

用 RP-HPLC 法测定黄芪毛状根中黄芪甲苷的含量[△]

上海中医药大学中药学院中药生物工程研究室(200032) 郑志仁* 宋纯清 刘 涤 胡之璧

摘 要 RP-HPLC 法对黄芪毛状根中黄芪甲苷进行定量分析,在实验条件下,黄芪甲苷标准品在 10.64~53.20 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系;平均加样回收率为 92.66%;精密密度试验相对标准偏差为 4.20%和 2.40%;测得黄芪毛状根中黄芪甲苷的含量为 0.14%(干重)。

关键词 HPLC 黄芪 毛状根 黄芪甲苷

黄芪为多年生草本植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 和蒙古黄芪 *A. membranaceus* Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根^[1];黄芪甲苷(astragaloside IV)为其主要有效成分之一,有降压消炎,镇静镇痛,影响血清和肝脏蛋白质合成,影响血浆 cAMP 及再生肝 DNA 合成,促进 NK 细胞(自然杀伤细胞)活性及抗肝损伤等作用^[2~6]。为扩大药物资源,近年来我们研究室用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) LBA 9402 菌株诱导形成膜荚黄芪毛状根(hairyroot),进行毛状根大规模培养研究,并用 RP-HPLC 法测定了毛状根中黄芪甲苷的含量。本文报道其测定方法和结果。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪,包括 510 型泵,991 光电二极管阵列型检测器,U6K 型进样器;NEC Power Mate 型计算机。

黄芪甲苷标准品购自上海市药品检验所。甲醇、正丁醇为分析纯,乙腈为色谱纯、水为去离子水;黄芪毛状根培养按文献^[7]方法进行。崇明产膜荚黄芪购自上海市药材公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Nucleosil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-

水=1:2;流速为 0.8 mL/min;检测波长为 205 nm;纸速度为 0.4 mm/min。

2.2 标准曲线制作:精密称取黄芪甲苷标准品 2.128 mg,加流动相定容至 2 mL,配制或 1.064 mg/mL 的标准品溶液,分别以 10、20、30、40、50 μL 进样测定,以峰面积对进样量作线性回归,得回归方程为 $Y = -5.6 \times 10^{-5} + 6.9365 \times 10^{-4} X$ (Y 为峰面积, X 为黄芪甲苷量), $r = 0.9994$,黄芪甲苷标准品在 10.64~53.20 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.3 样品提取方法的选择:用 3 种不同提取方法(索氏提取器提取 1 h;80℃温浸提取 1 h 和超声波提取 1 h)提取样品,后 2 种提取方法测得黄芪甲苷含量略低,故选用第一种方法。

2.4 流动相的选择:实验试用多种溶剂系统,最后确定以乙腈-水=1:2 为流动相,黄芪甲苷分离效果最好,保留时间也较适宜。

色谱图见图 1(A、B、C)。

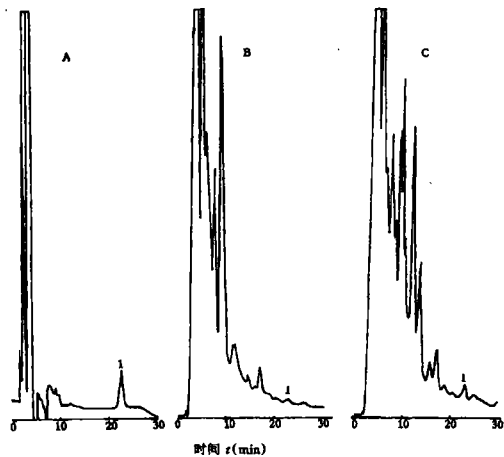
2.5 样品液制备:精密称取黄芪毛状根粉状 5.00 g,置索氏提取器中用 100 mL 80%甲醇提取 2 h,提取液减压蒸去甲醇,用 20 mL 正丁醇分配 3 次,合并正丁醇部分,减压蒸干,残渣用重蒸甲醇定容至 2 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液用于 HPLC 分析,每次进

* Address: Zheng Zhiren, College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shanghai

郑志仁 男,1994 年 7 月毕业于华东师范大学生物系,获理学硕士学位,1997 年 7 月毕业于上海中医药大学中药系,获医学博士学位,1997 年至今为中国科学院上海植物生理研究所博士后。

[△]国家自然科学基金,上海市科委和教委资助项目

样 10 μ L。



A-标准品 B-毛状根 C-生药 1-黄芪甲苷

图 1 黄芪甲苷 HPLC 图谱

2.6 加样回收率试验:称取已知黄芪甲苷含量的黄芪毛状根粉 5.00 g 3 份,分别精密加入黄芪甲苷标准品 2.00 mg,按样品制备方法提取样品并进行定量分析,将测定结果扣除样品中黄芪甲苷含量,与加入标准品的比为加样回收率。结果为 92.66%($n=3$)。

2.7 精密度试验:取同一样品液,重复进样 5 次,根据测得的样品中黄芪甲苷的浓度(μ g/mL)计算其相对标准偏差为 2.40%。

又取同一样品 5 份,制备 5 份样品液,分别进样测出黄芪甲苷的浓度,计算其相对标准偏差为 4.20%。

2.8 毛状根及生药中黄芪甲苷的定量分析:依法测定黄芪毛状根及崇明黄芪中黄芪甲苷

的含量,结果见表 1。

表 1 毛状根及干燥根中黄芪甲苷的含量

样品	黄芪甲苷(mg/g)
干燥根	0.15
毛状根	0.14

3 讨论

黄芪甲苷是黄芪的主要有效成分之一^[8,9],为定量分析黄芪毛状根中黄芪甲苷的含量,本实验建立了黄芪甲苷的 RP-HPLC 测定法,测得黄芪毛状根中黄芪甲苷的含量为 0.14%(干重),与其亲本植物(崇明产膜荚黄芪)根中含量(0.15%)相近。

目前,黄芪甲苷常用的定量测定方法为薄层扫描法^[10~12]和比色法^[13]。本实验建立的 RP-HPLC 测定法加样回收率高,精密度试验相对标准偏差小,测试数据更可靠。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典(一部). 广州:广东科技出版社, 1995:271
- 2 张银娣,等. 药学学报,1984,19(5):333
- 3 张银娣,等. 南京医学院学报,1984,(4):225
- 4 张银娣,等. 药学学报,1984,19(8):619
- 5 尤丽芬,等. 中国免疫学杂志,1990,6(1):60
- 6 张银娣,等. 药学学报,1992,27(6):401
- 7 郑志仁,等. 植物生理学通讯,1997,33(2):133
- 8 Hirofumi M, et al. Phytochemistry, 1994,36(3):665
- 9 Hirofumi M, et al. Phytochemistry, 1994,37(5):1403
- 10 鲁 静,等. 中成药,1992,14(6):34
- 11 曹正中,等. 药物分析杂志,1998,8(3):176
- 12 李连达,等. 中国中药杂志,1991,16(2):90
- 13 俞家华,等. 中药通报,1986,11(9):38

(1998-12-2 收稿)

Determination of Astragaloside IV in the Hairy Root Cultures of Membranous Milkvetch (*Astragalus membranaceus*) by RP-HPLC

Zheng Zhiren, Song Chunqing, Liu Di, et al. (Laboratory of Biotechnology of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shanghai, 200032)

Abstract An accurate HPLC method for the determination of astragaloside IV in the hairy root cultures of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge was developed. Calibration graphs was rectilinear between 10.64 μ g and 53.20 μ g under the experimental conditions. The recovery was 92.66%. The relative standard deviations (RSDs) of measurement precision test were 4.20% and 2.40%. The astragaloside IV content measured in the hairy root cultures was 0.14% (dry weight).

Key words RP-HPLC *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge hairy roots astragaloside IV