

## 高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分

王晓辉, 刘涛, 李清, 陈晓辉, 毕开顺

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 对蒙古黄芪中5种异黄酮类成分的含量进行了反相高效液相色谱法测定。色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>柱, 流动相为乙腈-水系统, 梯度洗脱, 检测波长 230 nm, 柱温 35 ℃。毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷在 20.12 ~ 201.2 mg/L、芒丙花素-7-O-β-D-葡萄糖苷在 4.62 ~ 46.2 mg/L、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷在 4.86 ~ 48.6 mg/L、毛蕊异黄酮在 9.24 ~ 92.4 mg/L、芒丙花素在 6.92 ~ 69.2 mg/L 时峰面积与浓度呈良好的线性关系, 相关系数分别为 0.999 2, 0.999 7, 0.999 7, 0.999 5 和 0.999 5。5种成分的加样回收率均高于 94%, 相对标准偏差(RSD)小于 3.2% ( $n=9$ )。该法简便快速, 重复性良好, 结果准确可靠, 可用于黄芪药材中5种主要异黄酮类成分的含量测定。

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 异黄酮; 黄芪

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)05-0486-03 文章栏目: 研究论文

## Simultaneous Determination of Five Isoflavonoids in Commercial Radix Astragali by High Performance Liquid Chromatography

WANG Xiaohui, LIU Tao, LI Qing, CHEN Xiaohui, BI Kaishun

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

**Abstract:** A reversed-phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) was developed for the simultaneous analysis of five isoflavonoids of Huangqi, the roots of *Astragalus mongholicus*. HPLC determination was performed on a Diamonsil C<sub>18</sub> column (200 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) and detected at 230 nm. The mobile phase consisted of (A) acetonitrile and (B) water. Gradient program was adopted as follows: 0–25 min from 17% A to 31% A, 25–45 min 35% A. The flow rate was maintained at 1.0 mL/min. The method was proved to be linear in the ranges of 20.12–201.2 mg/L ( $r=0.9992$ ), 4.62–46.2 mg/L ( $r=0.9997$ ), 4.86–48.6 mg/L ( $r=0.9997$ ), 9.24–92.4 mg/L ( $r=0.9995$ ) and 6.92–69.2 mg/L ( $r=0.9995$ ) for the five isoflavonoids, calycosin-7-O-β-D-glucoside, formononetin-7-O-β-D-glucoside, 9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside, calycosin and formononetin, respectively. The recoveries were greater than 94%, and relative standard deviations were less than 3.2%. The method has been successfully applied to the simultaneous determination of the five isoflavonoids of radix astragali.

**Key words:** reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); isoflavonoid; radix astragali

黄芪为多年生草本植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus mongholicus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。其味甘, 性温, 归肺、脾经, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效。黄酮类成分为其有效成分之一, 有抗病毒、抗菌、降血脂、抗氧自由基等作用, 还具有抗缺血和改善血象作用。近年对异黄酮类成分含量测定方面的报道<sup>[1-4]</sup>多为测定毛蕊异黄酮-7-

O-β-D-葡萄糖苷和芒丙花素的含量, 未见有关黄芪中芒丙花素-7-O-β-D-葡萄糖苷和 9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷含量测定的报道。国外有用液相色谱-质谱法(LC-MS)法测定异黄酮类成分的报道<sup>[5-6]</sup>。鉴于液相色谱-质谱联用仪在国内还未被普遍使用, 因此建立简便快捷的高效液相色谱法测定黄芪中异黄酮类成分的含量具有一定的理论和实用意义。本文建立了黄芪中5种主要异黄酮含量的测定方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和药品

日本岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪;RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HHS112 型恒温水浴箱(江苏省医疗器械厂);石英亚沸高纯水蒸馏器(天津市金洲科学仪器有限公司);甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,黄芪药材经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为正品药材;5种异黄酮对照品均从蒙古黄芪根中提取分离得到,并经光谱鉴定和色谱法分析,纯度在99%以上。

### 1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取5种异黄酮化合物对照品适量,置于50 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成含毛蕊异黄酮-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside) 201.2 mg/L,芒丙花素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(formononetin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside) 46.2 mg/L,9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(9,10-dimethoxypterocarpan-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside) 48.6 mg/L,毛蕊异黄酮(calycosin) 92.4 mg/L和芒丙花素(formononetin) 69.2 mg/L的标准储备液。

### 1.3 供试品溶液的制备

取黄芪药材粉末约2 g,精密称定,加入20 mL的80%甲醇回流1 h,重复提取3次,合并提取液,于80℃下减压浓缩至干,以甲醇溶解并定容至10 mL。经0.45  $\mu$ m微孔滤膜滤过,续滤液作为供试品溶液。

### 1.4 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>柱(200 mm × 4.6 mm i. d., 5  $\mu$ m),迪马公司。流动相:A,乙腈;B,水;梯度洗脱程序:0~25 min,17% A~31% A;25~45 min,35% A。流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:35℃;进样量:10  $\mu$ L。

在上述色谱条件下,取同一混合对照品溶液10  $\mu$ L连续进样5次,记录色谱图,结果见图1-a。5种异黄酮成分的峰形良好,分离度大于1.5,理论塔板数均不低于7000。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线的建立

分别精密吸取对照品储备液1.0,2.0,4.0,6.0,8.0和10.0 mL至10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,进样10  $\mu$ L。分别以各成分的质量浓度( $x$ , mg/L)为横坐标,峰面积( $y$ )为纵坐标,建立标准曲线。得到5个待分析物的标准曲线如下:毛蕊异黄酮-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷, $y = 2.769 \times 10^7 x +$

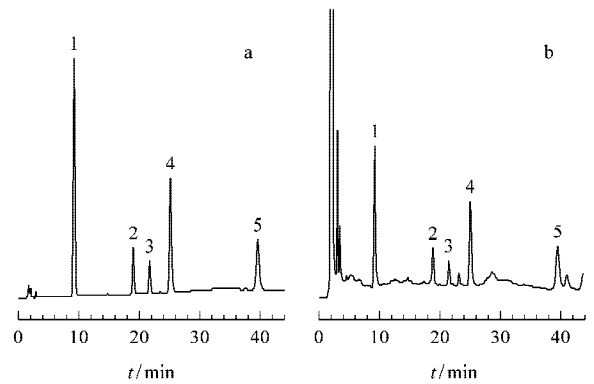


图1 (a)5种异黄酮对照品和(b)实际黄芪样品的色谱图  
Fig.1 Chromatograms of (a) a mixture of five flavanoid references and (b) a real radix astragali sample

1. calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside; 2. formononetin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside; 3. 9,10-dimethoxypterocarpan-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside; 4. calycosin; 5. formononetin.

1.  $4.81 \times 10^5 (r = 0.9992)$ ; 芒丙花素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷  $y = 2.756 \times 10^7 x + 3.049 \times 10^4 (r = 0.9997)$ ; 9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷  $y = 1.958 \times 10^7 x + 1.315 \times 10^4 (r = 0.9997)$ ; 毛蕊异黄酮  $y = 4.739 \times 10^7 x + 3.075 \times 10^4 (r = 0.9995)$ ; 芒丙花素  $y = 4.394 \times 10^7 x + 2.239 \times 10^4 (r = 0.9995)$ 。结果表明:毛蕊异黄酮-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷在20.12~201.2 mg/L,芒丙花素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷在4.62~46.2 mg/L,9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷在4.86~48.6 mg/L,毛蕊异黄酮在9.24~92.4 mg/L,芒丙花素在6.92~69.2 mg/L时峰面积与浓度呈良好的线性关系。

### 2.2 精密度试验

仪器精密度:取对照品溶液,连续进样6次,在上述色谱条件下测定,测得峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.9%,1.6%,1.7%,1.9%和2.4%。表明仪器的精密度良好。

方法精密度:取黄芪药材粉末6份,按“1.3”节所述方法制备样品溶液,在“1.4”节色谱条件下测定,分别进样10  $\mu$ L,测得毛蕊异黄酮-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芒丙花素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和芒丙花素含量的RSD分别为3.1%,3.4%,2.9%,3.0%和3.5%。表明该方法的重复性良好。

### 2.3 稳定性试验

取黄芪药材粉末,按“1.3”节所述方法制备样品溶液,分别于0,2,4,8,12和24 h测定,测得5种异黄酮峰面积的RSD分别为2.3%,0.9%,1.6%,2.8%和0.6%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

### 2.4 回收率试验

采用加样回收法,选取含量已知的黄芪样品,按

高、中、低浓度分别精密加入对照品溶液 6.0 mL, 4.0 mL 和 2.0 mL, 按“1.3”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, 在上述色谱条件下, 进样 10 μL。每个浓度重复试验 3 次, 计算平均回收率。结果见表 1。

表 1 样品中 5 种成分的回收率 (n = 3)

Table 1 Recoveries of five components in sample (n = 3)

Component	Added/ μg	Found/ μg	Recovery/ %	RSD/ %
Calycosin-7-O-β-D-glucoside	40.24	39.18	97.4	2.1
	80.48	79.91	99.3	3.2
	120.7	116.0	96.1	1.3
Formononetin-7-O-β-D-glucoside	9.24	9.16	99.1	2.5
	18.48	18.38	99.5	2.0
	27.72	26.85	96.9	1.2
9,10-Dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	9.72	9.55	98.3	1.3
	19.44	19.37	99.6	2.3
	29.16	28.54	97.9	1.4
Calycosin	18.48	18.29	98.9	1.9
	36.96	35.68	96.5	2.6
	55.44	54.92	99.1	1.9
Formononetin	13.84	13.03	94.2	1.0
	27.68	27.33	98.7	2.1
	41.52	39.76	95.8	1.9

### 2.5 样品含量测定

取不同产地的黄芪药材, 按“1.3”节所述方法制备样品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL, 进样分析, 按外标一点法计算, 结果见表 2。

表 2 不同产地黄芪样品中异黄酮类成分的含量 (n = 3)

Table 2 Content of isoflavonoids in different radix astragali samples (n = 3)

Source	Components*					μg/g
	1	2	3	4	5	
Harbin, Heilongjiang	439.8	50.40	218.5	150.2	89.7	
Siping, Jilin	461.9	139.1	125.1	224.3	110.8	
Qinhuangdao, Hebei	239.1	58.63	100.6	254.9	83.3	
Chengde, Hebei	274.6	78.67	37.96	248.6	153.7	
Kaiyuan, Liaoning	350.3	72.17	160.9	192.0	78.59	
Changchun, Jilin	203.2	64.94	55.40	128.8	70.41	
Anshan, Liaoning	340.6	98.05	66.12	290.6	129.1	
Huludao, Liaoning	248.1	59.34	42.42	298.1	157.0	
Dalian, Liaoning	513.3	114.9	134.3	394.2	176.4	
Nei Mongol	282.3	80.65	39.03	253.6	159.6	

1. calycosin-7-O-β-D-glucoside; 2. formononetin-7-O-β-D-glucoside; 3. 9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside; 4. calycosin; 5. formononetin.

不同产地的黄芪药材中均含有这 5 种异黄酮类成分, 且含量均较高。其中毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷的含量最高。在各产地药材中这 5 种成分的含量差异比较显著。但由于收集到的样本数较少, 且所收集的药材均来自北方, 目前尚不能全面地比较不同产地药材中各成分的差异。

### 2.6 色谱条件的优化

毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷和毛蕊异黄酮的峰值吸收波长均为 219 nm, 250 nm 和 290 nm; 芒丙花素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芒丙花素的峰值吸收波长均为 251 nm 和 300 nm; 9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷的峰值吸收波长为 207 nm, 232 nm 和 280 nm, 但低波长处的吸光系数远大于高波长处的吸光系数。本文用 LC-10AT vp 高效液相色谱仪、SPD-M10Avp 二极管阵列检测器对检测波长进行了选择, 在 230 nm 处, 5 个待测成分的吸收强度较大且杂质不干扰测定, 故选择 230 nm 为检测波长。在 230 nm 处, 各成分的吸光系数较大, 检测限均不低于 0.05 mg/L。

### 2.7 样品预处理方法的优化

在预试验中, 作者考察了超声提取、冷浸提取、回流提取和索氏提取等不同的提取方法。结果表明, 回流提取和索氏提取的效率明显高于超声提取和冷浸提取, 而回流提取和索氏提取的效率无明显差异, 故本文采用回流法提取。

考察了不同的提取溶剂(100% 乙醇, 80% 乙醇, 60% 乙醇, 100% 甲醇, 80% 甲醇, 60% 甲醇, 水和水提后分别以 95%, 80%, 60% 乙醇醇沉)对提取效率的影响, 结果表明 80% 甲醇的提取效率最高。

### 3 结论

本文采用高效液相色谱法同时测定了黄芪中的 5 种异黄酮类成分, 该法灵敏度高, 专属性强, 所用流动相系统和样品预处理方法简单, 快速, 能准确地测定黄芪中 5 种主要异黄酮的含量。

### 参考文献:

[1] Luo Chunxia, Lin Pingchuan, Gu Lihua, Wu Tao, Wu Dazheng, Wang Zhengtao, Hu Zhibi. China Journal of Chinese Materia Medica (罗春霞, 林平川, 谷丽华, 吴涛, 吴大正, 王峥涛, 胡之璧. 中国中药杂志), 2003, 28(7): 603

[2] Hu Fangdi, Feng Shilan, Zhao Jianxiang. Journal of Chinese Medicinal Materials (胡芳弟, 封士兰, 赵健雄. 中药材), 2003, 26(9): 634

[3] Zheng Zhiren, Song Chunqing, Liu Di, Hu Zhibi. Acta Pharmaceutica Sinica (郑志仁, 宋纯清, 刘涤, 胡之璧. 药学学报), 1998, 33(2): 148

[4] Ma Yingli, Zhao Huaiqing, Wang Xueya, Tian Zhenkun, Zhou Yingchun, Lu Xinyan, Zhang Chao. Acta Chinese Medicine and Pharmacology (马英丽, 赵怀清, 王学娅, 田振坤, 周迎春, 鲁鑫炎, 张超. 中医药学报), 2003, 31(2): 20

[5] Xiao H B, Krucker M, Albert K, Liang X M. J Chromatogr A, 2004, 1032: 117

[6] Lin L Z, He X G, Lindenmaier M, Nolan G, Yang J, Cleary M, Qiu S X, Cordell G A. J Chromatogr A, 2000, 876: 87