

UPLC-DAD 技术快速分析黄芪药材及制剂中主要黄酮成分

韩亮, 余楚钦, 林华庆*
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 采用 UPLC-DAD 技术快速测定黄芪及其制剂中主要黄酮类成分的含量。方法: 采用超高效液相色谱仪, 用 ACQUITY UPLC TMBEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相由甲醇-0.2% 甲酸水溶液线性梯度洗脱; 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 200 ~ 400 nm, 柱温 30 °C。结果: 毛蕊异黄酮苷、芒柄花素苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的线性范围分别为 0.131 3 ~ 1.313 g·L⁻¹ (r = 0.999 7), 0.118 6 ~ 1.186 g·L⁻¹ (r = 0.999 4), 0.020 6 ~ 0.206 g·L⁻¹ (r = 0.999 5), 0.015 0 ~ 0.150 g·L⁻¹ (r = 0.999 5); 平均回收率分别为 97.07%, 97.26%, 97.45%, 96.97%。结论: 本方法快速、准确、可靠, 可以作为控制黄芪药材及制剂质量的方法。

[关键词] 黄芪; 超高效液相色谱法; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0115-04

Ultra-Performance Liquid Chromatography for Quantification of Flavone in *Astragalus membranaceus* Preparation

HAN Liang, YU Chu-qin, LIN Hua-qing*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish UPLC method for the determination of main flavone in *Astragalus membranaceus* preparation. **Method:** ACQUITY UPLCTMBEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was used with Methanol-0.2% formic acid Water as a mobile phase. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, The detecting wavelength was set at 200-400 nm. The column temperature was at 30 °C. **Result:** The linear ranges of calycosin glycoside, formononetin glycoside, calycosin and formononetin were 0.131 3-1.313 g·L⁻¹ (r = 0.999 7), 0.118 6-1.186 g·L⁻¹ (r = 0.999 4), 0.020 6-0.206 g·L⁻¹ (r = 0.999 5), 0.0150-0.150 g·L⁻¹ (r = 0.999 5). The average recoveries were 97.07%, 97.26%, 97.45%, 96.97%. **Conclusion:** The method was reliable, accurate and quickly. It can be used for quality control of *A. membranaceus* preparation.

[Key words] *Astragalus membranaceus*; UPLC; calycosin glycoside; formononetin

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根^[1]。黄芪为传统中药, 具有广泛的药用价值, 主要含有多糖、皂苷和黄酮类成分。现代药理研究

表明, 黄芪黄酮类物质具有抗辐射损伤、清除自由基、调控离子通道蛋白、增强免疫、抗病毒等药理作用, 对于细胞保护、心率失常性疾病、感染性疾病有很好的应用前景^[2]。

黄芪的黄酮类成分有较强的紫外吸收, 一般采用紫外法分析。目前, 已有通过多成分多指标含量测定对黄芪进行质量控制的报道。如冯祖飞等^[3]采用 HPLC-DAD 法同时测定黄芪中 4 种异黄酮和黄芪甲苷的含量, 张颖丽等^[4-5]对不同生长年限栽植膜荚黄芪中黄酮类成分进行了比较研究。这些研究多采用传统的 HPLC, 分析时间较长, 进行多组分分析的时间往往要 30 min 以上。与 HPLC 相比, 超

[收稿日期] 20111102(006)

[第一作者] 韩亮, 硕士研究生, 助理研究员, 从事中药新药开发与质量控制研究, Tel: 020-39352691, E-mail: hanliang72@126.com

[通讯作者] * 林华庆, 教授, 从事药物制剂研究, Tel: 020-39352518, E-mail: huaqing_@vip.tom.com

高效液相色谱法 (UPLC) 具有超高分离度、超高速、超灵敏度的特点,可大大缩短分析时间,提高分析的灵敏度和分离度,因而非常适合中药复杂体系指纹图谱的建立及多组分多指标质量控制。本实验采用 UPLC-DAD 法系统分析黄芪药材及制剂中黄酮类成分,并对主要成分含量进行了测定,为更好的控制黄芪药材及相关制剂的质量提供了实验依据。

1 仪器与试剂

Waters Acquity™ Ultra Performance LC system (美国 Waters 公司),配四元泵、真空脱气机,自动进样器,柱温箱和 PDA 检测器。数据采集与处理采用 EMPOWER II 软件,DL-360A 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),1/10 万电子天平(德国 sartorius 公司)。甲醇(色谱纯,美国 TEDIA 公司),甲酸(色谱纯,美国 DIMA 公司),液相用水为超纯水(超纯水器,德国 Sartorius 公司),其他试剂均为分析纯。

毛蕊异黄酮(上海同田生物技术有限公司,批号 09052621),毛蕊异黄酮苷(上海中药化学对照品有限公司,批号 101108),芒柄花素(批号 110124)和芒柄花素苷(批号 101206)均由中国药品生物制品检定所提供,使用时用甲醇配成适宜浓度;黄芪药材,购自广州市清平药材市场,粉碎成 20 目粉;玉屏风颗粒(批号 110301,110302,110303,广东环球制药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相由 A(0.1% 甲酸水溶液)和 B(甲醇/水)线性梯度系统组成,梯度程序见表 1;流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 254 nm,进样体 2 μL。

表 1 UPLC 分析溶剂梯度程序

t/min	流速/mL·min ⁻¹	A/%	B/%
0	0.5	75	25
3	0.5	60	40
6	0.5	60	40
10	0.5	30	70
12	0.5	0	100
14	0.5	0	100
15	0.5	75	25

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮苷

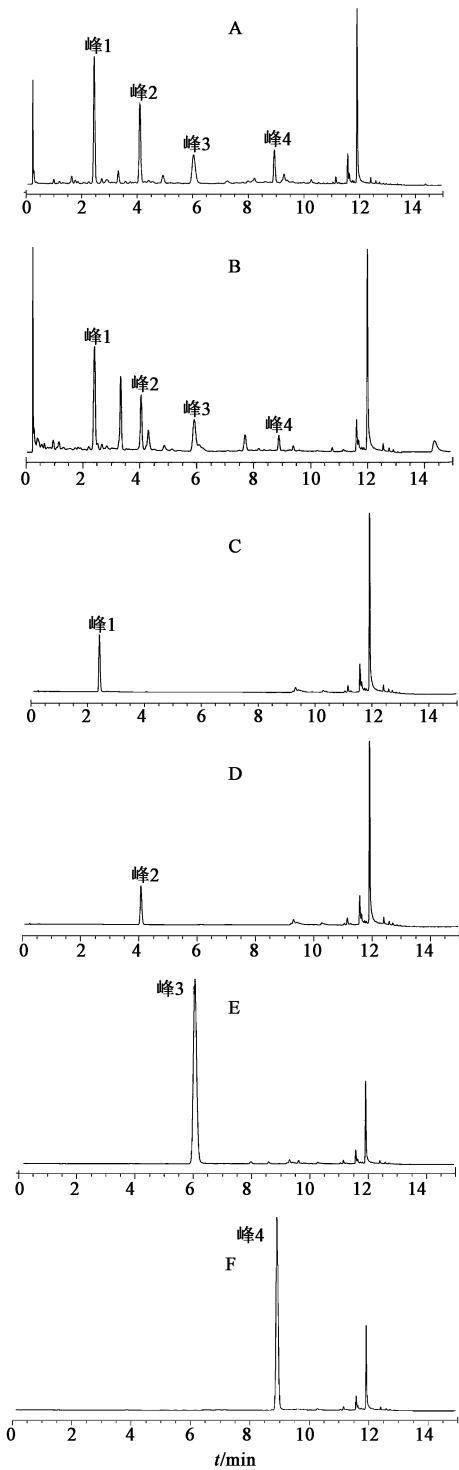
对照品 33.14 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 3.314 g·L⁻¹ 的对照储备液,记为 a;精密称取芒柄花素苷对照品 30.47 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 3.047 g·L⁻¹ 的对照储备液,记为 b;精密称取毛蕊异黄酮对照品 10.56 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 1.056 g·L⁻¹ 的对照储备液,记为 c;精密称取芒柄花素对照品 15.27 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得 0.764 g·L⁻¹ 的对照储备液,记为 d。取 10 mL 量瓶,依次精密加入 a,b,c,d 各 2, 2, 1, 1 mL,加甲醇定容,摇匀,即得混标对照品溶液(毛蕊异黄酮苷 0.663 g·L⁻¹、芒柄花素苷 0.609 g·L⁻¹、毛蕊异黄酮 0.106 g·L⁻¹、芒柄花素 0.076 g·L⁻¹)。

2.2.2 供试样品溶液的制备 黄芪药材溶液的制备:精密称取黄芪药材粉末约 10 g,置 200 mL 圆底烧瓶中,加入 120 mL 70% 乙醇,加热回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,放冷,过滤,滤液回收溶剂至近干,残留物加水溶解定容至 20 mL 量瓶中,即得水提液。水提液先用石油醚萃取 3 次脱脂,每次 20 mL。然后用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL。合并乙酸乙酯萃取部位,水浴(70 °C)挥干溶剂。残渣加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

玉屏风颗粒溶液的制备:精密称取玉屏风颗粒样品约 5 g,置 50 mL 具塞三角瓶中。加水 30 mL,超声提取 30 min,放冷,抽滤。先用石油醚萃取 3 次脱脂,每次 20 mL。然后用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL。合并乙酸乙酯萃取部位,水浴(70 °C)挥干溶剂。残渣加甲醇溶解并定容至 2 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

测定法:分别吸取混标对照品溶液和供试品溶液各 2 μL,按 2.1 所述色谱条件进行分析,从图 1 结果可以看出,各被测组分与其他组分均达到基线分离,分离度 R > 1.5,毛蕊异黄酮苷、芒柄花素苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素保留时间分别约为 2.45, 4.09, 6.02, 8.93。结果见图 1。

2.3 线性关系考察 将 2.2.1 项下混标对照品溶液和对照品储备液稀释至系列浓度的混标对照溶液,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,弃去初滤液,取续滤液,进样 2 μL。以质量浓度(X, g·L⁻¹)为横坐标,峰面积为(Y)为纵坐标,得到回归方程:毛蕊异黄酮苷 Y₁ = 1.72 × 10⁶ X₁ + 1213, 0.131 3 ~ 1.313 g·L⁻¹ (r = 0.999 7, n = 6),芒柄花素苷 Y₂ = 1.48 × 10⁶ X₂



A. 黄芪药材;B. 玉屏风颗粒剂;C~F. 对照品;峰1. 毛蕊异黄酮苷;峰2. 芒柄花素苷;峰3. 毛蕊异黄酮;峰4. 芒柄花素

图1 黄芪药材及玉屏风颗粒超高效液相色谱

+ 2 085, 0.118 6 ~ 1.186 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999 4, n = 6$), 毛蕊异黄酮 $Y_3 = 6.19 \times 10^6 X_3 + 1 870, 0.020 6 \sim 0.206 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999 5, n = 6$), 芒柄花素 $Y_3 = 5.95 \times 10^6 X_3 - 1 226, 0.015 0 \sim 0.150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999 5, n = 6$).

2.4 精密度试验 分别精密吸取混标对照品溶液 2 μL , 重复进样 6 次, 计算各成分峰面积 RSD, 分别为 1.85%, 1.64%, 1.53%, 1.22%。

2.5 稳定性试验 取黄芪药材, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 4, 12, 24, 36, 48 h 进样分析, 计算 4 种化合物峰面积的 RSD 分别为 0.96%, 1.17%, 0.68%, 1.04%。

2.6 重复性试验 精密称取黄芪药材粉末 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 计算 4 种化合物平均含量分别为 0.649, 0.583, 0.105, 0.074 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.88%, 2.06%, 2.14%, 1.97%。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的黄芪药材粉末 6 份, 每份约 5 g, 分别精密加入分别加入混标对照储备液, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 测定含量, 并计算回收率。结果见表 2~5。

表2 毛蕊异黄酮苷回收率试验 ($n = 6$)

No.	称样量 /g	样品 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	5.074 36	3.293	3.314	6.426	97.26	97.07	0.83
2	5.117 60	3.321	3.314	6.424	96.82		
3	4.780 27	3.102	3.314	6.285	97.96		
4	4.949 13	3.212	3.314	6.322	96.87		
5	5.221 94	3.389	3.314	6.417	95.73		
6	4.835 72	3.138	3.314	6.309	97.78		

表3 芒柄花素苷回收率试验 ($n = 6$)

No.	称样量 /g	样品 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	5.074 36	2.958	3.047	5.841	97.27	97.26	1.23
2	5.117 60	2.984	3.047	5.905	97.91		
3	4.780 27	2.787	3.047	5.564	95.37		
4	4.949 13	2.885	3.047	5.863	98.84		
5	5.221 94	3.044	3.047	5.880	96.54		
6	4.835 72	2.819	3.047	5.712	97.61		

结果表明, 待测组分的平均加样回收率均在 95% ~ 105%, 加样回收率良好。

2.8 样品含量测定 取不同批次黄芪药材及玉屏风颗粒, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 测定结果见表 6。

表 4 毛蕊异黄酮回收率实验结果 (n=6)

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	5.074 36	0.533	0.528	1.032	97.27	97.45	0.76
2	5.117 60	0.537	0.528	1.029	96.62		
3	4.780 27	0.502	0.528	1.014	98.45		
4	4.949 13	0.520	0.528	1.017	97.04		
5	5.221 94	0.548	0.528	1.044	97.03		
6	4.835 72	0.508	0.528	1.018	98.26		

表 5 芒柄花素回收率实验结果 (n=6)

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	5.074 36	0.376	0.382	0.722	95.25	96.97	1.04
2	5.117 60	0.379	0.382	0.739	97.11		
3	4.780 27	0.354	0.382	0.715	97.15		
4	4.949 13	0.366	0.382	0.724	96.79		
5	5.221 94	0.386	0.382	0.746	97.14		
6	4.835 72	0.358	0.382	0.728	98.38		

表 6 黄芪药材中及制中黄酮成分含量测定 (n=3) mg·g⁻¹

No.	毛蕊异黄酮苷	芒柄花素苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素
1	0.647	0.575	0.098	0.076
2	0.620	0.559	0.104	0.063
3	0.631	0.546	0.091	0.072
4	-	0.287	-	0.028
5	-	0.262	-	0.025
6	-	0.294	-	0.027

注:样 1~3 为黄芩药材,样 4~6 为玉屏风颗粒。

3 讨论

通过与文献报道中黄芪可能含有的化学成分对照品比对,在全波长范围内,检测到黄芪药材中含有毛蕊异黄酮苷、芒柄花素苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素等 4 个黄酮类成分,其他成分如异鼠李素、槲皮素、山奈酚、黄芪甲苷、阿魏酸、芦丁没有检测到,这与检测手段及不同来源黄芪药材本身化学成分的差异有关。如黄芪中的主要有效成分之一黄芪甲苷紫外吸收很弱,很难检测到。

根据相关文献报道及 4 种待测成分紫外吸收情况,选择在 254 nm 波长处检测。在此波长下样品中 4 种待测组分吸收强度相差较小,阴性干扰小,符合方法学的要求。

实验过程中先后采用了乙腈-水、乙腈-0.2% 甲酸水、甲醇-0.2% 甲酸水梯度系统。在保证分离度及柱效的基础上,为了尽量缩短分析时间,对加水甲醇-0.2% 甲酸水梯度系统进行了优化,使 4 个待测成分在 10 min 之内出峰,单针进样的分析时间控制在 15 min 以内,较 HPLC 法大大缩短了分析时间。

从玉屏风颗粒的 UPLC 色谱图可以看出,在本研究的色谱条件下,制剂样品中峰 1 和峰 3 的分离度较差。通过优化色谱条件,发现效果仍然不理想,说明制剂中其他两味药材的成分对测定有干扰。我们将通过样品处理及色谱条件优化等方法进一步研究。

实验过程中发现,由于 UPLC 比 HPLC 柱的容量小,柱体积小,进样量 5 μL,色谱峰变宽,并出现分叉,降低进样量至 2 μL,峰型大大改善。因此,建议在保证灵敏度的基础上,尽量降低 UPLC 分析的进样量和进样体积。

本研究采用 UPLC 法建立了快速分析黄芪药材及制剂中黄酮类成分的方法,并进行了方法学考察,为该制剂的质量控制提供了依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:212.
- [2] 秀欣.黄芪主要活性成分的药理作用[J].时珍国医国药,2011,22(5):1246.
- [3] 冯祖飞,孙小明,宁生荣,等.HPLC-DAD 法同时测定黄芪中四种异黄酮和黄芪甲苷的含量[J].中药材,2010,33(9):1425.
- [4] 张颖丽,刘男,刘爽,等.不同生长年限栽植膜荚黄气中黄酮类成分的比较研究[J].延边大学医学学报,2011,34(1):34.
- [5] 赵强强,韩丽,欧水平,等.HPLC-ELSD 测定黄芪提取物中黄芪皂苷 I,II 及乙酰黄芪皂苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):56.

[责任编辑 顾雪竹]