

黄芪药材的 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究

梁瑾¹, 刘小花¹, 任远², 梁建娣¹, 党子龙¹, 封德梅³, 封士兰^{1*}

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室(培育基地), 兰州 730000; 3. 甘肃省第二人民医院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器(HPLC-DAD-ELSD)联用技术对黄芪药材进行指纹图谱研究。方法:采用 Waters 2695-Spursil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 ℃, 进样量 20 μL, 检测波长 254 nm。蒸发光散射检测器的条件为:漂移管温度 112.8 ℃, 载气流速 3.2 L·min⁻¹。结果:10 批药材 HPLC-DAD 指纹图谱找到 14 个共有峰, 鉴别了毛蕊异黄酮和芒柄花素; HPLC-ELSD 指纹图谱找到 9 个共有峰, 鉴别了毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅲ、黄芪皂苷Ⅱ。结论:方法准确可靠, 为全面控制黄芪药材质量提供了一种方法。

[关键词] 黄芪; 中药指纹图谱; 高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0070-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1741.025.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:41

[收稿日期] 20120220(004)

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金(Lzujbky-2011-137); 甘肃省科技重大专项项目(1002FKDA048); 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金项目(ZDSYS-KJ-2012-007)

[第一作者] 梁瑾, 硕士, Tel:0931-8915685, E-mail:jijinliang1989@163.com

[通讯作者] * 封士兰, 教授, 博士生导师, 从事中药中化学成分分离分析及中药新药研究, Tel:13993162172, E-mail:fengshl@lzu.edu.cn

表 2 西红花苷-Ⅱ加样回收率试验

样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
8.46	7.44	16.02	101.6		
8.46	7.44	16.1	102.7		
8.46	7.44	16.16	103.5		
8.46	7.44	16.21	104.16	102.94	0.87
8.46	7.44	16.08	102.42		
8.46	7.44	16.14	103.26		

3 讨论

3.1 流动相的考察 考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 乙酸水、乙腈-0.05% 磷酸水、0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水等, 结果表明 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水系统最佳, 色谱峰型好, 峰型较为尖锐并改善拖尾现象, 虽然乙腈-0.05% 磷酸水的峰型更佳、分离效果更好, 但考虑对栀子进一步研究时需适用于离子阱质谱检测系统, 最终采用了上述的色谱条件。

3.2 供试品溶液的处理方法考察 选择用 70% 甲醇提取, 分别采用加热回流、超声 40 min 和冷浸处理 3 种方法进行比较, 结果所得的西红花苷-I 和西

红花苷-Ⅱ含量差别不大, 因超声提取较为方便, 且重复性好, 故采用超声方法提取。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 231.
- [2] 董婉茹, 刘洪毓, 丁雅光, 等. 栀子在治疗肝脏疾病中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 250.
- [3] 郑书国, 钱之玉, 王宏婷. 西红花酸对高脂血症家兔 LDL 氧化易感性及血清 Ox-LDL 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 50.
- [4] 周素娣. 分光光度法测定西红花多甙片中西红花总甙含量[J]. 海峡药学, 1997, 9(2): 3.
- [5] 金蓉鸾, 叶玉兰, 周锦祥, 等. 番红花质量研究[J]. 南京药学院学报, 1986, 17(4): 247.
- [6] 刘瑛, 张浩. RP-HPLC 法测定栀子中西红花苷-I 和西红花总苷含量[J]. 中国民族民间医药, 2007, 89(6): 337.
- [7] 张留记, 刘钦松, 屠万倩, 等. RP-HPLC 法同时测定不同产地栀子中栀子苷、西红花苷-I 和西红花苷-II 的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 63.

[责任编辑 邹晓翠]

Study on Chromatography Fingerprint of Radix Astragali with Hyphenated Technique of HPLC-DAD-ELSD

LIANG Jin¹, LIU Xiao-hua¹, REN Yuan², LIANG Jian-di¹, DANG Zi-long¹, FENG De-mei³, FENG Shi-lan^{1*}

(1. School of Pharmaceutical, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology (Cultivating Base) in Gansu Province, Lanzhou 730000, China;

3. Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To research the chromatography fingerprint of Radix Astragali with hyphenated technique of HPLC-DAD-ELSD. **Method:** The chromatography conditions were defined as SpursilTM C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); mobile phase was A: ACN, B: H₂O, gradient elution; flow speed was 1.0 mL · min⁻¹; temperature of column was set at 25 °C; injection volume was 20 μL; detected wavelength was at 254 nm. The ELSD conditions were as follows: the temperature of drift tube was 112.8 °C, the gas speed was 3.2 L · min⁻¹. **Result:** In the chromatography fingerprint with HPLC-DAD of Radix Astragali, 14 common peaks were demarcated, calycosin and formononetin were identified; in the chromatography fingerprint with HPLC-ELSD of Radix Astragali, 9 common peaks were demarcated, calycosin-7-O-β-D-glucoside, astragaloside IV, astragaloside III and astragaloside II were identified. **Conclusion:** The method was accurate and reliable and the study may contribute in controlling of Radix Astragali.

[Key words] Radix Astragali; fingerprint of traditional Chinese medicine; HPLC-DAD-ELSD

黄芪主要化学成分包括黄芪皂苷、黄芪多糖、黄酮类等多种化合物等。

近年来国内外关于黄芪药材指纹图谱研究的报道很多^[1-11],但是未见采用高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器(HPLC-DAD-ELSD)联用技术研究黄芪药材指纹图谱研究的报道。本实验采用 HPLC-DAD-ELSD 联用技术^[12-13]对黄芪药材指纹图谱进行进一步研究,使用简单的乙醇回流法提取黄芪药材,比较药典方法不需要多次萃取,不仅方法简单,而且样品损失少,测定了 10 个不同产地黄芪药材的 HPLC 指纹图谱,一次进样确定了 23 个共有峰,标定了其中 6 个指纹峰的结构(包括黄酮类和黄芪皂苷类),为全面评价黄芪药材的质量进一步提供了科学依据。

1 仪器与试剂

美国 Waters 2695 高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, Millennium32 色谱管理站, 717 自动进样器, 蒸发光散射检测器(Alltech ELSD 2000); KQ3200DB 乙腈为色谱纯(德国默克);水为超纯水。数据处理软件:中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统软件(版本 1.0,中南大学提供)。黄芪药材为全国各地采集或购买的种植或野生黄芪,经兰州大学药学院生药研究所马志刚教授鉴定为蒙

古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, 共 10 批,见表 1。对照品毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III,均购于中国药品生物制品检定所。

表 1 黄芪药材的来源与品种

No.	来源	品种	No.	来源	品种
1	甘南野生	蒙古黄芪	6	甘肃临洮	蒙古黄芪
2	甘肃陇西	蒙古黄芪	7	甘肃西和	蒙古黄芪
3	甘肃岷县 1	蒙古黄芪	8	内蒙古	蒙古黄芪
4	甘肃岷县 2	蒙古黄芪	9	陕西	蒙古黄芪
5	甘肃首阳	蒙古黄芪	10	甘肃陇南	蒙古黄芪

2 方法

2.1 色谱条件 SpursilTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈和水, 梯度洗脱(表 2), 柱温 25 °C, 检测波长 254 nm, 蒸发光散射检测器温度 112.8 °C, 载气流速 3.2 L · min⁻¹。

2.2 样品测定

2.2.1 供试品溶液的制备 称取黄芪药材 5 g, 用 6 倍量的 95% 乙醇回流提取, 共提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 将提取液减压蒸干, 加甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液^[14]。用微孔滤膜(0.45 μm)过滤后备用。10 批

表 2 流动相组成

T/min	流速/mL·min ⁻¹	A/乙腈	B/水
0	1.0	5	95
30	1.0	40	60
60	1.0	60	40
65	1.0	60	40
90	1.0	95	5
120	1.0	5	95

药材样品处理过程相同。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别称取毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅲ适量,用甲醇配制成质量浓度分别为 0.425,0.437,0.412,0.385,0.281,0.348 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

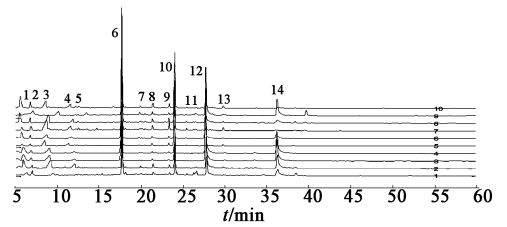
2.2.3 测定方法 分别取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪中,记录色谱图。

3 结果

3.1 检测波长的选择 对 190~400 nm 扫描的各波长下的色谱图进行分析比较,结果在 254 nm 波长下各峰分离度好,峰数目较多,而且毛蕊异黄酮和芒柄花素在此波长有最大吸收,因此选择 254 nm 为记录波长。

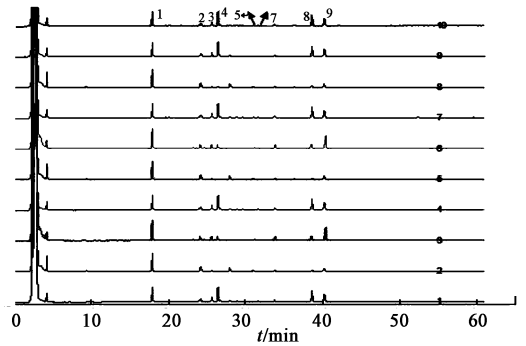
3.2 黄芪药材 HPLC-DAD 和 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立 取供试品溶液 20 μL,注入高效液相色谱仪,进行二极管阵列检测器和蒸发光散射检测器联用分析。所得 10 批药材 HPLC-DAD 指纹图谱如图 1, HPLC-ELSD 指纹图谱如图 2, 模式指纹图谱如图 3 和 4。对各个峰紫外光谱图进行对比分析,10 批药材 HPLC-DAD 指纹图谱共找到 14 个共有峰,其中 12 号和 14 号峰分别与对照品毛蕊异黄酮和芒柄花素的保留时间和紫外光谱图相同,确定为毛蕊异黄酮($t_R = 27.255$ min)和芒柄花素($t_R = 35.697$ min);HPLC-ELSD 指纹图谱共找到 9 个共有峰,通过与对照品保留时间的比较,确定 1 号峰为毛蕊异黄酮苷($t_R = 16.773$ min),5 号峰为黄芪甲苷(黄芪皂苷Ⅳ)($t_R = 31.210$ min),6 号峰为黄芪皂苷Ⅲ($t_R = 31.845$ min),7 号峰为黄芪皂苷Ⅱ($t_R = 33.702$ min)。对照品图谱见图 5。用中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统软件(版本 1.0,中南大学提供),采用夹角余弦法的原理,以共有峰的峰面积计算相似度,10 个样品的相似度均 > 90%,结果见表 3,4。

3.3 相似度的精密度和重复性



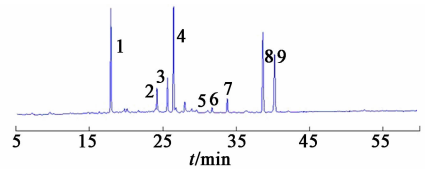
12. 毛蕊异黄酮;14. 芒柄花素

图 1 黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱(254 nm)



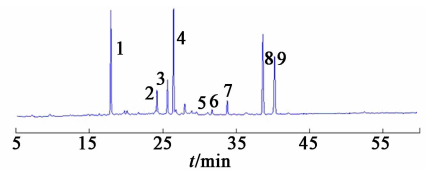
1. 毛蕊异黄酮苷;5. 黄芪甲苷;6. 黄芪皂苷Ⅲ;7. 黄芪皂苷Ⅱ

图 2 黄芪药材 HPLC-ELSD 指纹图谱



12. 毛蕊异黄酮;14. 芒柄花素

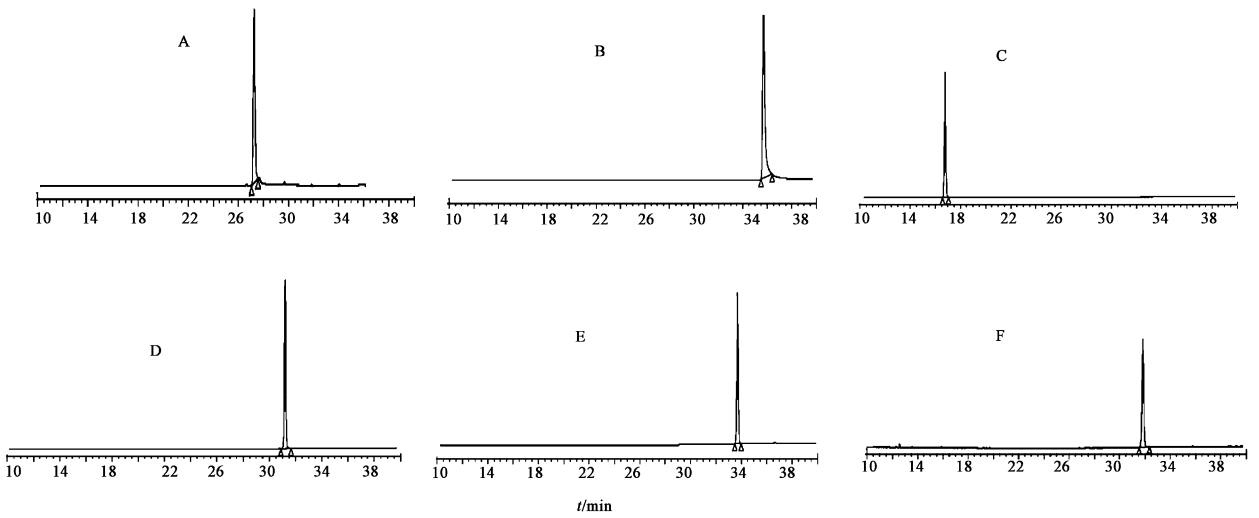
图 3 黄芪药材 HPLC-DAD 模式指纹图谱(254 nm)



1. 毛蕊异黄酮苷;5. 黄芪甲苷;6. 黄芪皂苷Ⅲ;7. 黄芪皂苷Ⅱ

图 4 黄芪药材 HPLC-ELSD 模式指纹图谱

3.3.1 HPLC-DAD 指纹图谱的相似度的精密度和重复性 取 1 号黄芪药材供试液,进样 5 次,每次进样量为 20 μL,测定指纹图谱相似度的日内精密度,计算得图谱的相似度 > 0.98, RSD < 1.0%;连续 5 d 每天进样 1 次,测定指纹图谱相似度的日间精密度,计算得图谱的相似度 > 0.97, RSD < 2.8%;取 1 号黄芪药材混合部分浸膏 5 份,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,测定指纹图谱相似度的重复性,计算得图谱的相似度 > 0.98, RSD < 1.2%。



A. 毛蕊异黄酮; B. 芒柄花素; C. 毛蕊异黄酮苷; D. 黄芪甲苷; E. 黄芪皂苷 II; F. 黄芪皂苷 III

图 5 对照品 HPLC-DAD 模式指纹图谱

表 3 10 个样品黄芪药材 HPLC-DAD 指纹图谱共有峰的保留时间和相似度

共有峰	t_R/min									
	野生	陇西	岷县 1	岷县 2	首阳	临洮	西和	内蒙	陕西	陇南
1	6.34	5.98	6.00	6.36	6.78	6.82	6.35	6.41	6.40	6.25
2	7.04	7.02	6.93	6.91	6.99	7.29	7.37	7.26	7.13	7.15
3	12.56	12.54	12.56	12.53	12.42	12.46	12.57	12.50	12.53	12.57
4	14.75	14.73	14.59	14.79	14.70	14.72	14.75	14.74	14.78	14.79
5	15.37	15.63	15.31	15.31	15.70	15.26	15.29	15.31	15.37	15.34
6	17.76	17.76	17.69	17.71	17.67	17.65	17.70	17.74	17.71	17.74
7	21.47	21.46	21.65	21.81	21.31	21.32	21.38	21.38	21.37	21.43
8	23.41	23.39	23.32	22.87	23.31	23.32	23.36	23.34	23.32	23.39
9	24.05	24.04	23.97	23.99	23.93	23.95	24.00	23.97	23.96	24.03
10	25.49	25.47	25.41	25.44	25.39	25.40	25.45	25.41	25.42	25.47
11	26.61	26.60	26.51	26.51	26.50	26.51	26.57	26.52	26.53	26.61
12	27.26	27.79	27.70	27.72	27.63	27.64	27.73	27.71	27.73	27.79
13	34.64	34.85	34.69	34.56	34.63	34.24	34.52	34.53	34.57	33.80
14	35.70	38.45	38.39	38.37	38.22	38.30	38.36	38.36	38.39	38.42
相似度/%	95.95	94.34	98.89	98.90	99.17	99.33	97.76	97.87	91.40	96.59

表 4 10 个样品黄芪药材 HPLC-ELSD 指纹图谱共有峰的保留时间和相似度

共有峰	t_R/min									
	野生	陇西	岷县 1	岷县 2	首阳	临洮	西和	内蒙	陕西	陇南
1	16.77	17.92	17.85	17.87	17.84	17.81	17.87	17.90	17.87	17.90
2	24.22	24.20	24.14	24.15	24.09	24.10	24.17	24.13	24.13	24.19
3	25.65	25.63	25.56	25.60	25.55	25.56	25.62	25.57	25.58	25.63
4	29.61	29.58	29.67	29.98	29.80	29.75	29.75	29.66	29.67	29.68
5	31.21	31.07	31.16	31.00	31.32	31.27	31.02	31.17	31.17	31.19
6	31.84	31.66	31.76	31.83	31.91	31.86	31.84	31.77	31.76	31.78
7	33.70	33.77	33.89	33.95	34.03	33.97	33.96	33.88	33.87	33.89
8	38.64	38.62	37.76	38.54	38.39	38.44	38.53	38.52	38.58	38.61
9	40.23	40.20	40.42	40.48	40.60	40.55	40.51	40.39	40.01	40.40
相似度/%	98.51	99.92	96.49	98.57	99.20	97.78	99.64	98.80	93.87	94.91

3.3.2 HPLC-ELSD 指纹图谱的相似度的精密度和重复性 取 1 号黄芪药材供试液,进样 5 次,每次进样量为 20 μL ,测定指纹图谱相似度的日内精密密度,计算得图谱的相似度 >0.96 , $\text{RSD} < 1.2\%$;连续 5 d 每天进样 1 次,测定指纹图谱相似度的日间精密密度,计算得图谱的相似度 >0.94 , $\text{RSD} < 2.5\%$;取 1 号黄芪药材混合部分浸膏 5 份,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,测定指纹图谱相似度的重复性,计算得图谱的相似度 >0.97 , $\text{RSD} < 1.3\%$ 。

3 讨论与结论

单一采用 HPLC-DAD 建立黄芪药材的指纹图谱只能反映黄芪药材中黄酮类成分的组成情况,对于无紫外吸收的黄芪皂苷类成分无法进行有效的评价,而黄芪中的皂苷类成分也是构成黄芪药效作用的物质基础,同时《中国药典》2010 年版也将黄芪甲苷作为控制黄芪质量的指标性成分;但是单一采用 HPLC-ELSD 指纹图谱表征黄芪药材的皂苷类成分,虽然符合药典将黄芪甲苷作为含量测定对象的要求,但是又缺失黄芪药材中黄酮类成分的药效物质基础;本文将两者结合起来,采用 HPLC-UV-ELSD 联用技术,一次进样建立 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱,能够同时对黄芪药材中的黄酮类成分及皂苷类成分进行相似度评价和质量控制。

用乙醇作为溶剂回流提取、超声提取和索氏提取以及用该 3 种方法提取后再用正丁醇萃取共 6 种方法进行比较,指纹图谱无明显差别。故选择乙醇回流提取法。利用 DAD 检测器进行全波长扫描分析,结果表明 254 nm 处色谱峰多且分离度好,基线平稳,所以选择 254 nm 为检测波长。流动相考察时选用了甲醇-水,乙腈-水等不同比例流动相系统,发现乙腈和水梯度洗脱时 HPLC-DAD 和 HPLC-ELSD 指纹图谱色谱峰多,分离度好。

采用 HPLC-DAD-ELSD 联用技术对 10 批黄芪药材进行指纹图谱研究,一次进样,从指纹图谱中找到了 23 个特征峰,并鉴定了 6 个指标成分峰毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 II,10 个样品的相似度均 $>90\%$,说明

建立的指纹图谱方法准确、稳定、重复性良好,为全面控制黄芪药材质量提供了一种方法。

[参考文献]

- [1] 胡芳弟,封士兰,赵健雄,等. 黄芪的高效液相色谱指纹图谱及主成分含量测定[J]. 中药材,2004,27(11):831.
- [2] 贾晓斌,陈彦,蔡宝昌,等. 黄芪皂苷类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中医学刊,2004,22(12):2227.
- [3] 黄际薇,李瑞珍,刘杰,等. 黄芪药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2005,27(11):1244.
- [4] 白焱晶,王智颖,杜新刚,等. 黄芪药材的 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(7):1089.
- [5] 石玉娟,解军,李桂兰. 山西省不同产地中黄芪药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 光明医药,2010,25(5):790.
- [6] 徐青,王加宁,肖红斌,等. 黄芪药材的指纹图谱研究方法的建立[J]. 分析测试学报,2002,21(2):89.
- [7] 李翔. 黄芪药材色谱指纹图谱研究[D]. 上海:第二军医大学,2005.
- [8] 管佳,毕志明,李萍. 黄芪皂苷注射液指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(10):807.
- [9] 王敏,李翔,王逢春. 黄芪及相关药材 HPLC-ELSD 色谱指纹图谱研究[J]. 华北国防医药,2010,22(2):32.
- [10] 张曦,徐青,肖红斌. 不同产地黄芪药材的指纹图谱比较[C]. 大连:第十四次全国色谱学术报告会论文集,2003.
- [11] 刘焕蓉,郭志强,秦雪梅. 山西道地药材黄芪石油醚提取物指纹图谱研究[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2003,21(10):200.
- [12] 李文庭,祝明,马临科. 桔梗的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):50.
- [13] 闫艳,杜晨辉,裴香萍. 不同产地酸枣仁药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):75.
- [14] 王鑫,张振秋,吕佳. 黄芪提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):17.

[责任编辑 邹晓翠]