

# 高分离度快速液相色谱法测定黄芪药材中毛蕊异黄酮苷含量\*

## Determination of Astragalus Calycosin Glycoside Content Rapid Resolution Liquid Chromatography

李凯 Li Kai<sup>1</sup>, 周宁 Zhou Ning<sup>1</sup>, 李赫宇 Li Heyu<sup>2</sup>

1. 河南中医学院, 河南 郑州 450046

Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046

2. 天津市益倍建生物技术有限公司, 天津 300457

Tianjin City Times toBuild Biological Technology Co Ltd, Tianjin China 300457

**摘要:**目的:采用高分离度快速液相色谱(RRLC)法快速测定黄芪药材中毛蕊异黄酮苷的含量。方法:采用RRLC法,色谱柱:安捷伦 Zorbax SB - C18 柱(4.6 mm × 50.0 mm, 1.8 μm);流动相:0.3% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:(0~6.0 min, 15%~20% B; 6.0~14.0 min, 20%~45% B; 14.0~18.0 min, 45%~65% B; 18.0~20.0 min, 65%~100% B) 流速:0.6 mL · min<sup>-1</sup>;柱温:25 °C;检测波长:280 nm。结果:毛蕊异黄酮苷在 5.6~112.0 mg · L<sup>-1</sup> 浓度范围内与峰面积呈良好线性( $r = 0.9998$ ),平均回收率为 97.78% ( $n = 6, RSD = 2.87%$ )。结论:RRLC法简便、快速、准确,重复性好,可用于黄芪药材中毛蕊异黄酮苷的质量评价。

**文献引用:**李凯,周宁,李赫宇. 高分离度快速液相色谱法测定黄芪药材中毛蕊异黄酮苷含量[J]. 中医学报, 2013, 28(3): 380-381.

**Abstract:** Objective: By using the high rapid determination of Astragalus calycosin glycoside from the fast liquid chromatography content. Methods: Using the method of RRLC, chromatography column: the agilent Zorbax SB-c18 column (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm); the mobile phase: 0.3% formic acid aqueous solution (A) - acetonitrile (B), gradient elution program: (0 - 6.0 min, 15% - 20% B; 6.0 - 14.0 min, 20 - 45% B; 14.0 - 18.0 min, 45% - 65% B; 18.0 - 20.0 min, 65 - 100% B) velocity: 0.6 ml/min; column temperature: 25 °C; the detection wavelength: 280nm. Results: Calycosin glycoside in the range of 5.6 - 112 mg · L<sup>-1</sup> concentration showed a good linear with peak area ( $r = 0.9998$ ), the average recovery was 97.78% ( $n = 6, RSD = 2.87%$ ). Conclusion: The method is simple, rapid, accurate, reproducible, can be used for the quality evaluation of astragalus calycosin glycoside.

**Reference citation:** Li Kai, Zhou Ning, Li Heyu. Determination of Astragalus Calycosin Glycoside Content Rapid Resolution Liquid Chromatography [J]. China Journal of Chinese Medicine, 2013, 28(3): 380 - 381.

**关键词:** 高分离度快速液相色谱法; 黄芪; 毛蕊异黄酮苷

**Key words:** rapid resolution liquid chromatography; astragalus; calycosin glycoside

中图分类号 CLC number: R284.2 文献标志码 Document code: A 文章编号 Article ID: 1674 - 8999(2013)03 - 0380 - 02

黄芪(Radix Astragali)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<sup>[1]</sup>,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效<sup>[2]</sup>,主要含有皂苷类、黄酮及其苷类、多糖类等成分<sup>[3]</sup>。其中黄酮类化合物在清除自由基、调节免疫、抗病毒、抗动脉粥样硬化等多方面有广泛应用<sup>[4-6]</sup>,是黄芪药材中重要有效活性成分之一。高分离度快速液相色谱法(RRLC)与高效液相色谱技术具有相同的分离原理。不同的是RRLC所采用的色谱柱颗粒填料更小,从而增加了分析通量、灵敏度及色谱峰容量,因此,RRLC在分离能力方面具有较大优势。本实验优化色谱条件,并采用RRLC建立了黄芪药材中毛蕊异黄酮苷的含量测定方法,同时测定6批不同来源黄芪市售药材中该成分的含量,为黄芪药材的质量评价提供参考。

## 1 仪器和试剂

安捷伦高分离度快速液相色谱系统(Agilent,包括在线真空脱气机、高压二元梯度泵、柱温箱等);十万分之一电子天平(BT125D, Sartorius, Germany);色谱柱(Zorbax SB - C18, Agilent, Germany);数控超声波清洗器(KQ-500DV型,昆山市超声仪器有限公司);毛蕊异黄酮苷对照品购自江西本草天工科技有限公司(纯度>98%);黄芪药材从全国不同地区收集,收集地见表1。甲醇(色谱纯,天津四友精细化学品有限公司);乙腈(色谱纯,天津四友精细化学品有限公司);甲酸为分析纯(天津四友精细化学品有限公司);纯水(乐百氏)。

## 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适量,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得毛蕊异黄酮苷储备液。分别精密量取上述储备液0.500 mL、0.250 mL、0.125 mL、

\* 基金项目:河南中医学院博士基金项目(编号:BSJJ2010 - 06)

0.050 mL、0.025 mL 置 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 $112.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $56.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $28.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $11.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的毛蕊异黄酮苷对照品溶液,置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱保存,备用。

## 2.2 供试品溶液的制备

黄芪药材粉碎,过40目筛,精密称取粗粉1.0 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇25 mL,称质量,超声20 min,放冷,精密称质量,用甲醇补足减失的质量。用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液,置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱保存,备用。

## 2.3 色谱条件

色谱术:安捷伦 ZorbaxSB-C18 柱( $4.6 \text{ mm} \times 50.0 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$ );流动相:0.3%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:(0~6.0 min,15%~20% B;6.0~14.0 min,20%~45% B;14.0~18.0 min,45%~65% B;18.0~20.0 min,65%~100% B);柱温: $25^\circ\text{C}$ ;检测波长:280 nm;流速: $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量: $5 \mu\text{L}$ 。理论塔板数以毛蕊异黄酮苷计不得低于4000。

## 2.4 线性关系考察

按上述色谱条件测定毛蕊异黄酮苷峰面积,以对照品溶液的浓度( $X, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标,进行线性回归,得毛蕊异黄酮苷的回归方程为 $Y = 4799X + 6.273$ , $r = 0.9998$ 。结果显示,在 $5.6 \sim 112.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间呈良好线性。

## 2.5 精密度实验

取同一毛蕊异黄酮苷对照品溶液在24 h内连续进样5次,并连续5 d进样,按2.3项下色谱条件测定峰面积,根据峰面积分别计算日内精密度和日间精密度。结果显示,毛蕊异黄酮苷对照品溶液日内精密度和日间精密度分别为0.86%和1.37%,结果表明精密度良好。

## 2.6 重复性实验

精密称取同一批次黄芪药材样品5份,按2.2项下制备供试品溶液,测定峰面积,计算含量。黄芪药材中毛蕊异黄酮苷含量的RSD为2.14%,表明该方法的重复性良好。

## 2.7 稳定性实验

取黄芪药材供试品溶液,分别在0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h测定毛蕊异黄酮苷峰面积。结果毛蕊异黄酮苷峰面积RSD为2.48%,表明该供试品溶液在24 h内稳定。

## 2.8 加样回收率实验

精确称取已测知含量( $0.476 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )的黄芪药材6份,分别精确加入毛蕊异黄酮苷对照品溶液(含毛蕊异黄酮苷0.500 mg),按2.2项下方法分别制备供试液,测定峰面积,计算含量,其平均回收率为97.78%, $\text{RSD} = 2.87\%$ 。

## 2.9 样品测定

取黄芪药材,按2.2项下制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定毛蕊异黄酮苷峰面积,计算含量,对照品、供试品溶液色谱图见图1,测定结果见表1。

表1 黄芪药材中毛蕊异黄酮苷含量测定结果

编号	产地	毛蕊异黄酮苷含量( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	黑龙江伊春	0.192
2	甘肃陇西	0.394
3	山西浑源	0.513
4	内蒙古包头	0.476
5	内蒙古巴蒙	0.535
6	山西应县	0.268

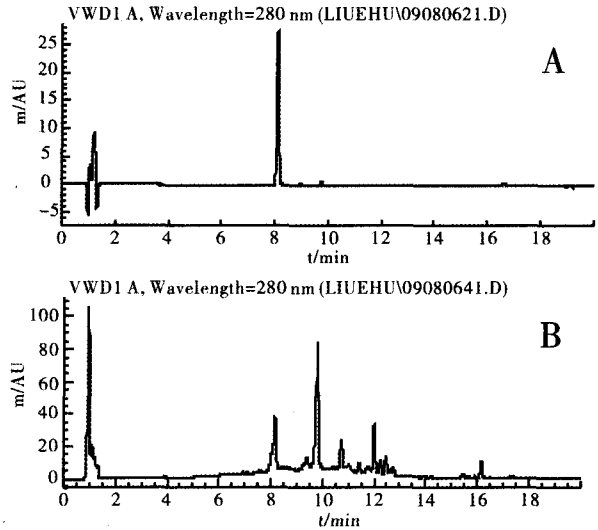


图1 毛蕊异黄酮苷(A)和黄芪药材(B) RRLC 色谱图

## 3 讨论

本实验优化色谱条件时,分别以乙腈-水、甲醇-水和乙腈-0.3%甲酸水为流动相筛选适宜的流动相,实验结果表明流动相为乙腈-0.3%甲酸水时色谱基线稳定,分离效果较好,提示在水相中加入少量的甲酸有利于改善其峰形。RRLC法简单、合理、有效,可作为黄芪药材中毛蕊异黄酮苷的质量控制方法,同时也体现了该测定方法在中药成分分析和中药标准化方面的广阔应用前景。

RRLC法在提高质量控制效率、分辨率、灵敏度等方面具有优势,用RRLC替代HPLC测定黄芪药材中毛蕊异黄酮苷含量,不但能提高色谱峰的分离度,而且大大节省分析时间,同时,也可以减少溶剂损耗及废液处置费用。该方法既适合单个样品分析,又适合大批样品分析,可大大提高质量控制效率。

不同来源的黄芪药材毛蕊异黄酮苷含量差异较大,其原因可能与药材产地、品种、采收季节、采收后加工、贮存保管等因素有关。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2010:283.
- [2] 张雪侠,曹珊,苗明三. 黄芪在糖尿病及其并发症中的应用[J]. 中医学报,2011,26(11):1323-1325.
- [3] 韩燕. 中药黄芪的研究概况[J]. 河南中医学院学报,2003,18(6):86-88.
- [4] 汪德清,丁保国, Tomas, G. N., 等. 黄芪总黄酮对动脉粥样硬化早期形成的影响[J]. 中国药理学通报,2003,19(6):637.
- [5] 于德凯. 益气通络法治疗肝炎肝硬化临床观察[J]. 中医学报,2010,25(4):739-740.
- [6] 许成群,徐明松. 中医药治疗糖尿病性视网膜病变的研究进展[J]. 中医学报,2010,25(6):1240-1242.

收稿日期:2012-12-10

作者简介:李凯(1982-),男,河南许昌人,医学博士,讲师,研究方向:中药材及饮片质量研究。

编辑:纪彬