

不同加工方法的蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素定量分析

孙玉平¹, 龚苏晓², 曹 煌³, 游飞祥¹, 张铁军^{2*}, 陈常青^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津医科大学, 天津 300070

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定蒙古黄芪药材中的毛蕊异黄酮苷和芒柄花素量的方法, 考察不同产地、加工方法、栽培年限对蒙古黄芪质量的影响。方法 色谱柱为 Dikma C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 260 nm; 柱温 30 °C。结果 通过对蒙古地区 11 个不同产地的 40 批次蒙古黄芪药材进行分析, 比较毛蕊异黄酮苷和芒柄花素量得出, 蒙古黄芪的产地加工方式最佳为清洗后自然晾晒干燥; 巴彦淖尔市乌拉特中旗明安镇头份子地区为蒙古黄芪最佳栽培种植基地; 生长年限二年、三年的蒙古黄芪栽培品种质量差异不大; 蒙古黄芪野生品种质量优于栽培品种。结论 该方法简单快捷, 适合于黄芪中异黄酮类化合物的定量测定研究, 为今后蒙古黄芪药材的栽培种植和加工方式合理标准的制定提供科学、可靠的依据。

关键词: 蒙古黄芪; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花素; 高效液相色谱; 加工方式

中图分类号: R282.4 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)11-1678-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.022

Quantitative analysis of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* by different processing methods

SUN Yu-ping¹, GONG Su-xiao², CAO Huang³, YOU Fei-xiang¹, ZHANG Tie-jun², CHEN Chang-qing²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective An HPLC method was established to determine the content of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. To study the influence of habitats, processing methods, and planting ages on the quality of *A. membranaceus* var. *mongholicus*. **Methods** The HPLC condition was as follows: column: Dikma C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase: Acetonitrile-0.2% formic acid (gradient elution); flow speed: 1.0 mL/min; detection wavelength: 260 nm; temperature of column: 30 °C. **Results** Comparing the content of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in 40 samples of *A. membranaceus* var. *mongholicus* from 11 different habitats, we could get the following: The processing methods of *A. membranaceus* var. *mongholicus* were cleaning and natural drying; Bayinnaoer city Wu Qianqi ming'an town head part was the best habitat for *A. membranaceus* var. *mongholicus*. The quality of *A. membranaceus* var. *mongholicus* cultivars grown for two years and three years had no difference. The quality of wild species was superior cultivars. **Conclusion** The method is simple and rapid for determination, the contents of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in *A. membranaceus* var. *mongholicus*. It can be used as a scientific and reliable basis for formulating the reasonable standard of cultivating and processing methods of *A. membranaceus* var. *mongholicus*.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao.; calycosin-7-O-β-D-glucoside; formononetin; HPLC; processing methods

收稿日期: 2015-02-16

基金项目: 国家科技支撑项目子课题——蒙古黄芪特色产品的综合开发、药材及饮片商业标准研究(2011BAI07B01)

作者简介: 孙玉平(1988—), 女, 天津中医药大学中药学专业硕士研究生, 主要从事中药新药研发。

Tel: (022)23006843 E-mail: sunyuping05@126.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiezheng4@sina.com

陈常青 Tel: (022)23006829 E-mail: chencq@tjpr.com

黄芪 *Astragali Radix* 为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 或膜黄芪 *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、脱毒排脓、敛疮生肌等功效^[1]。异黄酮类化合物是黄芪的主要药效成分之一, 已有研究表明, 异黄酮类成分具有调节免疫、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗心肌缺血、防止动脉粥样硬化、保肝、抗炎、抗突变抗辐射、抗心律失常、抗病毒、抗细胞凋亡等作用^[2-3]。《中国药典》2010年版一部也首次把黄芪中的异黄酮类成分——毛蕊异黄酮苷列入质量控制指标。文献报道, 黄芪中异黄酮类化合物主要由异黄酮和异黄酮苷两类成分组成, 分别以毛蕊异黄酮苷和芒柄花素为主要代表成分^[4]。不同的产地加工方式可能对蒙古黄芪质量有一定影响^[5]。本实验采用 HPLC 法测定不同加工方式的蒙古黄芪中毛蕊异黄酮苷、芒柄花素的量, 通过大量样本的分析, 对黄芪加工方式进行优选, 同时对黄芪的栽培种植产地进行优选。

蒙古黄芪是黄芪的重要基原植物之一。有关蒙古黄芪的文献报道很多, 但未见有关同时测定蒙古黄芪中上述 2 种成分并以这 2 种成分为质控指标的报道。内蒙古为蒙古黄芪的主要产地之一, 本实验建立了 HPLC 法同时测定蒙古黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素定量测定方法, 通过对内蒙古地区 11 个不同产地的 40 批次黄芪药材进行定量分析, 分别阐明不同产地、不同加工方法、不同栽培年限黄芪药材质量差异, 同时考察野生品种和栽培品种之间的质量差异。为今后蒙古黄芪中异黄酮类成分质量标准的制定以及蒙古黄芪加工方法、栽培种植产地的优选提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪 (四元梯度泵, VWD 检测器, 美国安捷伦公司); HS3120 超声波清洗器 (奥赛特塞恩思仪器有限公司); 十万分之一天平 (BP211D, 德国赛多利斯公司)。

毛蕊异黄酮苷 (批号 111920-201102)、芒柄花素 (批号 111703-201204) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 11 个产地 40 批次蒙古黄芪药材 (内蒙古农户种植) 由天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定均为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 的干燥根, 不同批次药材见表 1。乙腈 (色谱纯), 娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

表 1 样品来源

Table 1 Sample source

样品编号	来源
1	呼和浩特市武川县得胜沟乡酒馆村 (三年)
2	包头市固阳县兴顺西乡朱换地村
3	呼和浩特市武川县得胜沟乡酒馆村 (二年)
4	巴彦淖尔市乌拉特中旗明安镇头份子村
5	包头市达茂旗乌克忽洞乡水龙滩
6	呼和浩特市武川县哈拉合少乡
7	巴彦淖尔市乌拉特中旗朝阳乡银匠窑子村
8	包头市固阳县下湿壕乡前店村
9	赤峰市翁牛特旗
10	赤峰市敖汉旗
11	赤峰市林东县巴林左旗
12	锡盟郭勒盟正蓝旗 (栽培)
13	锡盟郭勒盟正蓝旗 (野生)

2 方法与结果

2.1 加工方法

蒙古黄芪采用的加工方法主要分为 2 步, 先清洗或不清洗, 然后热风 70 °C 干燥或自然晾晒干燥。

2.2 色谱条件^[5]

Dikma C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 260 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~20 min, 20%~40%乙腈; 20~35 min, 40%乙腈; 色谱图见图 1。

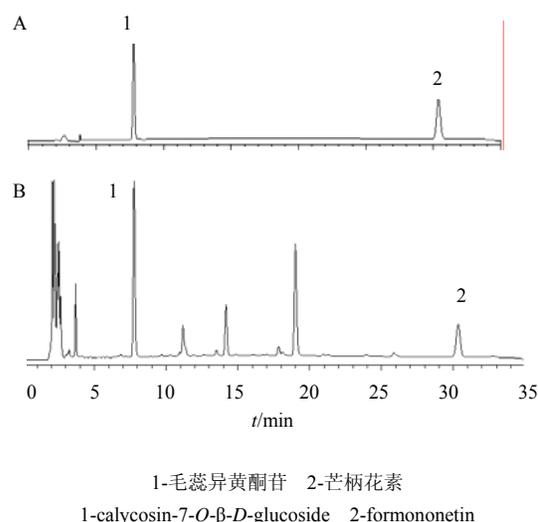


图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and samples (B)

2.3 对照品溶液的配制

精密称取毛蕊异黄酮苷、芒柄花素对照品适量，加甲醇制成含毛蕊异黄酮苷 41.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芒柄花素 16.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的配制

取蒙古黄芪药材粉末约 1 g，精密称定，置 100 mL 圆底烧瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定质量，加热回流 4 h，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，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 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，备用。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下制备的毛蕊异黄酮苷、芒柄花素对照品溶液 2、5、10、12、15、20 μL ，注入液相色谱仪。以进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得回归方程为毛蕊异黄酮苷 $Y=110.3 X+405$ ， $r=0.999 9$ ，表明进样量在 83.84~838.4 ng 呈良好的线性关系。芒柄花素 $Y=106.3 X-66.82$ ， $r=0.999 8$ ，表明进样量在 32.96~329.6 μg 呈良好的线性关系。

2.5.2 精密度试验 取对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测定毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的峰面积，计算毛蕊异黄酮苷峰面积 RSD 为 0.68%，芒柄花素峰面积 RSD 为 0.73%，表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取供试品按“2.3”项下方法制成供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、16、24 h 测定，结果显示，毛蕊异黄酮苷色谱峰面积的 RSD 为 1.42%，芒柄花素色谱峰面积的 RSD 为 1.13%，表明样品在 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批号供试品 6 份，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液并测定，结果毛蕊异黄酮苷平均质量分数为 0.493 0 mg/g，RSD 为 2.56%；芒柄花素平均质量分数为 0.086 3 mg/g，RSD 为 2.06%。

2.5.5 加样回收率试验 取同一批号已测定的供试品 6 份，每份约 0.5 g，精密称定，置 100 mL 圆底烧瓶中，分别精密加入 2 mL 毛蕊异黄酮苷对照品溶液（质量浓度为 123.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、2 mL 芒柄花素对照品溶液（浓度为 21.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），置 100 mL 圆底烧瓶中，精密加入甲醇 46 mL，按“2.4”项下方法制成供试品溶液，按“2.2”项下方法进行测定，用

外标法计算其量及加样回收率，结果毛蕊异黄酮苷的平均回收率为 99.07%，RSD 为 1.90%，芒柄花素的平均回收率为 98.84%，RSD 为 1.05%。

2.6 样品测定结果

取上述 40 批次蒙古黄芪供试品，按“2.4”项下方法制备供试品溶液并测定，结果见表 2。

2.6.1 不同加工方法对蒙古黄芪样品中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的影响 结果显示，8 批不同产地样品中，清洗样品中毛蕊异黄酮苷、芒柄花素均低于不清洗样品，毛蕊异黄酮苷降低 3.18%~10.7%，芒柄花素降低 0.24%~10.6%，表明清洗对 2 种成分的量会造成一定的损失。11 批不同产地样品中，热风干燥样品中毛蕊异黄酮苷、芒柄花素量均低于自然干燥样品，毛蕊异黄酮苷降低 6.23%~16.49%，芒柄花素降低 4.16%~14.27%，表明热风烘干对 2 种成分的量会造成一定的损失。同一产地不同加工方法的蒙古黄芪样品质量有差异，毛蕊异黄酮苷和芒柄花素量有差异：清洗低于不清洗，差异绝大多数在 10% 以内可控；烘干低于自然干燥，差异在 16% 以内。考虑到清洗可去除大量杂质，蒙古黄芪的产地加工方式最佳为清洗后自然晾晒干燥。

2.6.2 不同产地对蒙古黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的影响 《中国药典》2010 年版规定以毛蕊异黄酮苷量为指标，不低于 0.02%，实验所测得的 11 个产地 40 批蒙古黄芪药材毛蕊异黄酮苷量均符合《中国药典》规定，其中量最高的产地为巴彦淖尔市乌拉特中旗明安镇头份子村。以芒柄花素量为指标，质量分数最高的产地为巴彦淖尔市乌拉特中旗朝阳乡银匠窑子村，因此巴彦淖尔市为蒙古黄芪的最佳栽培区。

2.6.3 不同年限对蒙古黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的影响 对呼和浩特市武川县得胜沟乡酒馆村的生长年限二年和三年蒙古黄芪栽培品进行比较，在加工方式一致的基础上，生长年限三年的毛蕊异黄酮苷量有 2 批略高于二年生的，其余 2 批三年生毛蕊异黄酮苷量略低于二年生的；芒柄花素量二年生的均略高于三年生的，可以得出生长年限二年、三年黄芪所含的毛蕊异黄酮苷和芒柄花素量差异不大，基本趋于一致。

2.6.4 栽培和野生对蒙古黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素量的影响 对锡盟郭勒盟正蓝旗野生品种和栽培品种黄芪进行比较（均为二年生），野生品种黄芪所含的毛蕊异黄酮苷和芒柄花素量均高于栽培品种，可以得出蒙古黄芪野生品种优于栽培品种。

表2 不同加工方式蒙古黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的测定 (n = 3)

Table 2 Determination of calycosin-7-O-β-D-glucoside and formononetin in crude drugs of *A. membranaceus* var. *mongholicus* by different processing methods (n = 3)

样品编号	加工方法	质量分数/%		样品编号	加工方法	质量分数/%	
		毛蕊异黄酮苷	芒柄花素			毛蕊异黄酮苷	芒柄花素
1	清洗热风干燥	0.054 3	0.011 43	6	清洗热风干燥	0.051 6	0.009 98
	清洗自然干燥	0.063 2	0.012 91		清洗自然干燥	0.057 4	0.011 21
	不清洗热风干燥	0.058 7	0.012 56		不清洗热风干燥	0.053 7	0.010 75
	不清洗自然干燥	0.069 6	0.013 57		不清洗自然干燥	0.064 3	0.012 54
2	清洗热风干燥	0.052 1	0.006 04	7	清洗热风干燥	0.080 6	0.018 92
	清洗自然干燥	0.060 5	0.006 72		清洗自然干燥	0.089 5	0.021 09
	不清洗热风干燥	0.057 6	0.006 58		不清洗热风干燥	0.083 9	0.019 54
	不清洗自然干燥	0.066 3	0.007 15		不清洗自然干燥	0.095 1	0.021 56
3	清洗热风干燥	0.056 4	0.012 68	8	清洗热风干燥	0.034 9	0.005 53
	清洗自然干燥	0.061 0	0.013 23		清洗自然干燥	0.039 5	0.006 16
	不清洗热风干燥	0.060 7	0.012 71		不清洗热风干燥	0.037 4	0.005 70
	不清洗自然干燥	0.067 8	0.014 56		不清洗自然干燥	0.042 8	0.006 41
4	清洗热风干燥	0.118 9	0.013 81	9	热风干燥	0.046 6	0.004 98
	清洗自然干燥	0.126 8	0.015 67		自然干燥	0.050 2	0.005 71
	不清洗热风干燥	0.122 8	0.014 58	10	热风干燥	0.062 3	0.010 54
	不清洗自然干燥	0.140 7	0.016 09		自然干燥	0.068 1	0.011 50
5	清洗热风干燥	0.105 5	0.018 12	11	热风干燥	0.068 6	0.011 67
	清洗自然干燥	0.119 1	0.019 80	自然干燥	0.077 7	0.012 34	
	不清洗热风干燥	0.114 9	0.019 33	12	未加工	0.054 3	0.002 82
	不清洗自然干燥	0.131 5	0.020 45	13	未加工	0.063 2	0.015 04

3 讨论

本实验中的 HPLC 测定条件是在《中国药典》2010 年版黄芪项下测定毛蕊异黄酮苷的液相条件基础上确定的, 该方法可同时对毛蕊异黄酮苷和芒柄花素进行测定。

通过对内蒙古不同加工方式、不同地区、不同采收年限蒙古黄芪样本的测定研究, 为蒙古黄芪产地加工方式、栽培种植蒙古黄芪的适生区提供了理论根据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 陈建真, 吕圭源, 叶 磊, 等. 黄芪黄酮的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1314-1316.

[3] 赵四清, 周日宝, 陈胜璜, 等. 不同的产地加工方法对中药材金樱子质量的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 2005, 25(3): 21-22.

[4] 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.

[5] 涂天智, 沈剑刚, 蒋建勤. 内蒙黄芪的化学成分研究 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(5): 466-468.

[6] 贺云彪, 黄兰芳, 胡 伟, 等. 高效液相色谱测定黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(4): 1541-1545.