

# HPLC 测定芪芍方有效部位中芒柄花素的含量

代丽萍<sup>1,2</sup>, 刘孟奇<sup>1</sup>, 石任兵<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医学院, 郑州 450003; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** **目的:**进一步表征芪芍方有效部位中异黄酮类化合物的含量,建立 HPLC 法测定芪芍方有效部位中芒柄花素含量的方法。**方法:**采用 ODSHYPERASIL 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈-2%磷酸水梯度洗脱,柱温 35 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 249 nm。**结果:**芒柄花素的线性回归方程为  $Y = 6 \times 10^6 X - 16\ 320$  ( $r = 0.999\ 8$ ),表明芒柄花素在 0.036 48 ~ 0.364 8 μg,线性关系良好。平均加样回收率为 98.70%,RSD 0.77%。3 批芪芍方有效部位中芒柄花素的平均含量分别为 0.81, 0.74, 0.63 mg·g<sup>-1</sup>。**结论:**方法简便、准确、重复性好,可以用于芪芍方有效部位中芒柄花素的质量控制。为芪芍方有效部位中异黄酮类化合物质量控制方法的建立提供支撑,同时为有效控制芪芍方有效部位质量奠定基础。

**[关键词]** 芪芍方; 有效部位; 芒柄花素; 异黄酮; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0109-03

## Quantitative Determination of Formononetin in the Effective Fraction of Qishao Formula by HPLC

DAI Li-ping<sup>1,2</sup>, LIU Meng-qi<sup>1</sup>, SHI Ren-bing<sup>2\*</sup>

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** Establishing a method of HPLC for quantitative determination of formononetin in the effective fraction of Qishao formula to further characterize the content of isoflavones in the effective fraction of Qishao formula. **Method:** The procedure of HPLC-PDA was performed on the chromatographic column of ODS HYPERSIL (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and the mobile phase in the gradient elution program was acetonitrile-phosphoric acid solution (0.2%), the column temperature was at 35 ℃. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was at 249 nm. **Result:** The regression equations was as follows:  $Y = 6 \times 10^6 + 06X - 16\ 320$  ( $r = 0.999\ 8$ ). Formononetin showed good linear relationship from 0.036 48 to 0.364 8 μg. The average recovery was 98.70%, (RSD 0.77%). The contents of formononetin in three batches of the the effective fraction of Qishao formula was 0.81, 0.74, 0.63 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** The method is easy and accurate with higher repeatability, which can be used in the quality control of the effective fraction of Qishao formula. It will provide support to control of the isoflavones in the effective fraction of Qishao formula. At the same time to lay the foundation for controlling its quality effectively.

**[Key words]** Qishao formula; the effective fraction; formononetin; isoflavones; HPLC

芪芍方由黄芪、赤芍、葛根等药组成,临床治疗酒精性肝病,芪芍方有效部位为原方经稀醇提取,大孔吸附树脂柱分离制得。黄芪皂苷类、异黄酮类、以

芍药苷为主的单萜苷类化合物为芪芍方有效部位主要药效物质基础<sup>[1-4]</sup>。芒柄花素为弱极性异黄酮类化合物,存在于葛根、黄芪药材中。前期我们采用

**[收稿日期]** 20111103(007)

**[第一作者]** 代丽萍,博士,副教授,河南中医学院中药鉴定与生药学科,从事中药质量评价与物质基础研究, Tel:13838193893, E-mail: zzdai@163.com.

**[通讯作者]** \* 石任兵,博士,教授,博士生导师,北京中医药大学,从事中药(复方)有效物质基础研究, E-mail: shirb@126.com

HPLC 分别在最大吸收波长处测定了芪芍方有效部位中葛根素、大豆苷、芍药苷的含量<sup>[5]</sup>。为对芪芍方有效部位中异黄酮类物质进行较全面的表征,本文采用 HPLC 测定有效部位中弱极性异黄酮类化合物芒柄花素的含量。

### 1 仪器与试药

Waters 1515-2487-717 型高效液相色谱系统, 2996PDA 检测器, Empower 工作站 (Waters 公司), ODSHYPERSIL 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), KQ-500DV 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂), 德国赛多利斯 Sartorius BS21S 分析天平, 乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。芒柄花素对照品 (110752-200511) 购自中国药品生物制品检定所。赤芍药材、葛根药材、黄芪药材均购自北京同仁堂饮片有限责任公司, 经河南中医学院中药鉴定与生药学科代丽萍副教授鉴定为毛茛科植物赤芍 *Paeonia lactiflora* 的干燥根、豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fish) Bge. 的干燥的根。芪芍方有效部位为全方经稀乙醇提取, 大孔树脂柱分离制得 (样品批次编号分别为 S820100119, S820100115, S820100111)。

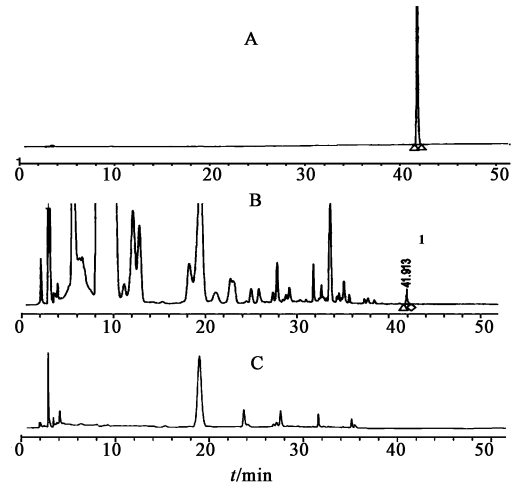
### 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 取芒柄花素对照品, 精密称定为 2.28 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 精密移取上述对照品溶液 2 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 作为对照品溶液。其中芒柄花素质量浓度为 0.018 24 g · L<sup>-1</sup>, 将上述对照品溶液保存于 4 °C 冰箱中, 备用。

**2.2 样品溶液的制备** 取芪芍方有效部位, 约 80 mg, 精密称定, 加水 20 mL, 使其完全溶解, 用水饱和正丁醇振摇提取 4 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.2 μm 滤膜过滤, 即得。按处方同法制备去葛根、黄芪的阴性对照溶液。

**2.3 色谱条件** ODSHYPERSIL 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-2% 磷酸水梯度洗脱 (0~15 min 11% 乙腈, 15~25 min 11%~20% 乙腈, 25~30 min 30% 乙腈, 30~45 min 30%~48% 乙腈, 45~50 min 48% 乙腈), 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 249 nm, 进样量 15 μL。上述色谱条件下, 各组分离度良好, 阴性对照无干扰, 见图 1。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取上述对照品溶液 2,



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 芒柄花素

图 1 芒柄花素对照品、芪芍方供试品及阴性对照溶液 HPLC

4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20 μL, 注入液相色谱仪, 进样分析, 每个浓度进样 3 次, 取平均值。以进样量对峰面积积分值进行回归处理, 得芒柄花素的标准曲线为  $Y = 6 \times 10^6 X - 16 320 (r = 0.999 8)$ 。表明芒柄花素在 0.036 48 ~ 0.364 8 μg 呈现良好的线性关系。

**2.5 精密度试验** 分别精密吸取芒柄花素样品溶液 15 μL, 于同一天内连续进样 6 次, 测定峰面积积分值, 得出芒柄花素的日内精密密度为 1.30%, 日内精密密度良好, 表明仪器较为稳定。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 15 μL 分别于配制后的 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积积分值, 芒柄花素稳定性的 RSD 1.27%, 表明处理后的样品在 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取样品 6 份, 精密称定, 按照 2.2 项下样品溶液制备方法制备样品, 测定芒柄花素的含量, 计算平均质量分数为 0.74 mg · g<sup>-1</sup>, RSD 2.83%。

**2.8 加样回收率试验** 称取已知含量的样品 6 份, 分别加入 2.1 项下对照品溶液 2 mL, 按照 2.2 项下样品溶液制备方法制备样品, 测定, 计算加样回收率, 结果见表 1, 表明回收率良好。

表 1 芍药芒柄花素加样回收率试验

称样量 /mg	样品中含量 /mg	加入量 /mg	检出量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
48.10	0.035 59	0.036 48	0.071 04	98.57	98.70	0.77
48.87	0.036 16	0.036 48	0.071 25	98.08		
48.14	0.035 62	0.036 48	0.071 78	99.55		
48.23	0.035 69	0.036 48	0.071 92	99.65		
48.67	0.036 02	0.036 48	0.071 43	98.53		
48.85	0.036 15	0.036 48	0.071 03	97.80		

# 荔枝黄酮提取和大孔树脂分离及其组分的 HPLC 分析

董华群<sup>1</sup>, 张英慧<sup>2</sup>, 黄剑波<sup>2</sup>, 董华强<sup>2\*</sup>

(1. 贵阳护理职业学院, 贵阳 550081; 2. 佛山大学, 广东 佛山 528231)

**[摘要]** 目的:研究荔枝黄酮提取分离工艺及其产物黄酮组分构成。方法:采用紫外吸收芦丁标准曲线法测定荔枝黄酮含量,比较乙醇水溶液和酸化乙醇水溶液提取荔枝黄酮效果,优化大孔树脂分离荔枝黄酮粗提物,采用 HPLC 图谱法分析荔枝黄酮提取分离产物的黄酮组分。结果:采用紫外吸收芦丁标准曲线法检测荔枝黄酮含量方法简便、有效;70%乙醇水溶液提取荔枝黄酮较其酸化溶液有更好的提取效果,且粗提物黄酮组分更简单,该法提取荔枝皮黄酮粗提物得率达到(92.5 ± 2.0)%,纯度(28.7 ± 1.8)%;在比较的 6 种大孔树脂中,AB-8 分离荔枝黄酮效果最好,以 80%乙醇水溶液为洗脱剂分离荔枝黄酮,得率为(86.5 ± 2.1)%,纯度达到(68.6 ± 1.5)%。结论:采用 70%乙醇水溶液提取结合大孔树脂 AB-8 分离荔枝黄酮工艺简单而有效。

**[关键词]** 荔枝;黄酮;提取分离;大孔树脂;高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0111-05

## Litchi Flavonoid Extraction and Separation with Macroporous Resins and the Constituents Analysis with HPLC

DONG Hua-qun<sup>1</sup>, ZHANG Ying-hui<sup>2</sup>, HUANG Jian-bo<sup>2</sup>, DONG Hua-qiang<sup>2\*</sup>

**[收稿日期]** 20111112(006)

**[第一作者]** 董华群,副教授,本科,从事预防医学和营养学,E-mail:18985003235@189.cn

**[通讯作者]** \*董华强,教授,博士,从事食品化学,E-mail:huaqiangdong@163.com

**2.9 样品测定** 称取 3 批次芪芍方有效部位样品各 3 份,每份约 80 mg,精密称定,按 2.2 项下方法操作制备供试品溶液,按样品测定项下方法测定峰面积积分值,计算样品含量,结果见表 2。

表 2 3 批次样品中芒柄花素的含量测定(n=3) %

批次	芒柄花素含量	RSD
1	0.81	2.55
2	0.74	2.06
3	0.63	1.59

### 3 讨论

异黄酮类、黄芪总苷类及芍药苷类化合物为芪芍方有效部位中主要有效成分,前期我们建立了芪芍方有效部位中葛根素、大豆苷等极性较大的异黄酮类物质的含量控制方法<sup>[5]</sup>。本实验首次采用高效液相色谱法对芪芍方有效部位中弱极性异黄酮类物质芒柄花素进行了质量控制研究,为全面表征芪芍方有效部位的主要异黄酮类化合物提供了实验支

撑,为创新新药研制奠定了基础。所建立的方法误差小、灵敏度高、简单快捷可重复。

### [参考文献]

- [1] 曲智威,温春阳,王爱平,等. 葛根素对酒精性肝纤维化影响的实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2010, 18(3):180.
- [2] 黄可儿,赵敏,王建华. 黄芪总苷的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2005, 16(6):461.
- [3] 丁美萍,封菲,胡海涛,等. 葛根素对脑缺血再灌注后核因子 KappaB 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2008, 32(23):255.
- [4] 高雪岩,孙建宁,王文全,等. 赤芍总苷的制备及其对小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志. 2010,16(18):183.
- [5] 代丽萍,石任兵. HPLC-PDA 法测定芪芍方有效部位中葛根素、大豆苷、芍药苷的含量[J]. 北京中医药大学学报,2010,3(3):200.

[责任编辑 蔡仲德]