

HPLC 测定沙苑子中 3 个黄酮成分

濮延男^{1,2}, 唐力英¹, 王祝举^{1*}, 朱洁³, 崔援军², 陈随清²

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 河南中医学院药学院, 郑州 450003;
3. 开滦(集团)有限责任公司医疗集团康复医院, 河北唐山 063000)

[摘要] 目的: 建立沙苑子中 3 个黄酮的 HPLC 的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1% 冰醋酸(56:44), 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长为 266 nm。结果: 沙苑子中毛蕊异黄酮、芒柄花素、鼠李柠檬素的线性范围依次为 0.348 ~ 1.74 ($r=0.9997$), 0.288 ~ 1.44 ($r=0.9998$), 0.120 ~ 0.60 ($r=0.9997$), 平均回收率($n=5$)分别为 100.3% (RSD 0.33%), 99.8% (RSD 2.78%), 98.6% (RSD 2.91%)。结论: 该方法操作简便, 结果准确, 能够同时测定沙苑子药材中 3 个黄酮的含量, 为沙苑子的质量控制和质量标准制定提供了参考依据。

[关键词] 沙苑子; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 鼠李柠檬素; 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(2011)10-0089-03

Determination of Three Flavonoids In Seeds of *Astragali Complanati* by HPLC

PU Yan-nan^{1,2}, TANG Li-ying¹, WANG Zhu-ju^{1*}, ZHU Jie³, CUI Yuan-jun², CHEN Sui-qing²

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China;
3. Rehabilitation Hospital of Kailuan Limited Liability Corporation, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC method for determining the content of three flavonoids (calycosin, formononetin and rhamnocitrin) in the seeds of *Astragali complanati*. **Method:** An HPLC method has been developed to separate the three flavonoids on Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with methanol-1% acetic acid (56:44) as mobile phase (1 mL·min⁻¹), column temperature at 30 ℃ and UV detection wavelength at 266 nm. **Result:** The good linearity range of calycosin, formononetin and rhamnocitrin is 0.348-1.74 ($r=0.9997$), 0.288-1.44 ($r=0.9998$), 0.120-0.60 ($r=0.9997$). The average recovery of Calycosin, Formononetin and Rhamnocitrin are 100.3% (RSD 0.33%), 99.8% (RSD 2.78%), 98.6% (RSD 2.91%). **Conclusion:** The established method is simple, accurate and can be used for simultaneously determining the content of three flavonoids and for the quality control of the seeds of *A. complanati*.

[Keywords] *Astragali complanati* semen; calycosin; formononetin; rhamnocitrin; HPLC

沙苑子为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. 的干燥成熟种子, 具有补肾助阳、固精缩尿、养肝明目的功能, 用于肾虚腰痛、遗精早泄、白浊带下、遗尿尿频、眩晕、目暗昏花^[1]。现代药

理学研究表明, 沙苑子有改善血液流变学指标、降低血压、调节血脂、抑制血小板聚集、保护肝脏、增强免疫功能、抗炎、镇痛及调节中枢神经系统等作用, 被广泛应用。沙苑子中含有多种黄酮类成分, 具有扩张血管^[2]、调节血脂、提高免疫功能, 增强抗氧化、抗辐射和抗癌作用^[3]。为了更好地控制沙苑子的质量, 我们建立了 HPLC 同时测定毛蕊异黄酮、芒柄花素、鼠李柠檬素 3 个黄酮成分的含量, 为沙苑子质量

[收稿日期] 2010-02-09

[通讯作者] * 王祝举, 研究员, Tel: 010-64014411-2975; E-mail: wangzhuju@sina.com

标准制定提供参考依据。

1 仪器与试剂

Waters 公司高效液相色谱仪 (Waters 1515 型泵, Waters 2487 紫外检测器, 美国), Empower Pro 软件分析系统。SARTIOMS 2004MP 型 1/10 万电子分析天平。

毛蕊异黄酮、芒柄花素和鼠李柠檬素对照品均为本实验室自制, 经 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 鉴定结构, HPLC 检测其纯度, 经面积归一化法计算各对照品的含量均在 98% 以上。甲醇为优级纯, 水为娃哈哈纯净水, 冰醋酸为优级纯, 其余试剂均为分析纯。

沙苑子药材 2010 年分别购自河南郑州、四川成都、山西郛城、江苏昆山等地, 经河南中医学院陈随清教授鉴定为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1% 冰醋酸 (56:44), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 266 nm。在该色谱条件下, 样品中毛蕊异黄酮、芒柄花素和鼠李柠檬素与其他非被测成分峰能够达到基线分离, 保留时间分别在 7, 17, 40 min 左右, 对照品和样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备 分别称取毛蕊异黄酮 1.74 mg、芒柄花素 1.44 mg、鼠李柠檬素 0.60 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 分别制成每 1 mL 中含毛蕊异黄酮 174 μg 、芒柄花素 144 μg 、鼠李柠檬素 60 μg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备 称取样品 (过 60 目筛) 1 g, 精密称定, 准确加入 25 mL 甲醇, 称重, 回流提取 1 h, 放至室温, 再称重, 用甲醇补足缺失的溶剂质量, 过滤。准确量取续滤液 20 mL, 挥干溶剂, 残渣用 10 mL 蒸馏水溶解, 用氯仿萃取 3 次, 每次 10 mL, 合并萃取液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 0.45 μm 滤膜过滤, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL 进样, 在所选色谱条件下测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标 Y , 以进样量 (μg) 为横坐标 X , 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL , 连续进样 5 次, 按 2.1 色谱条件测定峰面积, 其 RSD 1.28%, 表明仪器精密度良好。结果见表 2。

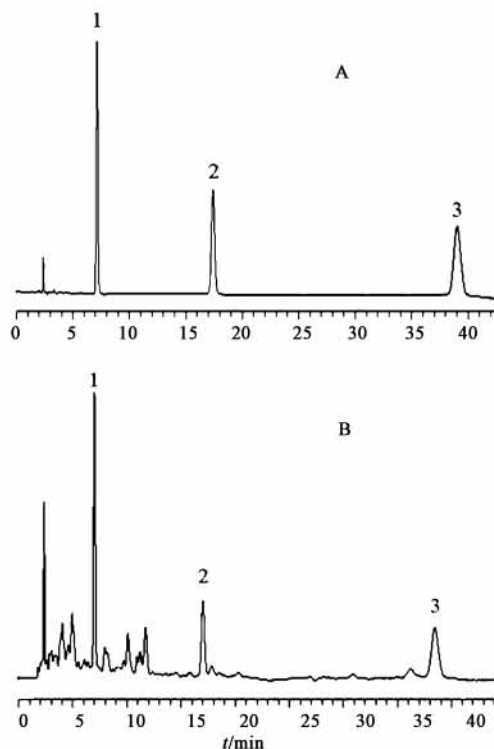


图 1 沙苑子液相色谱

A. 对照品; B. 供试品;

1. 毛蕊异黄酮; 2. 芒柄花素; 3. 鼠李柠檬素

表 1 线性关系

对照品	回归方程	r	线性范围/ μg
毛蕊异黄酮	$Y = 397\ 289.55X - 6\ 482.50$	0.999 7	0.348 ~ 1.74
芒柄花素	$Y = 387\ 190.05X - 32\ 681.77$	0.999 8	0.288 ~ 1.44
鼠李柠檬素	$Y = 587\ 586.54X - 11\ 870.78$	0.999 7	0.120 ~ 0.60

2.6 重复性试验 取同一样品, 称取 5 份, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液。准确吸取供试液 20 μL , 进样测定, 记录各成分色谱峰的峰面积, RSD 分别为毛蕊异黄酮 2.03%, 芒柄花素 2.40%, 鼠李柠檬素 3.07%。表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 将供试品溶液分别在 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 进样, 测定, 被测成分毛蕊异黄酮、芒柄花素、鼠李柠檬素的峰面积 6 次测定值的 RSD 分别为 0.71%, 2.84%, 1.15%。表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知毛蕊异黄酮、芒柄花素、鼠李柠檬素含量的样品 0.5 g (5 份), 精密称定, 依次准确加入上述 2.2 对照品溶液毛蕊异黄酮、芒柄花素、鼠李柠檬素各 2 μL , 按 2.3 项下方

法制备供试品溶液。精密吸取 20 μL , 进样, 测定, 计算含量。结果见表 2。

2.9 样品测定 称取样品 1 g, 精密称定, 按 2.3 项

表 2 沙苑子中 3 个黄酮成分的加样回收率试验

对照品	No.	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
毛蕊异黄酮	1	0.333 2	0.348	0.682 8	100.5	100.3	0.33
	2	0.332 8		0.681 8	100.3		
	3	0.332 9		0.680 7	99.9		
	4	0.333 1		0.681 2	100.0		
	5	0.333 2		0.683 6	100.7		
芒柄花素	1	0.189 1	0.288	0.462 5	94.9	99.8	2.78
	2	0.188 9		0.475 5	99.5		
	3	0.189 0		0.488 9	104.1		
	4	0.189 0		0.479 6	100.9		
	5	0.189 1		0.475 6	99.5		
鼠李柠檬素	1	0.106 1	0.120	0.228 8	102.2	98.6	2.91
	2	0.106 0		0.218 5	93.8		
	3	0.106 0		0.232 5	105.4		
	4	0.106 0		0.216 4	92.0		
	5	0.106 1		0.225 7	99.7		

表 3 沙苑子中 3 个黄酮成分的含量测定 ($n=3$)

No.	来源	毛蕊异黄酮	芒柄花素	鼠李柠檬素	总含量
1	江苏昆山	0.074 9	0.037 2	0.006 6	0.118 7
2	河南郑州	0.082 6	0.035 9	0.009 1	0.127 6
3	山西太原	0.116 8	0.068 1	0.039 3	0.224 2
4	山西郾城	0.100 1	0.044 2	0.010 5	0.154 8
5	四川成都	0.215 5	0.126 2	0.140 1	0.481 8
6	四川江油	0.173 5	0.070 2	0.039 1	0.282 8
7	四川江油	0.101 5	0.044 9	0.006 0	0.152 4
8	北京	0.149 4	0.059 9	0.028 0	0.237 3
9	北京	0.068 1	0.047 7	0.022 6	0.138 4
10	北京	0.135 7	0.054 6	0.037 6	0.227 9
11	北京	0.033 3	0.018 9	0.010 6	0.062 8

3 讨论与小结

建立了高效液相色谱法测定沙苑子药材中毛蕊异黄酮、芒柄花素、鼠李柠檬素含量的方法, 并对 11 个不同批次的沙苑子中 3 种黄酮的含量进行测定。结果表明该方法准确、灵敏、简单、快速, 为中药沙苑子质量控制提供了科学依据。从 11 批沙苑子药材含量测定结果看出, 不同样品中 3 个成分的含量相差较大, 最大可相差 7 倍, 这些差别对沙苑子的药效是否有影响, 有什么影响, 仍是今后需要探讨的问题。

流动相的选择试验中, 冰醋酸的浓度对分离效果影响较大。冰醋酸浓度过大或过小均对所测样品的峰形产生较大影响(前延或拖尾)。醋酸体积分数以 1% 为宜。

下方法制备供试品溶液。准确吸取供试液 20 μL , 进样, 在上述色谱条件下测定, 结果见表 3。

曾对提取方法和提取溶剂进行了考察。回流提取 1 h 较超声 1 h 和冷浸过夜效果好, 加热条件下提取率明显升高, 所以采用加热回流提取。以 50% 甲醇, 80% 甲醇, 甲醇, 丙酮及乙酸乙酯为溶剂, 热回流 1 h, 结果甲醇的提取率最高。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:171.
- [2] 尹钟珠. 沙苑子总黄酮药理作用的研究[J]. 中西医结合杂志, 1988, 10:635.
- [3] 姚修仁, 赵霖, 许贵新, 等. 冬凌草、分心木及沙苑子中微量元素的分析[J]. 药学通报, 1983, 18(9):546

[责任编辑 蔡仲德]