

红车轴草提取物定量测定方法的优化

张 念¹, 周 威², 许汉林², 孔德云¹, 华茉莉^{1*}

1. 上海医药工业研究院, 上海 200040

2. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 优化红车轴草提取物的定量测定方法, 以客观有效地评价提取物的质量。方法 以鹰嘴豆芽素 A、染料木素、刺芒柄花素和大豆苷元 4 种异黄酮苷元作为定量测定的指标成分, 采用 HPLC 法分别测定提取物酸水解前后异黄酮的量。结果 通过系统的研究与优化, 确定的色谱条件为: Capcell pak C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 检测波长 254 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 以乙腈 (含 0.05% TFA) - 水 (含 0.05% TFA) 梯度洗脱; 酸水解条件为: 提取物以 1 mol/L 盐酸甲醇溶液 (每毫克提取物样品加 2.0 mL) 于 85 ℃ 水浴回流 1.5 h, 冷却至室温后定容待测。结论 本方法为红车轴草提取物提供了一种简便快速、有效可靠的定量测定方法。

关键词: 红车轴草; 异黄酮; 鹰嘴豆芽素 A; 染料木素; 刺芒柄花素; 大豆苷元; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)10-1989-05

Optimization of quantitation determination of extract from *Trifolium pratense*

ZHANG Nian¹, ZHOU Wei², XU Han-lin², KONG De-yun¹, HUA Mo-li¹

1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

2. College of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Key words: *Trifolium pratense* L.; isoflavone; biochanin A; genistein; formononetin; daidzein; HPLC

红车轴草 *Trifolium pratense* L. 为豆科多年生草本植物, 又名红三叶草、红花苜蓿^[1], 因植物中含有较为丰富的异黄酮^[2], 其提取物已被全球广泛应用于各种保健品或饮食增补剂中, 用于预防乳腺癌、改善骨质疏松、妇女更年期综合症等^[3-8], 许多国家因此将其纳入法定标准, 美国药典-国家处方集的饮食增补剂分册 (Botanical Official Monographs in USP30-NF25) 就收载红车轴草及其提取物的质量标准。我国目前尚未建立红车轴草相关产品的国家标准, 但每年对欧美市场出口大量的红车轴草提取物, 故外经贸部于 2005 年颁布实施了红车轴草提取物的外贸行业绿色标准。

红车轴草提取物的国内外质量标准, 均采用 HPLC 进行定量测定, 但指标成分及测定方法存在较大差异: 我国外贸行业标准是以刺芒柄花苷 (ononin, 也称芒柄花苷)、印度黄檀苷 (sissotrin)、刺芒柄花素 (formononetin, 又称芒柄花素、鸡豆

黄素 B、鹰嘴豆芽素 B)、鹰嘴豆芽素 A (biochanin A, 又称鸡豆黄素 A、鹰嘴甲素) 为指标成分, 直接测定提取物中各指标成分的量; 美国国家标准则将提取物酸水解, 与法定标准提取物对照后, 以刺芒柄花素为基准物按不同的换算因子分别折算鹰嘴豆芽素 A、染料木素 (genistein)、刺芒柄花素、大豆黄素 (daidzein, 又称大豆苷元、大豆素) 的量。

就化学结构而言, 刺芒柄花苷为刺芒柄花素的单糖苷, 印度黄檀苷为鹰嘴豆芽素 A 的单糖苷, 化学结构式见图 1 与表 1。

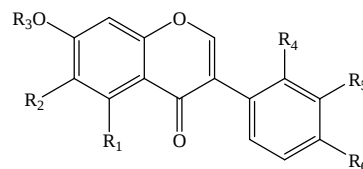


图 1 红车轴草中异黄酮类化合物母核结构

Fig. 1 Nucleus structure of isoflavones in *T. pratense*

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-007); 上海市科学技术委员会“中药现代化专项”基金 (07DZ19712)

作者简介: 张 念 (1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研究与开发。Tel: (021)62479808-730 E-mail: zhangnian.happy@163.com

*通讯作者 华茉莉 Tel: (021)62479808-730 13917410870 E-mail: huamoli@sh163.net

表 1 红车轴草中异黄酮类化合物

Table 1 Isoflavones in *T. pratense*

名 称	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	相对分子质量
大豆黄素	H	H	H	H	H	OH	254
染料木素	OH	H	H	H	H	OH	270
芒柄花素	H	H	H	H	H	OCH ₃	268
鹰嘴豆芽素 A	OH	H	H	H	H	OCH ₃	284
芒柄花苷	H	H	Glc	H	H	OCH ₃	430
印度黄檀苷	OH	H	Glc	H	H	OCH ₃	446

两种定量测定方法在实际应用中均存在一定局限性：我国外贸行业标准，采用刺芒柄花苷、印度黄檀苷作为指标成分，不仅对照品来源相对困难，且这两种成分在植物中的量较低，不能很好地反映提取物的产品质量，另外液相色谱耗时长（约 60 min）；美国国家标准，操作繁琐并需购买标准提取物，且色谱条件的波动对各成分的出峰时间及分离度带来明显影响，不能很好地体现提取物的天然品质。基于以上问题，经研究与优化，本实验建立了一种简便、有效、可靠的红车轴草提取物中异黄酮成分的定量测定方法，以期为其质量控制提供参考。

1 仪器和材料

Waters 1525 高效液相色谱仪、Waters 2487 紫外双波长检测器（美国 Waters 公司）；RUC—5200 超声波清洗机（上海睿祺电子有限公司）。

鹰嘴豆芽素 A 对照品购自中国药品生物制品检定所，染料木素、刺芒柄花素、大豆黄素对照品质量分数分别为 98.25%、98.3%、98.5%，均购自南京泽朗医药科技有限公司；乙腈为色谱纯，水为双蒸水，其他试剂为分析纯。

红车轴草药材：JX0411（产自江西，2004 年夏采收，购于 2004 年 11 月）、JX0901（产自江西，2008 年秋采收，购于 09 年 1 月）、GZ0901（产自贵州，2008 年秋采收，购于 09 年 1 月）经上海医药工业研究院中药研究部吴彤研究员鉴定均为豆科红车轴草 *Trifolium pratense* L. 的干燥全草；提取物的制备：药材粗粉以 15 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次，每次 1.5 h，合并滤液，减压浓缩至干，得浸膏。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Capcell pak C₁₈ 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；检测波长 254 nm，柱温 30 ℃，体积流量 1 mL/min，流动相为含 0.05% 三氟乙酸（TFA）的

乙腈（A）-含 0.05% TFA 的水（B），梯度洗脱程序：0~2 min，25% A；2~7.5 min，25%~40% A；7.5~11 min，40%~62% A；11~13 min，62%~70% A；13~15 min，70%~80% A；15~16 min，80%~100% A；16~20 min，100%~25% A；20~23 min，25% A。流动相及对照品溶液、供试品溶液均经过 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取大豆苷元对照品、染料木素对照品、刺芒柄花素对照品、鹰嘴豆芽素 A 对照品适量，加甲醇制成含大豆苷元 200 μg/mL、染料木素 200 μg/mL、刺芒柄花素 1 mg/mL、鹰嘴豆芽素 A 200 μg/mL 的混合对照品储备液。

2.2.1 对照品溶液 I 的制备 精密吸取对照品储备液 1 mL，加甲醇定容至 10 mL，以此作为样品未酸水解时定量测定用对照品溶液。

2.2.2 对照品溶液 II 的制备 精密吸取标准储备液 1 mL，加入 1 mol/L 盐酸甲醇溶液 5 mL，再加甲醇定容至 10 mL，以此作为样品酸水解后定量测定用对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 供试品溶液 I 的制备 精密称取红车轴草提取物 25 mg，加入甲醇 50 mL 超声 30 min，放冷，转移至 50 mL 量瓶中，并加甲醇至刻度，摇匀，即得未酸水解定量测定用供试品溶液。

2.3.2 供试品溶液 II 的制备 精密称取红车轴草提取物 25 mg，加入 1 mol/L 盐酸甲醇 50 mL，85 ℃ 水浴回流 1.5 h，待冷却至室温后，转移至 50 mL 量瓶中，并加 1 mol/L 盐酸甲醇至刻度，摇匀，即得酸水解后定量测定用供试品溶液。

2.4 线性关系考察

按对照品溶液的制备项下操作，配制 20、2、0.2 μg/mL 各质量浓度对照品溶液，再分别吸取各质量浓度对照品溶液 5、10、20 μL，注入液相色谱仪，以进样量为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，进行回归分析。结果表明，以甲醇为溶剂，大豆苷元在 5.24~524.00 ng（ $Y = 6.53 \times 10^6 X - 7.35 \times 10^3$ ），染料木素在 5.04~504.00 ng（ $Y = 6.85 \times 10^6 X + 2.17 \times 10^4$ ），刺芒柄花素在 22.58~2 258.00 ng（ $Y = 6.03 \times 10^6 X + 3.01 \times 10^4$ ），鹰嘴豆芽素 A 在 4.72~472.00 ng（ $Y = 6.49 \times 10^6 X + 3.31 \times 10^4$ ）进样量与峰面积呈良好线性关系；以 1 mol/L 盐酸甲醇溶液为溶剂，大豆苷元在 6.7~

670.00 ng ($Y=6.27 \times 10^6 X - 1.10 \times 10^4$), 染料木素在 8.87~887.00 ng ($Y=6.22 \times 10^6 X - 8.33 \times 10^3$), 刺芒柄花素在 19.50~1 950.00 ng ($Y=6.41 \times 10^6 X - 5.34 \times 10^3$), 鹰嘴豆芽素 A 在 8.15~815.00 ng ($Y=5.87 \times 10^6 X + 7.22 \times 10^3$) 进样量与峰面积呈良好线性关系; 各相关系数均大于 0.999 9。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液 I (大豆苷元 33.1 $\mu\text{g/mL}$ 、染料木素为 36.8 $\mu\text{g/mL}$ 、刺芒柄花素 91.1 $\mu\text{g/mL}$ 、鹰嘴豆芽素 A 为 35.9 $\mu\text{g/mL}$), 重复进样 6 次, 测定大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的峰面积, 计算得其峰面积的 RSD 分别为 0.85%、1.49%、0.97%、0.85%; 取混合对照品溶液 II (大豆苷元 33.1 $\mu\text{g/mL}$ 、染料木素为 36.8 $\mu\text{g/mL}$ 、刺芒柄花素 91.1 $\mu\text{g/mL}$ 、鹰嘴豆芽素 A 为 35.9 $\mu\text{g/mL}$), 重复进样 6 次, 测定大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的峰面积, 计算得其峰面积的 RSD 分别为 1.86%、1.85%、2.32%、1.88%。

2.6 稳定性试验

取批号 JX0411 的样品制备的供试品溶液 I, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 测定大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的峰面积, 计算得其峰面积的 RSD 分别为 0.74%、1.86%、1.81%、1.95%; 取批号 JX0411 的样品制备的供试品溶液 II, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样, 测定大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的峰面积, 计算得其峰面积的 RSD 分别为 0.52%、1.58%、2.32%、0.82%, 表明供试品溶液 I、II 均在 8 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取批号 JX0411 的样品, 按供试品溶液的制备项下方法, 分别制备 5 份供试品溶液 I 和 5 份供试品溶液 II, 依法测定该样品酸水解前后大豆苷元、

染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的量, 结果显示: 该样品酸水解前各指标成分量的 RSD 分别为 1.15%、1.49%、1.81%、2.05%; 酸水解后各指标成分量的 RSD 分别为 0.89%、2.79%、1.71%、2.27%。

2.8 加样回收率

精密称取批号 JX0411 的提取物样品 18 份, 精密加入各指标成分绝对量 80%、100%、120% 的对照品, 按供试品溶液的制备项下方法, 各加入量下分别平行制备 3 份供试品溶液 I 和 3 份供试品溶液 II, 依法测定大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的量, 计算加样回收率。结果样品酸水解前各指标成分的平均加样回收率分别为 98.71%、100.32%、98.73%、99.92%, RSD 分别为 1.46%、1.49%、1.96%、0.92%; 酸水解后各指标成分的平均加样回收率分别为 99.33%、98.63%、100.02%、99.91%, RSD 分别为 1.35%、2.08%、2.50%、0.96%。

2.9 样品的测定

精密称取 3 批(批号 GZ0901、JX0901、JX0411) 提取物样品, 按供试品溶液的制备项下方法, 制备供试品溶液, 依法测定各提取物样品酸水解前后大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的量, 结果见表 2 和图 2。以样品中各指标成分在酸水解前后量的变化可大致估算提取物中异黄酮苷的量。

3 讨论

3.1 指标成分的选择依据

对比不同产地红车轴草的异黄酮成分组成, 均含不同结合形式的鹰嘴豆芽素 A、染料木素、刺芒柄花素、大豆苷元, 或为苷元, 或为糖苷^[8-10]; 大量研究证实异黄酮苷元均具有不同程度的生物学活性^[11-13]。因此, 将其作为指标成分测定红车轴草提取物在酸水解前后各异黄酮苷元的量是合理且可行的。

表 2 红车轴草提取物样品的测定结果

Table 2 Determination of different extracts from *T. pratense*

样 品	质量分数/%				合计/%	酸水解前后异黄酮量的变化/%
	大豆苷元	染料木素	刺芒柄花素	鹰嘴豆芽素 A		
GZ0901	未酸水解	0.052	0.044	0.690	0.409	1.197
	酸水解	0.091	0.074	0.811	0.480	1.456
JX0901	未酸水解	0.279	0.143	0.014	0.123	0.560
	酸水解	0.294	0.241	0.034	0.350	0.919
JX0411	未酸水解	0.110	0.140	1.730	0.840	2.820
	酸水解	0.130	0.190	2.350	1.260	3.930

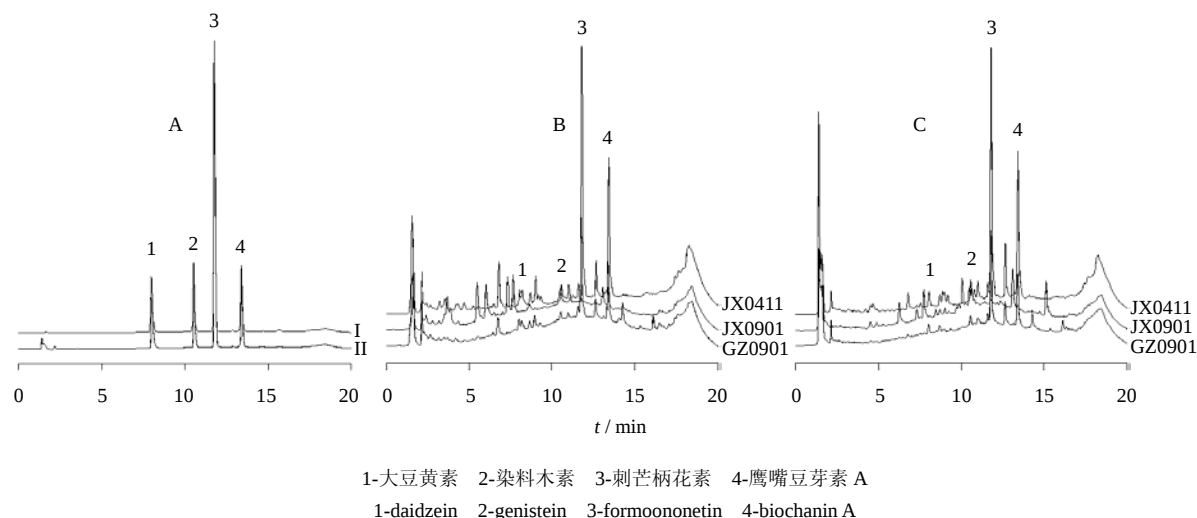


图 2 混合对照品 (I、II) (A) 和各红车轴草提取物 (GZ0901、JX0901、JX0411) 酸水解前 (B)、酸水解后 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances (I and II) (A) and extracts from *T. pratense* (GZ0901, JX0901, and JX0411) before (B) and after (C) acid hydrolysis

鉴于植物提取物市售品中添加人工合成异黄酮(苷元)的现象时有发生,我国红车轴草提取物的外贸行业标准选择两种异黄酮苷作为指标成分,虽在一定程度上起到防范作用,但又忽略了植物中异黄酮苷元及其他糖苷的存在及其量变化,且对照品来源相对困难、色谱耗时较长。

综合考虑,本实验以鹰嘴豆芽素 A、染料木素、刺芒柄花素、大豆苷元作为指标成分,同时测定红车轴草提取物在酸水解前后各异黄酮苷元的量,既可对异黄酮苷元进行准确定量,又可大致估算提取物中异黄酮苷的量,可较有效且直观地反映和评价红车轴草提取物的天然品质。

3.2 检测波长的选择

通过对各指标成分的紫外-可见光全波长扫描发现,大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 的最大吸收波长分别为 249、260、249、260 nm,因此确定检测波长为 254 nm。

3.3 pH 值对样品测定的影响

研究显示相同质量浓度的对照品溶液,酸化后色谱峰面积明显减小,此作用影响可能与 pH 值减小使异黄酮成分的最大吸收峰蓝移有关,因此定量测定时对照品溶液与供试品溶液的酸度需保持一致,以消除 pH 值对测定结果的影响。

3.4 酸水解条件的确定

本实验对提取物定量测定时的酸水解条件进行了考察。结果显示:酸度及水解时间基本不影响指

标成分的稳定性;但酸度及水解时间对异黄酮苷水解为苷元具有明显影响。通过研究和优化,确定的最佳水解条件为 1 mol/L 盐酸甲醇 85 °C 水解 1.5 h。

3.5 色谱条件的优选

目前对红车轴草及其提取物中异黄酮苷元的定量测定方法多采用加磷酸盐的液相洗脱系统,分离效果不稳定,且一般检测耗时较长。通过研究与对比,在乙腈-水梯度洗脱系统中添加 0.05% TFA,不仅可实现各异黄酮苷元的良好分离,且分析时间短、各成分的色谱保留时间相对稳定。

综上所述,选择鹰嘴豆芽素 A、染料木素、刺芒柄花素、大豆苷元作为指标成分,分别测定红车轴草提取物酸水解前后的各异黄酮苷元的量,可较为简便有效地反映和体现红车轴草提取物的天然品质。本实验明确了待测样品的酸水解条件,并优化出一种快速有效的红车轴草提取物的定量测定方法,经考察证实该方法稳定、准确、可靠。因此,该定量测定方法可适用于红车轴草提取物的常规质量分析。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学出版社, 1975.
- [2] 孙健, 耿彤, 潘勤, 等. 红车轴草异黄酮的研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(4): 150-155.
- [3] Gotoh T, Yamada K, Yin H, et al. Chemoprevention of N-

- nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1998, 89(2): 137-142.
- [4] Hsu J T, Hung H C, Chen C J, *et al*. Effects of the dietary phytoestrogen biochanin A on cell growth in the mammary carcinoma cell line MCF-7 [J]. *J Nutr Biochem*, 1999, 10(9): 510-517.
- [5] Adlercreutz H, Hämäläinen E, Gorbach S, *et al*. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan (letter comment) [J]. *Lancet*, 1991, 337(8752): 1270-1272.
- [6] Tang G W K. The climacteric of Chinese factory workers [J]. *Maturitas*, 1994, 19(3): 177-182.
- [7] Boulet M J, Oddens B J, Leher P, *et al*. Climacteric and menopause in seven South-East Asian countries [J]. *Maturitas*, 1994, 19(3): 157-176.
- [8] van de Weijer P H M, Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo [J]. *Maturitas*, 2002, 42(3): 187-193.
- [9] Wong E. Detection and estimation of oestrogenic constituents in red clover [J]. *J Sci Food Agric*, 1962, 13(5): 304-308.
- [10] 陈寒青, 金征宇. 红车轴草异黄酮的分离、纯化及结构鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1629-1631.
- [11] 索志新, 斯建勇, 沈连钢, 等. 红车轴草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 32-34.
- [12] Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and western diseases [J]. *Ann Med*, 1997, 29(2): 95-120.
- [13] Adlercreutz C H, Goldin B R, Gorbach S L, *et al*. Soybean phyto-oestrogen intake and cancer risk [J]. *J Nutr*, 1995, 125(Suppl 3): 757S-770S.
- [14] Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, *et al*. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer [J]. *Lancet*, 1997, 350(9083): 990-994.

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》), 为提高稿件处理效率, 更好地为广大读者和作者服务, 中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国>或 www.tiprpress.com 点击进入 4 刊网页, 在页面左侧有“作者登录”链接, 第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿; 作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

衷心感谢广大读者、作者和编委对本刊长期以来的关心和支持!

天津中草药杂志社