

高效液相色谱测定黄芪中 毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量

贺云彪 黄兰芳^a 胡伟^a 谢建伟^a

(常德市药品检验所 湖南省常德市紫桥二区竹园 415000)

^a(衢州学院化学与制药工程系 浙江省衢州市九华北大道 78 号 324000)

摘 要 利用化学计量学分辨方法和高效液相色谱法建立了黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的定量分析方法。色谱柱为 Hypersil ODS 柱(4 mm × 250mm, 5 μ m), 流动相 A: 水含 0.2% (V/V) 醋酸, B: 乙腈含 0.2% (V/V) 醋酸, 线性梯度洗脱。借直观推导式演进特征投影(HEL P)法分辨 HPLC-DAD 产生的二维数据得毛蕊异黄酮和芒柄花素的纯光谱和纯色谱, 用总体积分法定量分析其含量。毛蕊异黄酮和芒柄花素的校准曲线和相关系数分别为 $y = 166.72x + 127.8$ ($r = 0.9997$) 和 $y = 178.39x + 187.2$ ($r = 0.9993$), 线性范围分别为 1.0—116.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.2—112.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加标回收率分别在 96.5%—98.7% 和 96.8%—98.5% 之间。方法灵敏、选择性和可靠性好, 可用于测定黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素含量及质量控制。

关键词 高效液相色谱; 化学计量学; 直观推导式演进特征投影(HEL P); 黄芪; 黄酮

中图分类号: O 657.7² 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2010)04-1541-05

1 引言

黄芪是豆科黄芪属膜荚黄芪或蒙古黄芪的根, 具有重要的生理和药理作用^[1]。黄酮类化合物为黄芪的主要活性成分, 其中毛蕊异黄酮和芒柄花素为 2 个重要的组分, 有抗菌和雌激素作用^[2]。测定黄芪中黄酮类化合物的方法主要有分光光度法^[3]和高效液相色谱法^[4, 5], 但分光光度法测定的是总黄酮, 国外有用液相色谱-质谱法测定异黄酮类化合物的报道^[6], 但液相色谱-质谱仪还未被广泛使用, 故建立简便且可靠的毛蕊异黄酮和芒柄花素的测定方法有一定的理论和实际意义。本文用高效液相色谱-阵列式光电二极管检测器(HPLC-DAD)联用色谱检测, 借直观推导式演进特征投影(HEL P)法^[7-9]解析得到待测组分的纯色谱和光谱曲线, 然后利用总体积分法^[10]定量分析黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量, 结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 包括 G1311A 型二极管阵列检测器, 250mL 索氏提取器(金华市晶玻实验仪器厂); SB 2200 型超声波振荡仪(上海必能信超声有限公司); AB 104-S/A 分析天平(瑞士梅特勒公司, 精度为 0.1mg)。

毛蕊异黄酮和芒柄花素(中国药品生物制品检定所); 毛蕊异黄酮和芒柄花素用甲醇配成

联系人, 电话: (0570) 8026668; E-mail: hfshuang@yahoo.com.cn

作者简介: 黄兰芳(1963—), 男, 湖南省常德市人, 教授, 主要从事中药现代化研究工作。

贺云彪(1963—), 男, 湖南省常德市人, 高级工程师, 主要从事药物分析研究工作。

收稿日期: 2009-11-05; 接受日期: 2009-12-12



$1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液, 工作液 (1.0 和 $20.0\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 用甲醇稀释储备液配制; 黄芪 (长沙老百姓大药房); 色谱纯乙腈 (江苏汉邦科技有限公司); 甲醇、正丁醇、醋酸均为分析纯。实验用水为超纯水。

2.2 提取方法

将黄芪粉末于 60°C 干燥 1h, 过 40 目筛后, 准确称取 2g 样品, 加入乙醚 50mL 超声脱脂 15min 后弃去乙醚液。将药材置索氏提取器中, 加入 200mL 甲醇, 水浴中 (80°C) 提取 3 0h, 过滤并真空干燥后溶解于 25mL 热水中。分别用 10mL 和 5mL 正丁醇萃取 2 次, 合并正丁醇相, 减压蒸发后, 用 10mL 甲醇溶解。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersic ODS 柱 ($4.4\text{mm} \times 250\text{mm}, 5\mu\text{m}$), 流动相为 A: 水 (含 0.2% 醋酸, V/V), B: 乙腈 (含 0.2% 醋酸, V/V); 流速为 $1.0\text{mL}/\text{min}$; 波长扫描范围: 200—400nm; 进样量为 $10\mu\text{L}$; 线性梯度洗脱 (A, %): 0—5min, 75—68; 5—10min, 68—65; 10—20min, 65—40; 20—45min, 40—40。

3 结果与讨论

3.1 重叠峰的解析

将毛蕊异黄酮和芒柄花素混合对照品 (浓度均为 $20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或内蒙黄芪提取液在拟定色谱条件下分析, 毛蕊异黄酮和芒柄花素的保留时间分别为 25.89 和 30.65min (见图 1)。

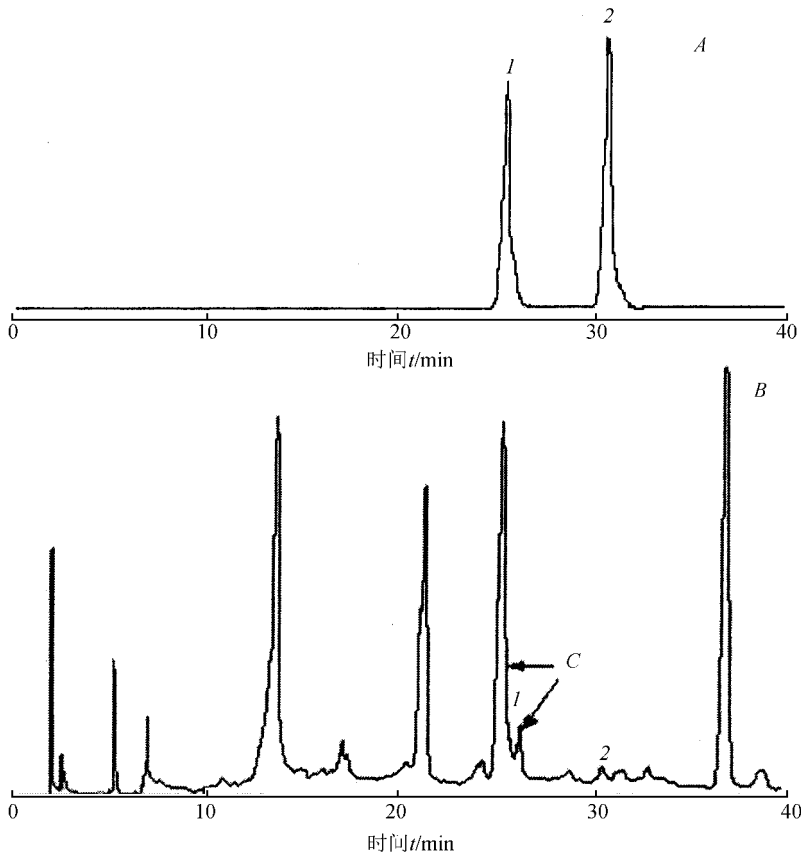


图 1 对照品及黄芪样品在 260nm 处的 HPLC-DAD 色谱图

A —— 对照品; B —— 内蒙古产黄芪样品; 1 —— 毛蕊异黄酮; 2 —— 芒柄花素。

从图 1 知, 虽然优化了色谱条件, 组分仍未达完全分离, 若直接定量分析可靠性差, 然而采用

HELP 法对二维数据进行解析, 可对待测组分准确性定量。以内蒙黄芪 HPLC-DAD 色谱图中 24.80—26.20 min 段(即峰簇 C)为例说明 HELP 的解析过程。

首先, 用主要成分分析法(PCA)^[11]扣除背景和基线漂移, 由秩图^[7]可判断在 24.80—26.20 min 内是一个 a 、 b 和 l 三组分体系(图 2)。从秩图可知色谱流出曲线、峰簇中的组分数、各组分的选择性区域和零组分区域。依据上述信息, 用 HELP 法解析能得到每一组分纯色谱曲线(图 3A)和纯光谱曲线(图 3B)。图 2 中将解析过的组分与标准物对照, 可知组分 1 即为待测组分毛蕊异黄酮。同样可以解析得到待测组分芒柄花素的纯色谱和光谱曲线。

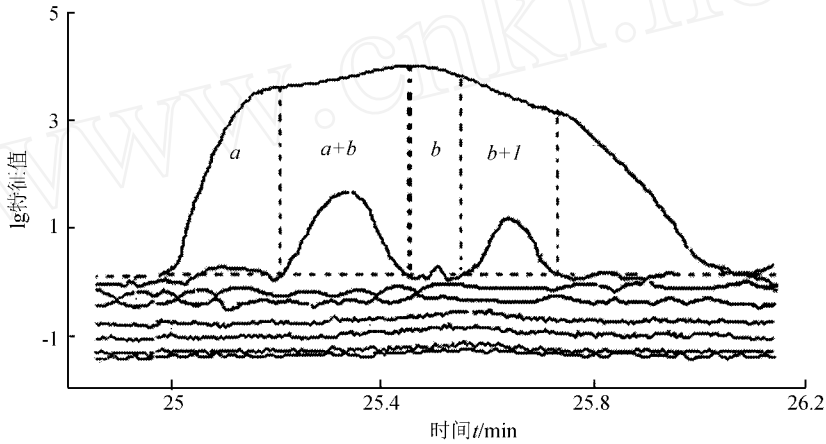


图 2 由 FSMWEFA 获得峰簇 C 的秩图

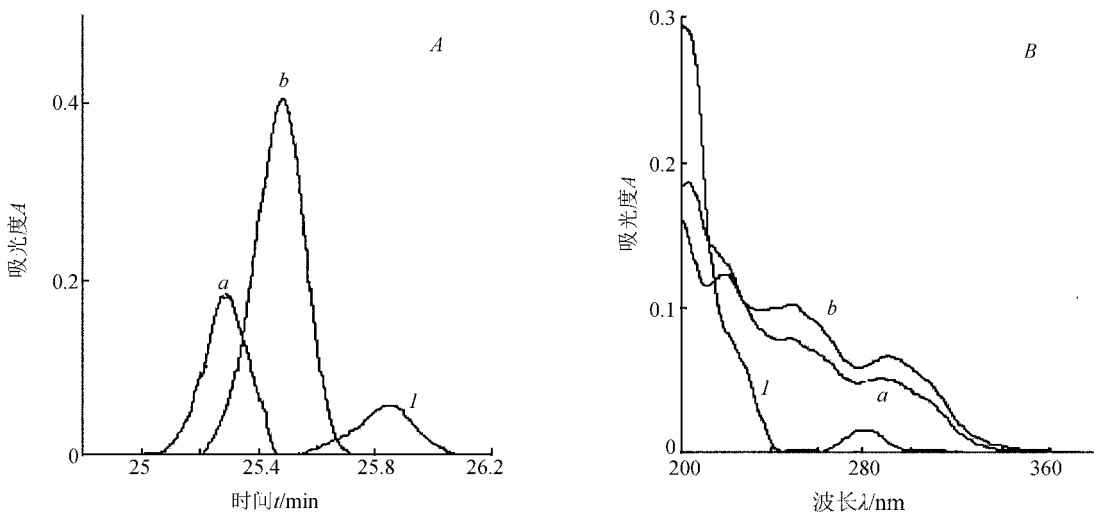


图 3 峰簇 C 解析后的纯色谱曲线(A)和纯光谱曲线(B)

3.2 校准曲线

在常规色谱定量分析时, 色谱峰的高度或面积与相应成分的浓度成正比。与此类似, 总体积分法是基于组分纯色谱和光谱矢量的乘积与组分的浓度成正比, 从而实现对组分的定量检测。总体积分法充分利用了矩阵数据所包含组分纯色谱和光谱信息, 其结果更准确。

每一组分配制 7 个非零标准, 毛蕊异黄酮为 1.0、2.5、20.0、40.0、80.0、100.0、116.5

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 芒柄花素为 1.2, 2.5, 20.0, 40.0, 80.0, 100.0, 112.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按相同色谱条件分析, 经解析得到毛蕊异黄酮和芒柄花素的纯色谱和光谱, 计算总体积 (y), 以总体积对样品溶液的浓度 (x , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作校准曲线, 毛蕊异黄酮和芒柄花素的校准曲线和相关系数分别为 $y = 166.72x + 127.8$ ($r = 0.9997$) 和 $y = 178.39x + 187.2$ ($r = 0.9993$), 其线性范围分别为 1.0—116.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1.2—112.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 重复性试验

取同一产地黄芪, 准确称取样品 5 份, 按样品制备方法平行操作, 结果毛蕊异黄酮和芒柄花素总体积的 RSD 分别为 3.2% 和 3.8%, 说明方法的重复性良好。

3.4 选择性和检出限

由于总体积积分法是基于组分纯色谱和光谱矢量, 故本法有很高的专属性。当信噪比为 3:1 时, 毛蕊异黄酮和芒柄花素的检出限 (LOD) 分别为: 0.3, 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.5 回收率试验

选取含量已知的黄芪样品, 按高、中、低浓度分别加入 80, 120, 240 μg 对照品, 按“2.2”节所述方法制备样品溶液, 制成高、中、低 3 个浓度的供试品溶液, 用上述方法测定内蒙黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量, 每个浓度重复试验 5 次, 计算平均回收率。结果见表 1。

表 1 样品中毛蕊异黄酮和芒柄花素的回收率

组分	原含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	加入量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	加标测定值 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	回收率 (%)	RSD (%, $n=5$)
毛蕊异黄酮	96.2	40.0	134.8	96.5	3.4
		60.0	154.9	97.8	2.9
		120.0	214.6	98.7	1.7
芒柄花素	58.4	40.0	97.3	97.2	3.7
		60.0	117.5	98.5	3.2
		120.0	174.6	96.8	1.9

3.6 样品测定

取不同产地黄芪, 按“2.2”节所述方法制备样品溶液, 用上述方法测定毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量, 结果如表 2。不同产地黄芪中均含这 2 种黄酮, 且含量较高, 但因收集样本较少, 还不能比较不同产地黄芪中这 2 种黄酮成分的差异。

表 2 不同产地黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量 ($n=3$)

产地	毛蕊异黄酮		芒柄花素	
	测定值 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	RSD (%)	测定值 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	RSD (%)
山西应县	71.4	3.9	37.2	4.6
吉林四平	97.2	2.4	57.1	3.2
河北秦皇岛	104.8	2.2	67.2	3.1
内蒙古包头	86.1	3.7	48.5	4.2

4 结论

本文借直观推导式演进特征投影 (HELP) 法等相关化学计量学分辨方法, 提出了用高效液相色谱 (HPLC) 测定黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量的方法, 通过对黄芪中主要黄酮类活性成分的定性和定量分析, 能为进一步研究和开发黄芪提供有利的科学依据。

参考文献

- [1] 季旭明, 王伟庆, 刘琳 黄芪功效研究简述[J]. 山东中医药大学学报, 1998, 22(3): 224—226
- [2] 杨丙平, 郝东方, 苏兰 膜荚黄芪的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(6): 457—460
- [3] 王智华 黄芪中总黄酮的含量测定[J]. 药物分析杂志, 1995, 15(增刊): 311—312
- [4] 王利平, 秦雪梅, 张丽增等 HPLC 法测定 5 年及 6 年生黄芪中黄酮类成分的含量[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2008, 30(1): 85—88
- [5] 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, 55(2): 148—151.
- [6] Xiao H B, Krucker M, Albert K *et al* Determination and Identification of Isoflavonoids in Radix Astragalus by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometric Detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1032(1): 117—124
- [7] 梁逸曾 白灰黑复杂多组分体系及其化学计量学算法[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1996 129—238
- [8] Liang Y Z, Kvalheim O M, Keller H R. Heuristic Evolving Latent Projections: Resolving Two-Way Multicomponent Data [J]. *Anal Chem.*, 1992, 64(5): 946—953
- [9] 沈海林, 梁逸曾, 俞汝勤等 香港大气颗粒中多环芳烃的HELP法解析[J]. 中国科学B 辑, 1997, 27(6): 556—559
- [10] 龚范, 彭源贵, 崔卉等 陈皮挥发油的气相色谱/质谱分析[J]. 分析化学, 2000, 28(7): 860—864
- [11] Guo F Q, Liang Y Z, Xu C J *et al* Determination of the Volatile Chemical Constituents of *Notopterygium Incium* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Iterative or Non-Iterative Chemometrics Resolution Methods [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1016(1): 99—110

Determination of Calycosin and Fommonetin in Radix Astragalus by High Performance Liquid Chromatography

HE Yun-Biao HUANG Lan-Fang^a HU Wei^a XIE Jian-Wei^a

(Changde Institute for Drug Control, Changde, Hunan 415000, P. R. China)

^a(Department of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Quzhou College, Quzhou, Zhejiang 324000, P. R. China)

Abstract A method for the determination of calycosin and fommonetin in radix astragalus was developed with relative chemometrics methods and high performance liquid chromatography. The analytical column was Hypersil ODS column (4 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was water containing 0.2% (V/V) acetic acid (A) and acetonitrile containing 0.2% (V/V) acetic acid (B) with a gradient system. The two-way data of HPLC-DAD hyphenated instrument was resolved with heuristic evolving latent projections (HELP) method and the pure chromatogram and spectra of each component were obtained. Then calycosin and fommonetin were determined with overall volume integration method. The regression equations and coefficients were $y = 166.72x + 127.8$ and 0.9997 for calycosin, $y = 178.39x + 187.2$ and 0.9993 for fommonetin. The linear ranges were 1.0—116 μg · mL⁻¹ and 1.2—112 μg · mL⁻¹ for calycosin and fommonetin, respectively. The standard added recoveries were in the range of 96.5%—98.7% and 96.8%—98.5% for calycosin and fommonetin, respectively. This method is highly sensitive, selective and reliable, and is used for simultaneous determination of calycosin and fommonetin in radix astragalus and the quality control of radix astragalus.

Key words HPLC; Chemometrics; Heuristic Evolving Latent Projections (HELP); Radix Astragalus; Flavonoids