

HPLC 同时测定黄芪白术药对提取物毛蕊 异黄酮苷、白术内酯 I、白术内酯 III 含量

张英丰¹, 朱黎霞², 梁东辉^{2*}, 吴阳¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

[摘要] 目的: 建立黄芪白术药对提取物中毛蕊异黄酮苷、白术内酯 I、白术内酯 III 3 种成分 HPLC 同步测定新方法。方法: 选用 Kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm × 250 mm) 色谱柱; 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 220 nm。结果: 毛蕊异黄酮苷、白术内酯 I、白术内酯 III 分别在进样量范围内与峰面积线性关系良好, $r > 0.999 5$, 仪器精密度和稳定性 RSD 均小于 2%, 3 种成分的回收率在 97% ~ 103% ($n = 3$)。测定了 6 批白术黄芪药对中的毛蕊异黄酮苷、白术内酯 I、白术内酯 III 含量。结论: 该方法快速、准确、重复性好, 可同时定量白术黄芪药对的 3 种成分。

[关键词] 高效液相色谱法; 毛蕊异黄酮苷; 白术内酯 I; 白术内酯 III; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0086-04

Simultaneous Determination of Calycosin Glycoside、 Atractylenolide-1, Atractylenolide III in Crude Extract of Radix Astragali- Atractylodis Macrocephalae Herb Couple by HPLC

ZHANG Ying-feng¹, ZHU Li-xia², LIANG Dong-hui^{2*}, WU Yang¹

[收稿日期] 20110921(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072935, 30701097)

[第一作者] 张英丰, 副教授, 从事生物药剂学与药物动力学研究, E-mail: zyfeng-2006@163.com

[通讯作者] * 梁东辉, 教授, 主任医师, 从事心脑血管疾病的临床及科研, E-mail: dhliang2005@21cn.com

差异显著, 小毛花和大鸡爪在 1 317 cm⁻¹ 有尖锐的强吸收峰, 大鸡爪在 1 638 cm⁻¹ 处有吸收, 小毛花没有; 大毛花和九丰一号在 1 318 cm⁻¹ 处的吸收最弱, 可区别于其余种质; 大鸡爪、红鸡爪在 1 648 cm⁻¹ 处有明显吸收峰, 其他种质在此处无明显吸收; 红梗子在 1 747 cm⁻¹ 处有明显吸收峰。值得指出的是, 九丰一号与其他种质差异较大, 表现在 1 681, 1 416 cm⁻¹ 处其他种质均有吸收, 而九丰一号没有。二维红外光谱上, 忍冬 6 个不同种质花蕾在 1 300 ~ 900 cm⁻¹ 差异较大, 表现在自动峰的数目及自动峰的强弱上各有不同。由此可见, 利用傅立叶红外光谱三级鉴定技术可以鉴别不同种质来源的金银花药材。

[参考文献]

- [1] 张永清. 山东金银花生产情况调查[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(10): 621.
- [2] 冉蓉, 孔庆悦, 周凤琴, 等. 山东 10 个不同种质金银

花木犀草苷的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 753.

- [3] 周凤琴, 冉蓉, 李佳, 等. 山东 10 个不同种质金银花中绿原酸含量及品质评价[J]. 山东中医杂志, 2007, 26(7): 478.
- [4] 李燕, 吴然, 于伯华, 等. 红外光谱在中药定性定量分析中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(10): 1846.
- [5] 韩明霞, 周群, 李全宏, 等. 不同产地葛根红外光谱的三级鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1851.
- [6] 聂波, 张贵君, 孙素琴, 等. 不同金莲花药材的 IR 鉴别研究[J]. 中药材, 2006, 29(4): 323.
- [7] 徐荣, 孙素琴, 刘友刚, 等. 四倍体金银花新品种的红外光谱分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5477.
- [8] 王鹏, 郭庆梅, 赵启韬, 等. 白花丹参不同部位的红外光谱三级鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 113.

[责任编辑 蔡仲德]

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Southern Medicine University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] Objective: To establish a new RP-HPLC method for simultaneous determination of calycosin, atractylenolide-1, atractylenolide III in crude extract of Radix astragali- Atractylodis Macrocephalae herb couple. **Method:** Analysis was carried out on a Kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm × 250 mm) column with acetonitrile-pure water as mobile phases in gradient elution. The flow rate was 1 mL · min⁻¹, and the UV detector was monitored at 220 nm. **Result:** All calibration curve showed good linear regression in test ranges ($r > 0.999 5$); and the overall recoveries were in the range of 97% -103% ($n = 3$) with RSD less than 3%. The overall RSD of precision test was less than 3%. **Conclusion:** The method is rapid, acute, credible and repeatable, and can provide bases for the material basis and compatibility for Radix astragali- Atractylodis Macrocephalae herb couple.

[Key words] HPLC; calycosin glycoside; atractylenolide-1; atractylenolide III; content determination

复方配伍是中医药用药特色,而药对是临床上常用的相对固定的两味药或三味药的配伍形式。药对组成具有一定规律,研究有助于揭示方剂配伍科学内涵且具有引导价值和点面结合的意义^[1]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪的干燥根,具有补气固表、利尿排毒、排脓、敛疮生肌等功效。黄芪中的主要有效成分为皂苷和黄酮类化合物。白术为菊科植物白术的干燥根茎,具有健脾益气、燥湿利水、止汗安胎功效。白术根茎中主要含挥发油、倍半萜内酯化合物等。

白术黄芪是临床常用配伍,为白术黄芪汤、玉屏风散等复方主要组成,二药均具有补气健脾、固表止汗、利水消肿的药理作用,合用则可达到有汗能止,无汗能发的功效,临床常用于治疗自汗、盗汗、妇女术后大汗等症状^[2]。现代药理研究表明,二药合用对类固醇性骨质疏松具有防治作用^[3]并且对再生障碍性贫血骨髓红系造血祖细胞具有促增殖作用^[4]。本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立白术-黄芪药对提取物中白术内酯I、白术内酯III和毛蕊异黄酮苷同步检测的新方法,为白术黄芪配伍的相互作用规律及物质基础研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 DIONEX SummitP680液相色谱仪(包括 Summit P680A四元泵,ASI-100自动进样器,Chromleon色谱工作站),AUW120D型1/10万分析天平(日本岛津公司);KQ-500型超声清洗仪(功率500 W,频率40 KHz,昆山市超声仪器有限公司),XW-80A微型涡旋混合仪(上海市沪西分析仪器厂有限公司),旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司)。

1.2 试药 白术内酯I对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号201008),白术内酯III对照品

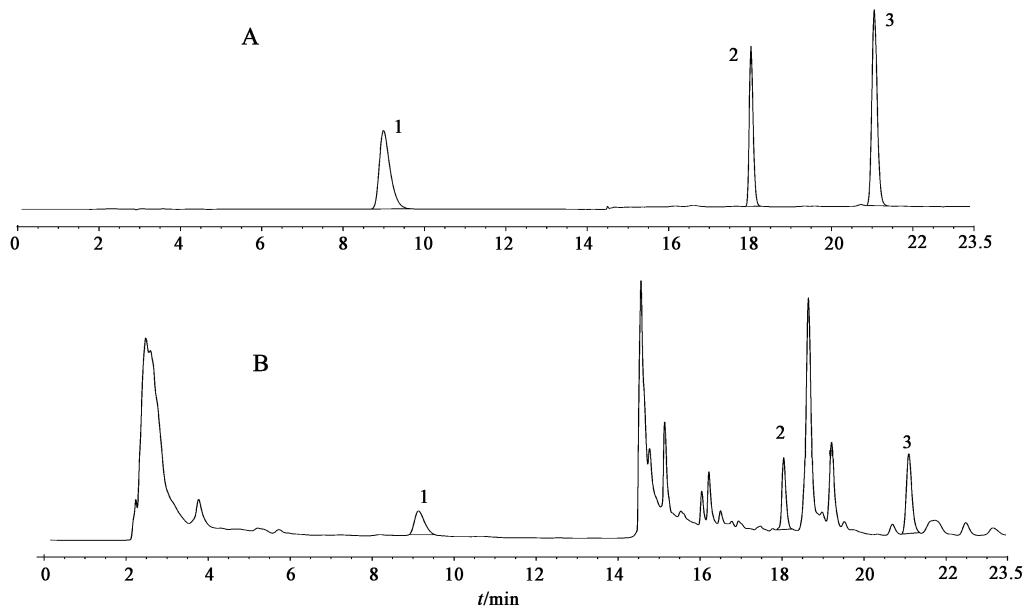
(四川省维克奇生物科技有限公司,批号201011),毛蕊异黄酮苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号201001),白术、黄芪药材均由广州致信药业有限公司提供,经张英丰副教授鉴定黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge.的干燥根,白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koilz的干燥根茎,其共提取物为按1:1比例提取、经减压干燥所得块状物,其配伍比例结合“黄芪白术汤”常用量并在药效筛选基础上确定,色谱甲醇(霍尼韦尔公司,批号10071743,色谱纯),水为纯化水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm × 250 mm)色谱柱;流动相A乙腈,B为水,梯度洗脱[A相随时间变化为20% (0~10 min),20%~68% (10 min~12 min),68% (12 min~35 min),68%~20% (35 min~40 min)],流速1 mL · min⁻¹,柱温室温,检测波长220 nm,进样体积为10 μL。毛蕊异黄酮苷、白术内酯I、白术内酯III保留时间(t_R)分别为9.0, 18.0, 21.1 min。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取置五氧化二磷干燥器中干燥至恒重的毛蕊异黄酮苷、白术内酯III、白术内酯I对照品适量于25 mL量瓶,甲醇定容,得到质量浓度分别为11.2, 125, 102 mg · L⁻¹的毛蕊异黄酮苷、白术内酯I、白术内酯III混合对照品液,冷藏备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取黄芪、白术药对提取物1 g,用少许甲醇研磨并超声10 min使其完全溶解后,定容、完全转移至5 mL量瓶内,甲醇定容后,-20℃冷冻20 min,12 000 r · min⁻¹高速离心以除去微量不溶物,上清液过0.22 μm微孔滤膜后



1. 毛蕊异黄酮苷; 2. 白术内酯Ⅲ; 3. 白术内酯Ⅰ; A. 对照品; B. 供试品

图 1 黄芪白术药对色谱

表 1 黄芪白术药对提取物中加样回收率

成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
毛蕊异黄酮苷	1.005 3	79.889	64.102	142.991	98.44	98.44	0.31
	1.002 6	79.674	64.102	142.587	98.14		
	1.001 4	79.579	64.102	142.881	98.75		
	1.003 3	79.732	80.551	162.175	102.34	102.54	0.22
	1.002 9	79.698	80.551	162.501	102.79		
	1.005 1	79.873	80.551	162.426	102.48		
	1.004 5	79.825	96.326	178.155	102.10	102.19	0.11
	1.003 9	79.777	96.326	178.187	102.16		
	1.002 8	79.691	96.326	178.251	102.31		
白术内酯Ⅰ	1.005 3	560.228	440.112	1 002.140	100.41	99.91	0.70
	1.002 6	558.723	440.112	994.935	99.11		
	1.001 4	558.054	440.112	999.166	100.22		
	1.003 3	559.113	550.687	1 120.801	101.99	100.30	1.51
	1.002 9	558.890	550.687	1 104.577	99.09		
	1.005 1	560.116	550.687	1 109.803	99.82		
	1.004 5	559.782	660.195	1 216.977	99.54	99.59	0.23
	1.003 9	559.447	660.195	1 215.642	99.39		
	1.002 8	558.835	660.195	1 218.031	99.85		
白术内酯Ⅱ	1.005 3	728.556	576.257	1 301.816	99.47	99.42	0.44
	1.002 6	726.599	576.257	1 296.859	98.95		
	1.001 4	725.729	576.257	1 300.989	99.83		
	1.003 3	727.106	720.831	1 442.963	99.31	99.40	0.29
	1.002 9	726.816	720.831	1 445.673	99.72		
	1.005 1	728.411	720.831	1 443.268	99.17		
	1.004 5	727.976	864.867	1 589.816	99.65	99.80	0.18
	1.003 9	727.541	864.867	1 592.381	99.99		
	1.002 8	726.744	864.867	1 589.584	99.76		

进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

精密吸取毛蕊异黄酮苷、白

术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ混标溶液分别进样 0.5, 1, 2, 5, 7.5, 10, 15, 20 μL , 以色谱峰面积 (A) 对进样量 (X) 进行线性回归, 绘制标准曲线。结果表明: 毛蕊

异黄酮苷、白术内酯III、白术内酯I进样量分别在0.005 6~0.224, 0.125~2.500, 0.102~2.040 μg 线性关系良好。毛蕊异黄酮苷回归方程为 $Y = 41.892X - 0.04981$ ($R^2 = 0.9999$), 白术内酯III回归方程为 $Y = 37.774X - 0.2194$ ($R^2 = 0.9998$), 白术内酯I回归方程为 $A = 63.313X + 0.1844$ ($R^2 = 0.9999$)。

2.4.2 系统适用性试验 在上述色谱条件下,毛蕊异黄酮苷、白术内酯I、白术内酯III混标溶液,以及供试品溶液,3个成分分离度、峰型符合含测要求,专属性高,色谱图见图1~2。

2.4.3 精密考察 精密吸取同一标准品溶液,在上述色谱条件下一日内连续进样6次,记录峰面积;同一标准品溶液,在上述色谱条件下每天进样1次,连续进样6天,均进样5 μL ,分别计算毛蕊异黄酮苷、白术内酯I、白术内酯III的峰面积RSD。结果表明毛蕊异黄酮苷、白术内酯III、白术内酯I的日内峰面积RSD分别为0.41%, 0.91%, 0.64%, 日间峰面积RSD分别为1.03%, 1.52%, 1.35%, 仪器精密度良好。

2.4.4 重复性考察 取同一批药材制备的提取物,按照2.3平行制备6份供试品液,在上述色谱条件下分析测定,分别计算毛蕊异黄酮苷、白术内酯III、白术内酯I含量,含量RSD分别为1.34%, 1.67%, 1.86%, 表明本法重复性良好。

2.4.5 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别于0, 1, 4, 8, 12, 24 h在上述条件下进样 μL 测定3种成分的峰面积,毛蕊异黄酮苷、白术内酯III、白术内酯I峰面积RSD分别为1.54%, 1.31%, 1.43%。结果表明样品在24 h稳定。

2.4.6 回收率考察 采用加样回收率方法。取已知含量的提取物,精密称定9份,平均分成3份,分别加入低、中、高3个质量浓度的混合对照品溶液,相当于含量的80%, 100%, 120%,按2.3项制备,在上述色谱条件下测定,各成分回收率在97%~103%内, RSD < 3%。结果见表1。

2.4.7 样品测定 按2.3项制备供试品6批,在上述色谱条件下测定,记录色谱峰面积,按照外标法计算各成分的平均质量分数($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),结果见表2。

3 讨论

3.1 结果 本实验采用反相高效液相法建立了白术黄芪药对中的指标性成分毛蕊异黄酮苷、白术内酯I、白术内酯III同步测定的新方法,该方法简便、准确度高、重现性好,可用于白术黄芪药对配伍及物

表2 黄芪白术药对中3成分测定

批号	毛蕊异黄酮苷	白术内酯I	白术内酯III
1	78.544	532.258	728.886
2	86.043	579.864	751.143
3	76.792	568.427	736.599
4	81.293	592.255	782.176
5	79.167	584.387	765.253
6	79.262	591.293	753.297
平均值	80.184	574.747	752.892

质基础研究,亦可为含有白术黄芪相关制剂的含量测定做参考。

3.2 波长的选择 经过紫外扫描,白术内酯I和白术内酯III在220 nm处有最大吸收,毛蕊异黄酮苷在235 nm有最大吸收。为满足同时测定需要,最终选择毛蕊异黄酮苷、白术内酯I和白术内酯III均具有较强吸收的220 nm作为测定波长。

3.3 流动相的选择 本实验试过甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等不同流动相系统,经实验研究发现乙腈-水流动相系统可较好满足实验需求,并尝试了不同梯度洗脱程序,可获得较好峰形、分离度及较适当的保留时间^[5-6]。最终确定上述流动相梯度洗脱程序,3个成分得到较好分离,分离度均符合要求,拖尾因子在0.95~1.05。毛蕊异黄酮苷保留时间为9.00 min,白术内酯I保留时间为21.1 min,白术内酯III保留时间为18.0 min。国内尚未见到此3个成分同步测定的研究报道。

[参考文献]

- [1] 段金殿,宿树兰,唐于平,等.中药药对配伍组合的现代认识[J].南京中医药大学学报,2009,25(5):330.
- [2] 李永虞.自拟黄芪白术当归治疗多汗症30例[J].四川中医,2011,29(5):68.
- [3] 吴铁,谢华,崔燎,等.黄芪白术及其复方制剂对类固醇性骨质疏松的防治作用研究[J].中国中西医结合杂志,1998,6(18):284.
- [4] 后盾,吴正翔.黄芪白术对再生障碍性贫血骨髓红系造血祖细胞促增殖作用的实验研究[J].江西中医学院学报.1999,11(1):18.
- [5] 罗春霞,林平川,谷丽华,等.高效液相法测定黄芪中毛蕊异黄酮苷-7-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷的含量[J].中国中药杂志,2003,28(7):603.
- [6] 李志浩,李鹏,朱雪松,等.反高效液相法测定白术茯苓颗粒白术内酯I和白术内酯III的含量[J].医药导报,2010,29(5):662.

[责任编辑 蔡仲德]