,X-124\,447$, $r=0.999\,9$,线性范围分别为 2.022~101.1 μg/ml 和 38.04~1 522 μg/ml。方法学考察结果表明,毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的日内和日间 RSD 均<2.0%,最低检测限分别为 0.202 2 μg/ml 和 1.522 μg/ml,加样回收率结果分别为 98.34%,RSD=1.33%($n=3$)和 98.84%,RSD=0.12%($n=3$)。测定了 10 批次黄芪药材的毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量。结论:该方法稳定简便,结果可靠,能够用于黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素含量测定的研究。
[关键词] 色谱法,高效液相;黄芪;毛蕊异黄酮苷;芒柄花素
[中图分类号] R 284.2 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0081-04

High performance liquid chromatography in determination of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in *Radix astragali*

Ji Song-gang¹,Li Xiang²,LOU Zi-yang³,ZHU Zhen-yu²,CHAI Yi-feng^{2*} (1. Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Shanghai 200433)
[ABSTRACT] Objective: To determine the contents of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. by high performance liquid chromatography (HPLC). Methods: The HPLC condition was as follows: column: Hypersil ODS 2 column (4.6 mm×250 mm,5 μm); mobile phase: A was ACN-MeOH (9:1,V/V), B was H₂O, with gradient elution; flow speed: 1.0 ml/min; detection: 260 nm; temperature of column: room temperature; injection volume: 20 μl. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. was extracted with methanol solution twice, each time 20 min. Results: The theoretical plate numbers of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin were 50 134 and 25 258, respectively. The calibration curves were linear within the range of (2.022-101.1) μg/ml for calycosin-7-O-β-D-glucoside and (38.04-1522) μg/ml for formononetin, with their regression function being $Y=58\,924X-12\,352$, $r=0.999\,9$ and $Y=9\,237X-124\,447$, $r=0.999\,9$, respectively. The intra-day and inter-day precisions (RSD) at low, middle and high injection volume were all less than 2.0%. The limits of detection were 0.202 2 mg/ml for calycosin-7-O-β-D-glucoside and 1.522 mg/ml for formononetin. The recovery rates were 98.34% (RSD=1.33%, $n=3$) for calycosin-7-O-β-D-glucoside and 98.84% (RSD=0.12%, $n=3$) for formononetin. The contents of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in 10 different batch of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. were determined. Conclusion: HPLC is a simple and reliable method for determining the contents of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.
[KEY WORDS] chromatography,high pressure liquid;*Astragalus membranaceus*;calycosin-7-O-β-D-glucoside;formononetin
[Acad J Sec Mil Med Univ,2006,27(1):81-84]

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^[1]。黄芪中的主要有效成分为皂苷和黄酮类化合物,研究证实黄芪中的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 NO 浓度,保护缺血再灌注损伤等多种药理活

性^[2]。黄芪中黄酮类化合物主要由异黄酮和异黄酮
[基金项目] 上海市科委科技攻关项目(02419125);上海市科委重大项目(2403DZ19548)。Supported by Grants for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(02419125) and Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (2403DZ19548)。
[作者简介] 纪松岗,博士,副主任药师。
* Corresponding author. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

苷成分组成,二者的药理作用相近,但极性差别较大,尚未见同时测定这 2 种成分的文献报道。

目前,黄芪中黄酮类成分的含量测定方法主要有分光光度法^[3]、薄层扫描法^[4,5]和高效液相色谱法^[6~8]等。其中,分光光度法和薄层扫描法因方法重现性差和测定结果不准确等缺点,已经逐渐被高效液相色谱法取代。高效液相色谱法测定紫外吸收较好的黄酮类成分时,具有灵敏度好、杂质干扰少和检测限低等优点。因为含量和极性差异较大,采用等度洗脱的方法不能同时测定黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量。宋纯清等^[6]只测定了黄芪中毛蕊异黄酮苷及其他黄酮类成分,杂质干扰较多,导致含量测定的准确性较差。郑志仁等^[8]也分别以 2 个等度洗脱方法测定黄芪中芒柄花素和其他成分,色谱图基线较高,且待测组分的色谱峰与其他色谱峰无法有效分离,直接影响测定结果的准确性。本实验首次采用梯度洗脱的方法同时测定黄芪中极性差异较大的异黄酮和异黄酮苷的含量,能更有效分离待测组分与杂质,具有简便、快速、准确、有效等优点。

1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪:515 型 HPLC 双泵,996 型二极管阵列检测器,Rheodyne 7725i 进样器,Waters Millennium³²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 型旋转蒸发器。毛蕊异黄酮苷和芒柄花素对照品购自上海中医药大学中药标准化研究中心(经 HPLC 面积归一化法检测,纯度>99.3%);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 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮苷对照品 10.11 mg 和芒柄花素对照品 9.510 mg,分别置 100 ml 和 5 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取上述毛蕊异黄酮对照品溶液 0.8、0.6、0.4、0.2、0.02 ml 及芒柄花素对照品溶液 0.8、0.6、0.4、0.2、0.08、0.02 ml,分别置 1 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得浓度为 80.88、60.66、40.44、20.22、2.022 μg/ml 的毛蕊异黄酮对照品溶液和浓度为 1 522、1 141、760.8、380.4、152.2、38.04 μg/ml 的芒柄花素对照品溶液,置于 4℃ 冰箱保存。

2.2 黄芪药材样品溶液的制备 精密称取黄芪药

材粗粉约 2.0 g(过 40 目筛,60℃ 干燥至恒重),置具塞锥形瓶中,加甲醇 100 ml,超声处理 20 min,滤过,再重复处理 1 次,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。

2.3 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-甲醇(体积分数 9:1),B 相为水,梯度洗脱。A 相含量随时间的变化:5%(0~5 min),5%~20%(5~8 min,线性),20%(8~15 min),20%~30%(15~18 min,线性),30%~45%(18~35 min,线性),45%~80%(35~38 min,线性),80%(38~45 min);流速:1.0 ml/min;检测波长:260 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。以对照品溶液进样,根据毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的色谱参数计算系统适应性,其理论塔板数分别为 50 134 和 25 258;分离度分别为 11.10 和 12.46;拖尾因子分别为 0.99 和 1.02。对照品和样品的色谱图见图 1。

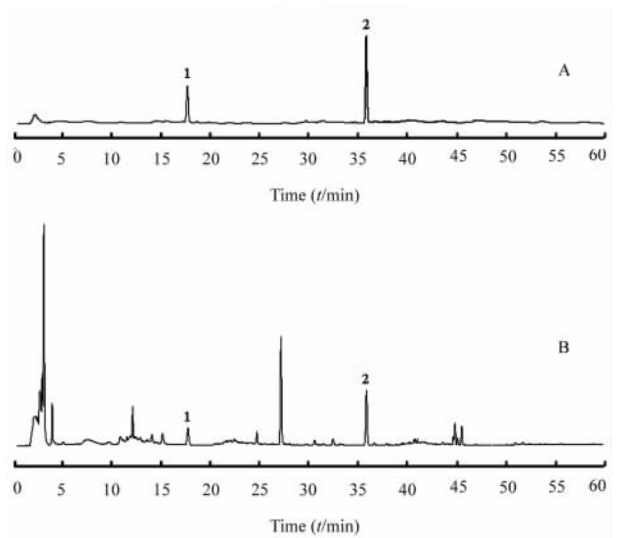


图 1 对照品(A)及黄芪药材(B,批次为 H2003042903)的 HPLC/DAD 色谱图
Fig 1 HPLC/DAD chromatograms of reference substance(A) and Radix astragali (B, batch H2003042903)
1: Calycosin-7-O-β-D-glucoside; 2: Formononetin

2.4 线性关系考察 分别将不同浓度的 2 种对照品溶液依次连续进样,分别重复 3 次,以对照品溶液的浓度(X, μg/ml)对峰面积(Y)进行线性回归。毛蕊异黄酮苷的回归方程为 Y=58 924 X-12 352, r=0.999 9,在 2.022~101.1 μg/ml 之间的线性关系良好;芒柄花素的回归方程为 Y=9 237 X-

124 447, $r=0.999\ 9$,在 38.04~152 2 $\mu\text{g/ml}$ 之间的线性关系良好。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 以 20.22、40.44、101.1 $\mu\text{g/ml}$ 的毛蕊异黄酮苷对照品溶液和 38.04、760.8、1 522 $\mu\text{g/ml}$ 的芒柄花素对照品溶液,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考察日内精密度和日间精密度。毛蕊异黄酮苷对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 1.75%、1.15%、0.29%和 1.89%、1.38%、0.35%;芒柄花素对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 1.88%、0.75%、0.71%和 1.37%、0.84%、0.44%,表明方法的精密度良好。

2.5.2 检测限考察 将毛蕊异黄酮苷和芒柄花素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。毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的最低检测限分别为 0.202 2 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.522 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5.3 稳定性试验 取制备的黄芪药材样品溶液,分别在 0、3、6、12、18、24、36 和 48 h 测定毛蕊异黄

酮苷和芒柄花素的峰面积,考察稳定性。毛蕊异黄酮苷和芒柄花素峰面积 RSD 分别为 0.47% 和 0.44%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一批次黄芪药材样品 5 份,各约 2.0 g,分别制成样品溶液,进样分析。黄芪药材中毛蕊异黄酮苷平均含量为 0.044 7 mg/g,RSD = 1.08%($n=5$);芒柄花素平均含量为 0.798 4 mg/g,RSD = 0.40%($n=5$),表明方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取毛蕊异黄酮苷和芒柄花素含量分别为 0.044 5 mg/g 和 0.800 3 mg/g 的黄芪药材粗粉 3 份,各约 2.0 g,分别精密加入 101.1 $\mu\text{g/ml}$ 毛蕊异黄酮苷对照品溶液和 1 902 $\mu\text{g/ml}$ 芒柄花素对照品溶液 0.70 和 0.60、0.90 和 0.80、1.0 和 1.0 ml,制成样品溶液,每份测定 3 次,计算加样回收率。黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的加样回收率结果分别为 98.34%,RSD = 1.33%($n=3$)和 98.84%,RSD=0.12%($n=3$)。

2.6 样品测定 对 10 批次黄芪药材样品溶液按 1.3 色谱条件进样分析,计算样品含量,结果见表 1。

表 1 黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素含量的测定
Tab 1 Determination results of calycosin-7-O- β -D-glucoside and formononetin

($n=3,\bar{x}\pm s,\text{mg/g}$)

Batch	Source	Harvest time	Grade	Calycosin-7-O- β -D-glucoside	Formononetin
H2003042903	Gansu Lixian	2002-04	3	0.044 5 $\pm$ 0.000 2	0.800 $\pm$ 0.003
H2003042904	Gansu Lixian	2002-04	2	0.070 5 $\pm$ 0.000 4	2.943 $\pm$ 0.021
H2002080501	Gansu Longxi	2001-08	3	0.091 2 $\pm$ 0.000 4	1.226 $\pm$ 0.013
H2003043008	Gansu Longxi	2002-04	3	0.162 8 $\pm$ 0.001 8	1.345 $\pm$ 0.008
H2003070802	Gansu Longxi	2002-07	3	0.128 9 $\pm$ 0.000 5	3.368 $\pm$ 0.012
H2003092201	Gansu Longxi	2002-09	3	0.140 6 $\pm$ 0.001 1	1.687 $\pm$ 0.010
H2002070901	Gansu Jinchang	2001-07	3	0.170 6 $\pm$ 0.001 8	0.592 $\pm$ 0.004
H2003112801	Gansu Lanzhou	2002-11	3	0.231 0 $\pm$ 0.000 9	1.258 $\pm$ 0.011
H2003043001	Inner Mongolia Baotou	2002-04	2	0.040 4 $\pm$ 0.000 6	1.657 $\pm$ 0.009
H2003052001	Inner Mongolia Hohhot	2002-05	2	0.103 1 $\pm$ 0.001 1	2.209 $\pm$ 0.006

3 讨 论

毛蕊异黄酮苷和芒柄花素在化学结构中的差异为 3'-OH 和 7-D-glucoside,由于这些极性基团的存在,使毛蕊异黄酮苷的极性明显增加,无法采用等度洗脱方法同时进行二者的含量测定。文献^[6,8]报道的方法也只能通过不同的等度洗脱方法分别测定毛蕊异黄酮苷和芒柄花素,无法有效分离待测组分与杂质,直接影响测定结果的准确性。本实验首次建立同时测定黄芪中极性差异较大的异黄酮和异黄酮苷类成分含量的梯度洗脱方法,可以体现不同极性

成分在黄芪药材质量评价中的作用、减少杂质的干扰,有效保证测定方法的稳定、重现及结果的准确、可靠。

10 批次黄芪药材之间因为存在种植地、采收季节、储存时间、药材等级等诸多差异,使毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量差别较大,但是其规律性和道地性较差。分析其原因认为,随着黄芪药材 GAP 种植的普及,影响药材生长的土壤、水分、光照等因素趋于一致,使药材中有效成分的含量稳定于某一范围。如果可以系统分析土壤、水分、光照等因素对有效成分含量的影响,确定黄芪药材最佳生长条件,将

有利于 GAP 药材的种植和管理,提高 GAP 药材的整体质量,促进药材 GAP 技术的快速发展。

不同批次药材中同一化学成分的含量高低是服从或近似服从正态分布的,所以尝试根据已知的 GAP 黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量测定结果初步确定其 95% 的参考值范围,期待可以为确定药材的有效成分含量标准提供思路。二者的平均含量分别为 (0.1184 ± 0.0604) mg/g 和 (1.708 ± 0.893) mg/g,故含量下限分别为:

在此标准下,全部 10 批次 GAP 黄芪药材均达到要求,但因确定 95% 参考值范围采用的 GAP 黄芪药材的样品量较少,无法涉及到影响药材含量变化的诸多因素,只有在大样本量研究的基础上,才能够保证其统计学意义。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工

业出版社,2005. 212-213.

[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,2002,24:623-626.

[3] 王智华,胡培莉,王海涛,等. 几种黄芪属植物中生物活性成分的比较研究:Ⅱ. 黄芪总黄酮的含量测定[J]. 药物分析杂志,1995,15 (增刊):311-312.

[4] 马英丽,赵怀清,王学娅,等. 不同产地黄芪的系统聚类分析[J]. 中医药学报,2003,31:20-21.

[5] 田振坤,马英丽,孟 锐,等. 双波长薄层扫描法测定黄芪茎叶中黄酮甙的含量[J]. 沈阳药学院学报,1993,10:24-26.

[6] 宋纯清,阎 龙,王海燕,等. 反相高效液相色谱法测定黄芪和黄芪毛状根中大极性异黄酮成分的含量[J]. 天然产物研究与开发,1999,11:12-17.

[7] 胡芳弟,封士兰,赵健雄,等. HPLC 法测定黄芪中黄酮类成分和黄芪甲苷的含量[J]. 分析测试技术与仪器,2003,9:173-177.

[8] 郑志仁,宋纯清,刘 涤,等. 膜荚黄芪毛状根中异黄酮成分的反相高效液相色谱分析[J]. 药学报,1998,33:148-151.

[收稿日期] 2005-08-07 [修回日期] 2005-10-24

[本文编辑] 孙 岩

我校 6 项课题获第六届“上海市临床医疗成果奖”

为鼓励临床一线科研创新精神,努力营造良好的学术氛围,充分调动临床第一线医务人员的积极性和创造性,上海市卫生局开展了第六届“上海市临床医疗成果奖”评审工作,共评选出获奖项目 25 项,我校共有 6 项课题获奖,名单如下:

一等奖

严重上颈椎不稳的手术治疗(长征医院骨科 倪 斌,贾连顺)

二等奖

喉返神经探查减压及神经修复治疗(长海医院耳鼻喉科 郑宏良,陈世彩)

肝静脉阻断技术在高难度肝肿瘤切除术中的应用(东方肝胆外科医院肝外三科 周伟平,李爱军)

三等奖

异基因外周血造血干细胞移植治疗白血病的临床研究(长海医院血液科 王健民,章卫平)

胸腹心包腔积液检验方法改进及细胞形态学诊断应用(长海医院实验诊断科 周道银,项耀钧)

下睑成形新理念与新技术的临床应用(长海医院整形外科 邢 新,李军辉)