

RP-HPLC法同时测定黄芪药材中 6个黄酮类成分的含量

程海燕, 陈晓辉, 李清, 谭晓杰, 王鹏, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: RP-HPLC法同时测定黄芪药材中 6个黄酮类成分的含量。方法: 采用 Diamonsil C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长为 210 nm 和 250 nm, 柱温 35℃。结果: 芒柄花素在 3.31~33.12 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$)、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷在 2.52~25.20 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$)、毛蕊异黄酮在 6.64~66.40 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$)、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷在 10.80~108.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$)、(6aR, 11aR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷在 2.42~24.16 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$) 和 2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷在 2.79~27.90 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$) 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系 ($n=6$)。6种成分的加样回收率均高于 95.0%, RSD 小于 2.9%。结论: 方法简便、快速、准确, 重现性好, 为黄芪药材的质量控制提供依据。

关键词: 黄芪; 黄酮; 反相高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1115-04

RP-HPLC simultaneous determination of six flavonoids in Radix Astragali

CHENG Hai-yan, CHEN Xiao-hui, LI Qing, TAN Xiao-jie, WANG Peng, BIKai-shun^{1*}

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for the simultaneous determination of six flavonoids in Radix Astragali. **Methods** The reversed phase HPLC system consisting of a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and a mixture of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid as the mobile phase was adopted with gradient elution. The column temperature was set at 35℃ and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The absorbance was monitored at 210 nm and 250 nm. **Results** The linear response ranges were 3.31–33.12 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$) for formononetin, 2.52–25.20 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$) for formononetin-7-O-β-D-glucoside, 6.64–66.40 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$) for calycosin, 10.80–108.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$) for calycosin-7-O-β-D-glucoside, 2.42–24.16 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$) for 9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside and 2.79–27.90 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$) for 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavane-7-O-β-D-glucoside, respectively ($n=6$). The average recoveries ($n=9$) of six flavonoids were greater than 95.0%, and RSD were less than 2.9%. **Conclusion** The results demonstrated that the method had adequate accuracy and selectivity to measure the concentrations of six flavonoids in Radix Astragali.

Key words Radix Astragali; flavonoids; RP-HPLC; assay

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, 始载于《神农本草经》列为上品^[1], 2005年版《中国药典》收载。黄芪具有补气固表、利尿托毒、排脓和敛疮生肌的功效^[2], 皂苷类和黄酮类为

其主要成分。黄芪总黄酮具有清除超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 或 H₂O₂ 作用, 从而抑制膜脂质过氧化调节机体免疫, 减轻氧化应激损伤, 抗衰老的作用^[3,4]。近年来对黄芪中黄酮类成分含量测定方面的研究多集中在毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷和芒柄花素等^[5-9]。为了全面控制黄芪药材

* 通讯作者 Tel: (024) 23986296; E-mail: bikaishun@yahoo.com

的质量,本研究选择黄芪中含量较大的 6 种黄酮类成分为研究对象,采用反相高效液相色谱同时测定其含量,方法简便、快速、准确,重复性好,并且对测定化合物进行多波长检测,大大提高检测灵敏度,且峰形和分离度较好^[10],为黄芪药材的质量控制提供方法。

1 仪器与试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱仪,SPD-M10Avp 二极管阵列检测器,CLASS-VP 数据处理系统。BP210S 电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

对照品芒柄花素、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、(6αR, 11αR)-9,10-二甲氧基紫檀烷

-3-O-β-D-葡萄糖苷、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷均为自制(经核磁和质谱鉴定,采用峰面积归一化法计算含量,纯度均大于 98.5%);乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,水为二次重蒸水;从不同产地收集 19 批黄芪药材,均经沈阳药科大学孙启时教授鉴定确认为正品。

2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 迪马公司。流动相: A 为乙腈, B 为 0.05% 磷酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~40 min 15% A → 29% A; 40~50 min 29% A → 40% A; 50~60 min 40% A。流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 210, 250 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。对照品和样品色谱图见图 1。

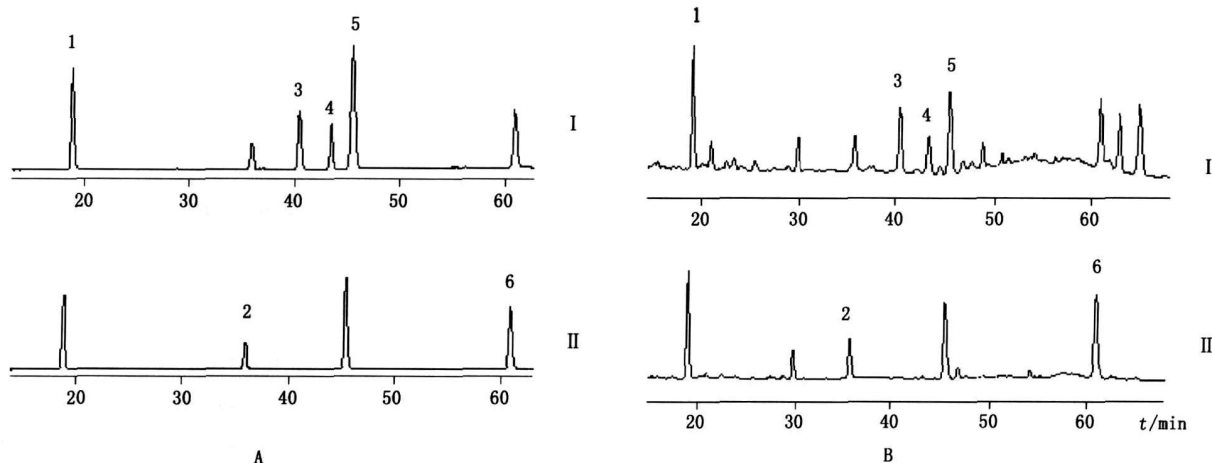


图 1 对照品(A)、样品(B) HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

I. 210 nm II. 250 nm

1 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 (calycosin-7-O-β-D-glucoside) 2 芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷 (formononetin-7-O-β-D-glucoside) 3 (6αR, 11αR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷 (9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside) 4 2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷 (2'-hydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavane-7-O-β-D-glucoside) 5 毛蕊异黄酮 (calycosin) 6 芒柄花素 (formononetin)

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液 分别取 6 种黄酮类化合物对照品适量,精密称定,加甲醇制成含芒柄花素 66.2 μg · mL⁻¹、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷 50.4 μg · mL⁻¹、毛蕊异黄酮 132.8 μg · mL⁻¹、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 216.0 μg · mL⁻¹、(6αR, 11αR)-9,10-二甲氧基紫檀烷 3-O-β-D-葡萄糖苷 48.32 μg · mL⁻¹、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷 55.8 μg · mL⁻¹ 的混合溶液,作为对照品溶液。

3.2 供试品溶液 取黄芪药材粉末(过 80 目筛)约 1 g 精密称定,加入 100 mL 80% 的甲醇-水加热回流提取 1 h 放冷,滤过,残渣加 20 mL 80% 的甲醇

-水洗涤 3 次,减压回收溶剂,残渣加 80% 的甲醇-水使溶解,定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

4 方法学验证

4.1 线性关系的考察 分别精密移取对照品溶液 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。进样 10 μL,在上述色谱条件下进行分析。以各对照品浓度(μg · mL⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得 6 个黄酮类成分芒柄花素、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、(6αR, 11αR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷、2'-羟基-

3', 4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷的回归方程分别为:

$$Y = 6.667 \times 10^4 X - 1.210 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 3.907 \times 10^4 X - 9.197 \times 10^3 \quad r = 0.9992$$

$$Y = 6.164 \times 10^4 X - 3.979 \times 10^4 \quad r = 0.9992$$

$$Y = 2.302 \times 10^4 X - 2.491 \times 10^4 \quad r = 0.9994$$

$$Y = 7.420 \times 10^4 X - 1.474 \times 10^4 \quad r = 0.9993$$

$$Y = 4.891 \times 10^4 X - 1.447 \times 10^4 \quad r = 0.9994$$

结果表明: 6个测定成分分别在 3.31~33.12, 2.52~25.20, 6.64~66.40, 10.80~108.0, 2.42~24.16, 2.79~27.90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系。

4.2 精密度试验 取对照品储备液, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 0.9%, 0.6%, 1.2%, 1.3%, 0.5%。表明仪器的精密度良好。

4.3 重复性试验 取黄芪药材粉末 6 份, 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL , 测得芒柄花素平均含量 177 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.8%; 芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷平均含量为 121 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.9%; 毛蕊异黄酮平均含量 183 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.6%; 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷平均含量为 493 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.2%; (6aR, 11aR)-9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷平均含量为 98.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.2%; 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷平均含量为 114 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 3.0%。表明该方法的重复性良好。

4.4 稳定性试验 取黄芪供试品溶液, 于室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 含量的 RSD 分别为 1.8%, 1.7%, 1.6%, 1.8%, 2.4%, 3.0%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.5 回收率试验 精密称取含量已知的黄芪样品约 0.5 g 9 份, 3 份为 1 组, 按高、中、低浓度分别精密加入对照品溶液 1.5, 1.0, 0.5 mL, 按“3.2”项下方法, 制成高、中、低 3 个浓度的溶液。在上述色谱条件下, 进样 10 μL , 计算平均回收率。结果芒柄花素平均回收率为 98.9%, RSD 为 2.4%; 芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷平均回收率为 97.7%, RSD 为 2.3%; 毛蕊异黄酮平均回收率为 97.2%, RSD 为 1.8%; 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷平均回收率为 98.1%, RSD 为 2.1%; (6aR, 11aR)-9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷平均回收率为 98.7%, RSD 为 1.7%; 2'-羟基-3', 4'-

-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷平均回收率为 95.6%, RSD 为 2.0%。

4.6 样品含量测定 取不同产地黄芪药材, 按“3.2”项下方法操作。在上述色谱条件下测定, 按外标法计算, 即得。结果见表 1。

表 1 不同产地黄芪药材测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab 1 Contents of flavonoids in different *Radix Astragalus* samples

产地 (origins)	1	2	3	4	5	6
宁夏青铜峡 (Qing tongxia Ningxia)	95.1	83.4	177	386	48.0	63.0
河北崇礼 (Chongli Hebei)	118	32.1	276	214	43.7	65.5
内蒙古赤峰 (Chifeng Neimenggu)	115	69.7	212	395	85.2	109
黑龙江萝北 (LuoBei Heilongjiang)	255	193	292	844	176	148
山东烟台 (Yantai Shandong)	82.6	31.7	246	198	71.7	226
河南安阳 (Anyang Henan)	33.4	111	142	563	130	137
内蒙古 ③ (Nei Monggol ③)	104	154	250	826	158	102
内蒙古 ④ (Nei Monggol ④)	63.6	114	159	476	77.3	68.2
内蒙古 ⑤ (Nei Monggol ⑤)	212	81.4	540	437	79.1	112
吉林通化 (Tonghua Jilin)	84.1	41.2	259	186	45.8	127
河北宣化 (Xuanhua Hebei)	90.2	112	228	583	151	161
甘肃白银 (Baiyin Gansu)	68.1	103	170	550	103	95.3
宁夏贺兰 (Helan Ningxia)	117	122	247	434	66.6	91.6
甘肃兰州 (Lanzhou Gansu)	93.6	55.7	227	504	63.0	92.1
辽宁抚顺 (Fushun Liaoning)	96.5	93.9	275	508	122	181
宁夏银川 (Yinchuan Ningxia)	54.8	120	110	543	67.9	99.4
内蒙古包头 (Baotou Neimonggol)	87.1	160	209	867	174	181
山西平遥 (Pingyao Shanxi)	127	120	216	574	122	183
内蒙古 ⑥ (Nei Monggol ⑥)	174	120	184	490	98.9	114

注 (note): 1 芒柄花素 (formononetin) 2 芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷 (formononetin-7-O-β-D-glucoside) 3 毛蕊异黄酮 (calycosin) 4 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 (calycosin-7-O-β-D-glucoside) 5 (6aR, 11aR)-9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷 (9, 10-dimethoxypterocarp-3-O-β-D-glucoside) 6 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷 (2'-hydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavane-7-O-β-D-glucoside)

5 讨论

5.1 本研究对水、乙醇和 20%, 40%, 60%, 80% 不同浓度的甲醇水溶液进行考察, 结果表明 80% 甲醇水提取效率最高。又以 80% 甲醇水作为提取溶剂, 比较了回流提取、浸渍、超声 3 种提取方法, 结果表明回流提取效率最高。在此基础上, 考察了回流提取的次数和提取时间对实验结果的影响, 结果表明回流提取 1 次 1 h 即可将药材中黄酮类成分提取完全。

5.2 本实验采用二极管阵列检测器对所测化合物进行多波长检测。芒柄花素、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷的最大吸收波长为 250 nm, 毛蕊异

黄酮、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷的最大吸收波长为 219 nm, (6 α R, 11 α R)-9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷最大吸收波长为 207 nm, 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7-O- β -D-葡萄糖苷的最大吸收波长为 203 nm, 综合考虑, 选择 210 nm 作为毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、(6 α R, 11 α R)-9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷和 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7-O- β -D-葡萄糖苷的检测波长, 250 nm 作为芒柄花素和芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷的检测波长。

5.3 19批黄芪药材含量测定结果表明, 毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷含量较大。其中在多数药材中毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷含量最高, 为毛蕊异黄酮含量的 2 倍或 2 倍以上, 高出其他黄酮类成分数倍。本文建议中国药典收载毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷的含量测定, 含量限度定为不低于 $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

参考文献

- 1 国家中医药管理局《中华本草》编委会. Chinese Materia Medica (中华本草). Vol 4(第 4 卷). Shanghai(上海) Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 1991: 340
- 2 ChP (中国药典). 2005. Vol(一部): 212
- 3 WANG Xue-lian(王雪莲), LIU Li-jun(刘丽君), YAO Dong-qing(姚冬青). Pharmacological action of Huangqi(黄芪的药理新用). *Chin J Pract Chin Med Med* (中华实用中西医杂志), 2002, 2(15): 908
- 4 WU Fa-bao(吴发宝), CHEN Xi-yuan(陈希元). The pharma-

- colgic action overview of Huangqi(黄芪的药理作用综述). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 27(3): 232
- 5 LIX iang(李翔), ZHU Zhen-yu(朱臻宇), WANG Bin(王彬), et al Determination of three constituents in Radix Astragali by HPLC-MS(HPLC-MS测定黄芪药材中 3 种成分的含量). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41(8): 793
 - 6 HU Fang-di(胡芳弟), ZHAO Jian-xiong(赵健雄), FENG Shi-lin(封士兰), et al Studies on chromatography fingerprint of Huangqi by HPLC(黄芪的高效液相色谱指纹图谱及主成分含量测定). *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(11): 831
 - 7 SHI Zi-yi(石子仪), BAO Zhong(鲍忠), TU Peng-fei(屠鹏飞), et al Quantitative analysis of calycosin glycoside and formononetin in Radix Astragali from different source (不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析). *China J Chin Med Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(9): 779
 - 8 TU Ji-hui(涂继辉), JIA Ling-yun(贾凌云), SUN Qi-shi(孙启时). Isolation and determination of the content of calycosin in Astragalus membranaceus (蒙古黄芪中毛蕊异黄酮的分离及含量测定). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2006, 23(11): 710
 - 9 WANG Xiao-hui(王晓辉), LU Tao(刘涛), LI Qing(李清), et al Simultaneous determination of five isoflavonoids in commercial Radix Astragali by high performance liquid chromatography (高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分). *Chin J Chromatogr* (色谱), 2006, 24(5): 486
 - 10 ZHENG Zhi-ren(郑志仁), SONG Chun-qing(宋纯清), LIU Di(刘涤), et al Determination of six isoflavonoids in the hairy root cultures of Astragalus membranaceus by HPLC(膜荚黄芪毛状根中异黄酮成分的反相高效液相色谱分析). *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(2): 148

(本文于 2008 年 6 月 25 日收到)