

## HPLC 法测定黄芪不同炮制品中芒柄花素

王思路<sup>1,2</sup>, 龚苏晓<sup>2</sup>, 张铁军<sup>2</sup>, 刘悦<sup>1,2</sup>, 胡乔<sup>1,2</sup>, 刘德旺<sup>3\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193
2. 天津药物研究院, 天津 300193
3. 内蒙古医科大学 药学院, 内蒙古 呼和浩特 100080

**摘要:**目的 建立黄芪药材中黄酮类成分芒柄花素的 HPLC 测定方法,并考察黄芪不同炮制品中芒柄花素的变化。方法 采用 HPLC 法测定芒柄花素。色谱柱: Thermo ODS-2 Hypersil (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05%冰乙酸水溶液 (35:65); 体积流量: 1 mL/min; 波长: 248 nm; 柱温: 30 ℃。将黄芪药材分别制成生黄芪、炒黄芪、蜜炙黄芪、盐制黄芪以及酒制黄芪,并比较黄芪不同炮制品中芒柄花素。结果 黄芪不同炮制品中芒柄花素有所差异,其中蜜炙后芒柄花素的量降低幅度较大。结论 该方法简便、准确,适用于黄芪不同炮制品中芒柄花素的定量分析。

**关键词:** 黄芪; 炮制品; 芒柄花素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)004-0550-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.020

## Determination of formononetin in different processed products of *Astragali Radix*

WANG Si-lu<sup>1,2</sup>, GONG Su-xiao<sup>2</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>2</sup>, LIU Yue<sup>1,2</sup>, HU Qiao<sup>1,2</sup>, LIU De-wang<sup>3</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
3. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 100080, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the determination of formononetin in *Astragali Radix* and analyze the effect of the different processing methods on formononetin in *Astragali Radix*. **Methods** The content of formononetin was determined by HPLC, which was analyzed by Thermo ODS-2 Hypersil column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile - 0.05% glacial acetic acid water (35 : 65). The detective wavelength was 248 nm, the column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL/min. *Astragali Radix* was processed into raw product, fried product, honey-fried product, wine-fried product, and salt-fried product. Then formononetin in the different processed products of *Astragali Radix* was compared. **Results** Formononetin in the different processed products of *Astragali Radix* was different. The reduction of the honey-fried product was the biggest. **Conclusion** The method is simple, accurate, and applicable to the quantitative analysis of formononetin in *Astragali Radix*.

**Key words:** *Astragali Radix*; processed products; formononetin; HPLC

黄芪为豆科蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bag.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。黄芪味甘,性温,有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓和敛疮生肌等功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明,黄芪主要含有皂苷、黄酮以及多糖类成分,具有调节免疫、抗氧化、抗衰老等功效<sup>[2-3]</sup>。

其中黄酮类成分具有清除氧自由基,抑制脂质过氧化和维持血中一氧化氮浓度,保护缺血再灌注损伤的作用<sup>[4]</sup>。毛蕊异黄酮、芒柄花素、山柰酚、槲皮素为黄芪中含量较多的几种黄酮类化合物<sup>[5-7]</sup>。本实验建立了黄芪中芒柄花素的高效液相色谱测定方法,并应用此法有针对性地对黄芪不同炮制品中芒柄花素进行了考察比较,以期黄芪炮制规范的进

收稿日期: 2013-03-25

作者简介: 王思路 (1987—), 女, 天津中医药大学中药学专业硕士研究生。E-mail: 178757116wsl@163.com

\*通信作者 刘德旺 Tel: (0471)6653152 E-mail: liudewang@sohu.com

一步制定以及饮片质量标准化提供参考依据。

## 1 仪器与材料

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 芒柄花素 (中国药品生物制品检定所, 批号 200501); 黄芪产地为内蒙古巴盟市乌拉特前旗朝阳, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bag.) Hsiao 的干燥根; 甲醇 (分析纯和色谱纯)、乙腈 (色谱纯) (天津市康科德科技有限公司); 冰乙酸 (分析纯, 天津市凯信工业有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 净制、切制

参考《天津市中药饮片炮制规范》<sup>[8]</sup>和《医院中药饮片管理规范实施手册》<sup>[9]</sup>。用水快速冲洗药材, 去除污泥和杂质, 30~40 °C温水浸泡 5 min, 取出覆盖温麻袋润透软化 2 h 切片, 烘干。切制切片, 饮片厚度 2~3 mm。切好后烘箱 60 °C 鼓风干燥, 取出, 摊晾至干, 即得生饮片。

### 2.2 炮制品的制备

**2.2.1 炒制品的制备** 炒锅置电磁炉上, 文火加热 (120 °C), 倒入备好的 40 g 生饮片。160 °C 炒至药材表面显微黄火色, 透出香气, 出锅后及时摊晾, 散热, 备用。

**2.2.2 蜜炙品的制备** 取 10 g 炼熟蜂蜜, 加入适量开水稀释, 开水的量约为熟蜜量的 1/3。取生饮片 40 g, 加入稀释好的炼蜜, 搅拌均匀, 闷润 1 h, 使蜜渗入药材组织内部。再将润好的黄芪片置炒锅内, 用微火 (60 °C) 加热, 翻炒至表面色泽加深, 不黏手为度。取出, 摊晾散热, 备用。

**2.2.3 盐制品的制备** 取食用盐 2 g, 溶解于 10 mL 温水中, 再将此配制好的 10 mL 盐水加入 40 g 黄芪生饮片中, 混合均匀, 闷润 1 h, 使盐水渗入药材组织内部。将润好的黄芪片置炒锅内, 用文火 (120 °C) 加热翻炒至显微黄色。透香气时, 出锅, 摊晾散热, 备用。

**2.2.4 酒制品的制备** 取生饮片 40 g, 绍兴黄酒 10 mL, 将黄酒均匀喷淋在黄芪片上, 搅拌均匀, 闷润 2 h, 使酒渗入药材组织内部。再于炒药锅内用文火 (120 °C) 加热, 翻炒至表面显微黄色, 出锅。摊晾, 散热, 备用。

### 2.3 色谱条件

色谱柱: Thermo ODS-2 Hypersil (250 mm×4.6

mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.05%冰乙酸水溶液 (35 : 65); 体积流量: 1 mL/min; 波长: 248 nm; 柱温: 30 °C。

### 2.4 对照品溶液的制备

取芒柄花素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含芒柄花素 9.3 μg/mL 的溶液, 即得。

### 2.5 供试品溶液的制备

取黄芪药材粉末 (过四号筛) 约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加甲醇 50 mL, 回流提取 30 min。放冷, 滤过, 取续滤液, 同法提取, 合并两次滤液, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 精密量取 50 mL, 减压回收溶剂, 残渣用甲醇溶解, 稀释至 5 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

### 2.6 方法学考察

**2.6.1 线性关系考察** 精密吸取芒柄花素对照品溶液 10、15、20、30、40、55、65 μL 注入液相色谱仪, 测定色谱峰面积。以色谱峰面积对进样质量进行回归分析, 得回归方程  $Y=118.92 X+56.219$  ( $r=0.9999$ ), 结果表明芒柄花素在 4.65~30.23 μg/mL 与峰面积具有良好的线性关系。

**2.6.2 精密度试验** 取黄芪生饮片粉末 (过四号筛), 制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 每次 20 μL, 记录芒柄花素峰面积, 计算得其峰面积 RSD 值为 0.5%。

**2.6.3 稳定性试验** 取黄芪生饮片供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定峰面积值, 结果以芒柄花素峰面积计的 RSD 值为 2.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.6.4 重现性试验** 取黄芪生饮片中粉 6 份, 每份约 1 g, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果芒柄花素的平均质量分数为 93.28 μg/g, RSD 值为 2.0%。

**2.6.5 加样回收率试验** 取含芒柄花素 93.28 μg/g 的黄芪生饮片粉末 9 份, 各 0.5 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 分别精密加入 18.6 μg/mL 芒柄花素对照品溶液 2.00、2.50、3.00 mL, 各 3 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果平均回收率为 98.73%, RSD 值为 0.4% ( $n=9$ )。

### 2.7 样品测定

取黄芪生饮片、炒制品、蜜炙品、酒制品和盐制品药材粉末 (过四号筛), 制备供试品溶液。分别精密吸取 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 计算样品中芒柄花素的质量分数, 结果见表 1, 色谱图见图 1。

表 1 黄芪不同炮制品中芒柄花素的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of formononetin in different products of *Astragali Radix* (n=3)

样 品	芒柄花素/%
生黄芪	0.023 3
炒制品	0.022 5
蜜炙品	0.011 0
盐制品	0.022 7
酒制品	0.020 0

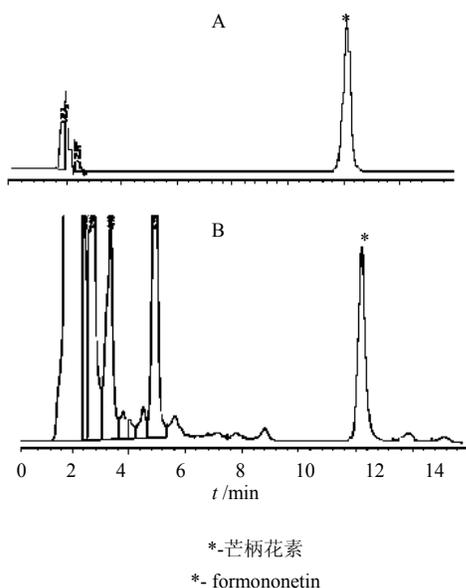


图 1 芒柄花素对照品 (A) 和黄芪生品 (B) 的 HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC chromatograms of formononetin reference substance (A) and raw product of *Astragali Radix* (B)

黄芪经炒制、盐制、酒制后芒柄花素变化不大, 蜜炙后则芒柄花素的量较生品显著降低, 炒黄芪、盐黄芪、酒黄芪所含芒柄花素比生黄芪中的只有少许降低。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

参考《中国药典》2005 年版一部黄芪项下毛蕊异黄酮葡萄糖苷测定的色谱条件, 考察了甲醇-水、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-冰乙酸水溶液、乙腈-冰乙酸水溶液流动相系统, 采用更简洁的等度洗脱的方式, 甲醇-0.05%冰乙酸水溶液 (35:65) 作为流动相。

#### 3.2 供试品溶液制备条件的选择

提取方法比较了回流法和超声法, 选择提取溶

剂时考察了 50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇以及乙醇。结果表明采用回流提取法、提取溶剂为甲醇时芒柄花素含量最高, 故选择用甲醇回流法处理样品。考察了回流提取时间 30、45、60、75 min, 结果表明回流提取 30 min 以上时芒柄花素提取率差异没有显著性, 故选择回流 30 min。考察了提取溶剂的量, 结果表明溶剂加倍并不能显著提高提取效率。分别将同批药材用甲醇回流提取 30 min, 各 1、2、3 次, 结果表明提取 1 次不能将待测成分提取完全, 提取 2 次后合并的芒柄花素含量达到 3 次所提总量的 98% 以上, 故采用回流提取 2 次合并溶剂的方法来提取待测成分。

黄芪经炒制、盐制、酒制后芒柄花素含量变化不大, 蜜炙后则芒柄花素的含量较生品显著降低。黄芪蜜炙后芒柄花素含量显著变化的原因, 可能与炮制过程中辅料炼蜜的加入导致样品中黄芪的有效质量降低有关, 而且蜜黄芪黏度较大, 粉碎后粒径也相对比较大, 可能会影响提取时芒柄花素的溶出。炒黄芪、盐黄芪、酒黄芪所含芒柄花素比黄芪生品只有少许降低, 说明炒制时的高温对黄酮类成分芒柄花素的影响不大, 在临床选择用药时, 可在不用舍弃其黄酮类成分所发挥功效的前提下, 结合不同炮制品的偏性长处, 针对不同证型和症状用药。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 283.
- [2] 陈虎虎, 孙 静, 杨金颖, 等. 柱前衍生化-高效液相色谱法测定蒙古黄芪多糖中单糖的组成 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 468-470.
- [3] 周振华, 王洪新, 赵素玲, 等. 黄芪多糖对脂多糖诱导大鼠心肌细胞肥大的保护作用 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 524-528.
- [4] 刘晋华, 陈静然, 尤光甫. 黄芪对心肌保护作用的药理学研究进展 [J]. 中成药, 2002, 24(8): 623-625.
- [5] 马晓丰, 田晓明, 陈英杰, 等. 蒙古黄芪中黄酮类成分的研究 [J]. 中成药, 2005, 36(9): 1293-1296.
- [6] 孙 洁, 张 蕾, 张晓拢, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 138-143.
- [7] 罗 舟, 苏明智, 颜 鸣, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 458-462.
- [8] 天津市食品药品监督管理局. 天津市中药饮片炮制规范 [M]. 天津: 天津市卫生局, 2012.
- [9] 孔祥明. 医院中药饮片管理规范实施手册 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.