

HPLC 法测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量

阮佳佳¹, 林灵超²

(1 台州中西医结合医院泽国院区, 浙江 温岭 317523;

2 浙江福立分析仪器有限公司, 浙江 温岭 317500)

摘要: 采用 HPLC 法测定了黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。以 FL2200-II 为高效液相色谱仪, 采用 Ultimate XB-C18 色谱柱, 流动相为乙腈-0.2% 甲酸溶液(20:80), 检测波长 260 nm, 流速 1.0 mL/min。毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.5~50 μg/mL 内线性良好, $R^2=0.9999$; 测得某黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均含量为 31.86%, 平均加标回收率 99.55%, RSD 为 0.98%。利用反相高效液相色谱对黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行含量测定, 方法简便, 准确度高, 重现性好, 可应用于毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定。

关键词: HPLC 法; 黄芪; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-9677(2012)12-0142-02

Determination of the Content of Calycosin-7-O18-D-glycosid in Radix Astragalus with HPLC

RUAN Jia-jia¹, LIN Ling-chao²

(1 Taizhou Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine(zeguo Area), Zhejiang Wenling 317523;

2 Zhejiang Fuli Analytical Instrumentation Co., Ltd., Zhejiang Wenling 317500, China)

Abstract: The content of calycosin-7-O18-D-glycosid in radix astragalus was determined with high performance liquid chromatography(HPLC). Acted Ultimate XB-C18 as column, mobile phase was acetonitrile-water(0.2% Formic acid)=20:80, detection wavelength was 260 nm, and flow rate was 1.0 mL/min with FL2200-II HPLC. There was a good linear relationship when the concentration of Calycosin-7-O18-D-glycosid was in the range of 0.5~50 μg/mL($R^2=0.9999$). The average content of calycosin-7-O18-D-glycosid in radix astragalus was 31.86%. The average recovery rate was 99.55%, and the RSD was 0.98%. The method was simple and easy and the repeatability was also very good, which can be used to determinate the content of calycosin-7-O18-D-glycosid.

Key words: HPLC; calycosin-7-O18-D-glycosid; radix astragalus

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongolicus*(Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. 的干燥根, 具有补气升阳, 固表止汗, 利水消肿、生津养血, 行滞通痹, 托毒排脓, 敛疮生肌等功效^[1]。化学成分研究表明, 黄芪药材主要含皂苷类、黄酮及其苷类和多糖类成分^[2], 其中黄酮类成分中以毛蕊异黄酮葡萄糖苷最为活性较高, 有抗病毒、抗菌、降血脂、抗氧化自由基等作用, 还具有抗缺血和改善血象作用^[3]。

实验参照了相关资料^[4-6], 在通过对色谱方法的摸索后, 建立了等度分析黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 分析方法简单, 可进行对黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷的分析检测。

1 仪器与试剂

FL2200-II 高效液相色谱仪, 浙江福立分析仪器有限公司; 色谱柱(Ultimate XB-C18/4.6×250 mm, 5 μm), 浙江福立分析仪器有限公司; HS2060 超声波清洗器, 浙江福立分析仪器有限公司;

公司; JA2004 型电子分析天平, 上海雷韵公司。

乙腈(色谱纯), 美国进口; 水为超纯水; 甲酸(分析纯), 国药集团; 对照品: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷(纯度: 98%), 美国进口; 黄芪药材, 市购。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate XB-C18/4.6 mm×250 mm 5 μm, 流动相为乙腈:0.2% 甲酸=20:80, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量, 精密称定, 以甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液, 过滤, 备用。

2.3 供试品溶液的配制

取某黄芪药材粉末约 1 g, 精密称定, 置于圆底烧瓶中, 精密

作者简介: 阮佳佳(1987-), 女, 执业医师, 从事内科学的研究。

通讯作者: 林灵超, 助理工程师, 从事色谱应用。

加入甲醇 50 mL 称定重量 加热回流 4 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取滤液 25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 两瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,备用。

2.4 对照品与样品的溶液分析

在上述色谱条件下,进行对照品溶液和样品溶液的分析,色谱图如图 1。

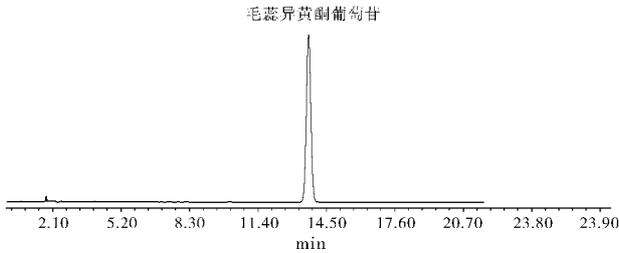


图 1 对照品 HPLC 图

2.5 精密度测试试验

取 50 μg/mL 对照品溶液,于上述色谱条件下进行进样,进样量为 20 μL,重复操作 6 次,测得平均保留时间为 13.8 min, RSD 为 1.05%; 平均峰面积为 3456123.5, RSD 为 0.883%。

2.6 标准曲线的建立

分别移取 0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL 对照品溶液,置于 10 mL 白容量瓶中,以流动相稀释至刻度,摇匀,过滤。于上述色谱条件下进样。后以峰面积为纵坐标,标样浓度为横坐标,绘制标准曲线,见图 2。

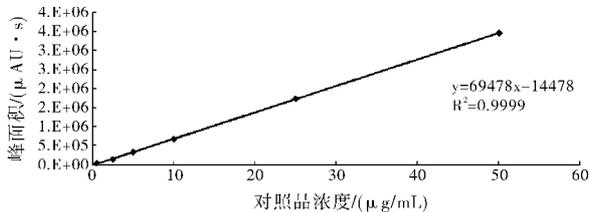


图 2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷标准曲线

由上述标准曲线可知,曲线方程为 $y = 69478x - 14478$, $R^2 = 0.9999$, 在 0.5 ~ 50 μg/mL 范围内线性良好。

2.7 供试品含量测定

取供试品溶液,在上述色谱条件下进样,记录供试品溶液 HPLC 图,见图 3。

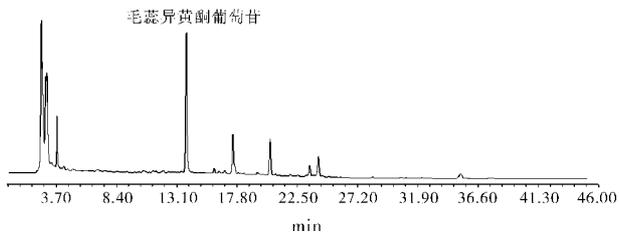


图 3 供试品溶液 HPLC 图

实验所得色谱图分离度 2.043,拖尾因子 1.097,理论塔板数 85626,符合分析要求。

2.8 样品含量测定

精密称取某黄芪药材 6 份,先于 2.3 方法进行处理,后于上述色谱条件下进样,测得黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量,如

表 1。

表 1 样品含量测定结果表

序列	含量/%	平均含量/%
1	30.52	31.86
2	31.05	
3	32.83	
4	31.76	
5	32.67	
6	32.34	

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液,于上述色谱条件下,分别在 0、1、2、4、8、12 h 后进样,测得在 12 h 内毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均含量为 31.22%, RSD 为 1.532%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 加标回收试验

取黄芪药材,称取 9 份,每份为 0.2 g,每三份为一组,分别置于圆底烧瓶中,依次加入浓度为 10 μg/mL 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液第一组 4 mL,第二组加入 5 mL,第三组加入 6 mL,后精密加入甲醇 10 mL,按照 2.3 处理方式对样品进行处理,后于上述色谱条件下分析。实验所得加标回收率为 99.55%, RSD 为 0.98%。

3 讨论

(1) 检测波长的选择 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液进行 190 ~ 700 nm 全波长扫描,发现在紫外波长 260 nm 处有最大吸收,结合相关文献^[4-6],确定 260 nm 为检测波长。

(2) 色谱柱的选择 考察了 ASB-C18、Hisep-C18、XB-C18 等三类色谱柱,结果在 XB-C18 有较好的保留和峰形,与杂质能很好的分离,故选择 XB-C18 色谱柱。

(3) 色谱条件的选择 考察乙腈-水、乙腈-缓冲盐、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液等流动相,结果在乙腈-0.2% 甲酸体系中,主峰峰形好,并且样品中与杂质能很好的分离,所以结合药典,选择 2.1 下色谱条件。

4 结论

分析方法验证结果表明,建立了黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱法,方法简便,准确度高,重现性好,可用于毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283-284.
- [2] 肖培根. 新编中药志(第一卷) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 876.
- [3] 罗春霞, 林平川, 谷丽华, 等. 高效液相色谱法测定黄芪中毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 603-606.
- [4] 程军, 夏厚林, 邓跃宁, 等. 川产道地药材梭果黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的含量测定 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(4): 65-67.
- [5] 王晓辉, 刘涛, 李清, 等. 高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分 [J]. 色谱, 2006, 24(5): 486-488.
- [6] 石子仪, 鲍忠, 姜勇, 等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖和芒柄花素的定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 779-783.