

一测多评法测定黄芪中异黄酮及苷类成分

郑云枫^{1,2}, 李 洋¹, 段伟萍¹, 赵晨光¹, 孙 捷¹, 李存玉^{1,2}, 彭国平^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 采用一测多评(QAMS)法同时测定黄芪中 6 个异黄酮及苷类成分的含量, 并验证方法在黄芪质量评价中应用的可行性与适用性。方法 采用 HPLC-UV 法建立丙二酰毛蕊异黄酮苷(CYM)、芒柄花苷(FMG)、丙二酰芒柄花苷(FMM)、毛蕊异黄酮(CY)及芒柄花素(FM)与内参物毛蕊异黄酮 7-O-β-D 糖苷(CYG)的相对校正因子($f_{s/i}$), 并在不同色谱仪和色谱柱上考察各成分相对校正因子的稳定性和耐用性, 比较 QAMS 法和外标法测定结果的差异。结果 在优化色谱条件下, 确立的 $f_{s/i}$ 分别为 $f_{CYM/CYG}=0.96$ 、 $f_{FMG/CYG}=0.84$ 、 $f_{CY/CYG}=0.68$ 、 $f_{FMM/CYG}=0.86$ 、 $f_{FM/CYG}=0.53$, $f_{s/i}$ 在 3 种 HPLC 色谱仪/3 个品牌 C₁₈ 柱、不同体积流量(0.9、1.0、1.1 mL/min)和不同柱温(25、30、35 °C)下的 RSD 分别为 0.88%~1.63%、0.23%~0.73%、0.15%~0.46%, 表明相对校正因子的耐用性良好。分别采用外标法(ESM)和 QAMS 法对 16 批黄芪药材和 3 批饮片 6 个异黄酮及苷类成分进行含量测定, 2 种方法所得结果的相对误差均<5.0%, 无显著性差异, 表明建立的 QAMS 法的准确度良好。结论 建立同时测定黄芪中 6 个异黄酮及苷类化学成分的 QAMS 方法准确可靠, 能为更加全面地评价黄芪药材及饮片的质量提供参考。

关键词: 黄芪; 异黄酮; 一测多评法; 毛蕊异黄酮 7-O-β-D 糖苷; 丙二酰毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 丙二酰芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)10-3104-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.029

Determination of isoflavonoids and glycosides in *Astragali Radix* by QAMS method

ZHENG Yun-feng^{1,2}, LI Yang¹, DUAN Wei-ping¹, ZHAO Chen-guang¹, SUN Jie¹, LI Cun-yu^{1,2}, PENG Gou-ping^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish a quantitative determination analysis for six isoflavonoid components in Huangqi (*Astragali Radix*) based on multi-component by a single-marker (QAMS) method. The feasibility and technical adaptability of this approach were investigated in quality evaluation of *Astragali Radix*. **Methods** Five isoflavonoids, calycosin-7-O-glycoside-6''-O-malonate (CYM), formononetin-7-O-glycoside (FMG), formononetin-7-O-glycoside-6''-O-malonate (FMM), calycosin (CY) and formononetin (FM) were used as index components to establish the relative correction factor (RCFs) between each component and internal reference substance calycosin-7-O-β-D-glycoside (CYG). The robustness and durability of the measured RCFs of the five components were evaluated on different analytical columns and HPLC instruments. And the measurement result deviation was compared between QAMS method and the external standard method (ESM). **Results** Under the established chromatographic conditions, the RCFs of $f_{CYM/CYG}$, $f_{FMG/CYG}$, $f_{CY/CYG}$, $f_{FMM/CYG}$, $f_{FM/CYG}$ were determined as 0.96, 0.84, 0.68, 0.86 and 0.53, respectively. The relative standard deviations (RSD) of their RCFs on three brands of column and HPLC instruments were 0.88%—1.63%, 0.23%—0.73% and 0.15%—0.46%, respectively at different flow rates (0.9 mL/min, 1.0 mL/min, 1.1 mL/min) and different column temperatures (25, 30, 35 °C), indicating the good durability of the RCFs. The present QAMS method and the ESM method were both used to determine the contents of six isoflavonoids from *Astragali Radix* in 16 batches of crude materials and three batches

收稿日期: 2020-08-09

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JS-34)

作者简介: 郑云枫(1979—), 博士, 副教授, 研究方向为中药制剂工艺与质量评价。Tel: (025)86798186 E-mail: zyunfeng@njucm.edu.cn

*通信作者: 彭国平, 博士, 教授, 研究方向为中药化学与分析。Tel: (025)86798186 E-mail: guopingpeng@126.com

of decoction pieces. The RSD of content results between two methods were less than 5.0%. It demonstrated that there was no significant difference from content results between these two methods, exhibiting good accuracy of the present QAMS method.

Conclusion The present QAMS analytical method for simultaneous determination of six isoflavonoids in *Astragali Radix* provides a more efficient method to evaluate the comprehensive quality of *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; isoflavonoids; QAMS method; calycosin-7-O- β -D-glycoside; calycosin-7-O-glycoside-6''-O-malonate; formononetin-7-O-glycoside; formononetin-7-O-glycoside-6''-O-malonate; calycosin; formononetin

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1], 具有补气升阳、固表止汗之功效。现代研究表明, 黄芪中含有丰富的异黄酮类活性成分, 具有抗氧化^[2-3]、抗炎^[4-5]、免疫调节^[6-7]、抗衰老^[8]等活性, 是黄芪中主要活性成分类型之一, 现行多个国家及地区的药典亦把异黄酮成分作为黄芪药材质量评价的指标。《中国药典》2015 年版黄芪药材及饮片项下将毛蕊异黄酮 7-O- β -D-葡萄糖苷 (calycosin-7-O-glycoside, CYG) 作为异黄酮类成分含量测定的指标^[1]; 《美国药典》2017 年版将 CYG、芒柄花苷 (formononetin-7-O-glycoside, FMG)、毛蕊异黄酮 (calycosin, CY) 及芒柄花素 (formononetin, FM) 4 个成分作为黄芪药材项下异黄酮类含量测定指标, 并规定了总含量限度不得低于 0.03%^[9]。值得注意的是, 黄芪药材及饮片中除了以上几种常见的异黄酮成分外, 亦含有丙二酰毛蕊异黄酮苷 (calycosin-7-O-glycoside-6''-O-malonate, CYM)、丙二酰芒柄花苷 (formononetin-7-O-glycoside-6''-O-malonate, FMM) 等含量高, 且具有生理活性的丙二酰基异黄酮苷成分^[10-11]。因此, 仅以 CYG 等单一或几个异黄酮成分作为含量测定指标, 尚不能全面反映黄芪的内在质量, 应综合考虑丙二酰异黄酮苷成分修订黄芪质量控制方法。

已有文献对黄芪中异黄酮类成分开展了质量控制研究, 采用 HPLC-UV、LC-MS/MS 等建立了以异黄酮单一或多指标的定性/定量检测方法^[12-14]。研究发现, 虽然药材中 CYM 含量较高, 但它的结构并不十分稳定, 在较高温度条件下提取或长期存放过程中容易脱乙酰基转化成相应的异黄酮苷, 由于对照品制备困难, 因此在已有的研究中往往采用长时间回流转化法^[1]或峰面积归一化法^[15-16]等进行分析, 方法的效率及耐用性不高, 含量测定结果的准确度亦受影响, 因而其质量控制方法仍有待进一步的完善。

本研究在现有文献以及前期黄芪丙二酰基异黄酮苷化学成分研究的基础上, 首次以 CYG 为内参物, 从供试品溶液制备、色谱条件优化、方法学考察及相对校正因子等多个方面, 建立同步测定黄芪药材及饮片中 CYM、FMM、CYG、FMG、CY 及 FM6 种异黄酮类成分的一测多评 (quantitative determination analysis multi-component by a single-marker, QAMS) 质量控制方法。该法检测成本低, 耐用性强、重现性好、准确度高, 可以为黄芪药材及饮片质量标准的制订或修订提供技术依据, 并可为黄芪的品质评价、生产加工以及资源开发等研究提供支撑。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 2998 PDA 检测器, Empower 色谱工作站 (美国 Waters 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪, VWD 紫外检测器, Agilent Chemstation 色谱工作站 (美国 Agilent 公司); Thermo U 3000 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Chromeleon TM 7 色谱工作站 (Thermo 公司); 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m): Waters Symmetry C₁₈、Thermo Hypersil ODS、Vensil XBP C₁₈、Phenomenex luna C₁₈、Kromasil C₁₈、Hedra C₁₈、Agilent Eclipse XDB C₁₈、Boston Green ODS; MS-105DU 电子天平 (十万分之一, 梅特勒-托利多仪器有限公司); KH-500DB 数控超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂

CYG (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、FM (批号 111703-201504, 质量分数 $\geq$ 98%) 均购于中国食品药品检定研究院。FMG (批号 JBZ-0778, 质量分数 $\geq$ 98%), CY (批号 JBZ-0786, 质量分数 $\geq$ 98%) 均购于南京金益柏生物科技有限公司。CYM、FMM 对照品均由实验室自制^[17], 经 HPLC 分析, 质量分数 $\geq$ 98%; 乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲醇 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 甲酸 (色谱纯, Merck

公司);超纯水(Milli-Q超纯水系统制备)。

16批黄芪药材采集于山西大同浑源县、内蒙古包头固阳县、内蒙古通辽开鲁县、陕西榆林子洲县、甘肃定西岷县药材种植基地,3批黄芪饮片购自安徽亳州药材市场及南京药店。黄芪药材由

南京中医药大学中药鉴定教授刘训红教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,信息见表1。

表1 黄芪药材及饮片样品采集信息

Table 1 Specific information of collected *Astragali Radix* and decoction pieces

编号	采集(购买)地点	基原	数量/批次	采集时间
SX-1、SX-2	山西大同浑源县	蒙古黄芪(药材)	2	2018-10
SX-3、SX-4	山西大同浑源县	蒙古黄芪(药材)	2	2019-10
NM-1、NM-2	内蒙古包头固阳县	蒙古黄芪(药材)	2	2019-10
NM-3、NM-4	内蒙古通辽开鲁县	蒙古黄芪(药材)	2	2019-10
SHX-1、SHX-2、SHX-3	陕西榆林子洲县	蒙古黄芪(药材)	3	2018-10
GS-1、GS-2、GS-3	甘肃定西岷县	蒙古黄芪(药材)	3	2018-03
MJ-1	内蒙古通辽开鲁县	膜荚黄芪(药材)	1	2018-10
MJ-2	山西大同浑源县	膜荚黄芪(药材)	1	2019-10
AH-1、AH-2	安徽亳州药材市场	—(饮片)	2	2019-09
YD-1	南京益丰大药房	—(饮片)	1	2019-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈(A)和0.2%甲酸(B); 梯度洗脱: 0~25 min, 15%~32% A; 25~50 min, 32%~62% A; 检测波长260 nm; 体积流量1.0 mL/min; 柱温30℃, 进样量10 μL。在当前色谱条件下, 各色谱峰分离度>1.5, 拖尾因子≈1.00, 见图1。

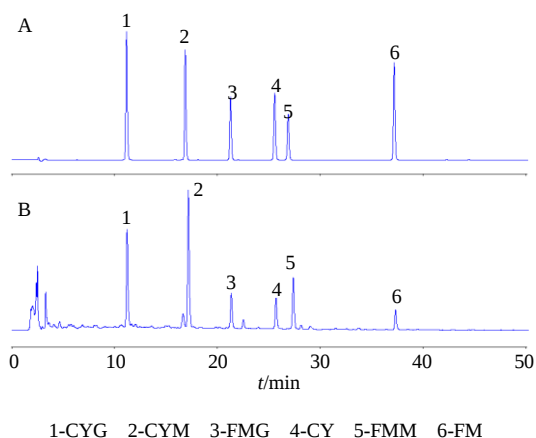


图1 黄芪混合对照品(A)和样品(B)HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed references (A) and *Astragali Radix* samples (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取CYG、CYM、FMG、FMM、CY及FM对照品适量,置10 mL量瓶中,加甲醇(含0.1%甲酸)溶解并定容至刻度,配制成质量浓

度分别为209、176、96、87、76、95 μg/mL的混合溶液,即得1号混合对照品溶液。将1号混合对照品溶液依次稀释2.5、5、10、25、50、100倍,制备得2~7号混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

黄芪异黄酮含量测定提取方法常采用甲醇回流提取或超声提取,因此对2种提取方法及提取时间进行了考察:取本品粉末(过四号筛)约1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇(含0.1%甲酸)50 mL,称定质量,分别按回流提取和超声(功率250 W,频率40 kHz)2种方法分别提取0.5、1、2、4、6、8 h,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 mL,40℃条件下回收溶剂至干,残渣加甲醇(含0.1%甲酸)溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇(含0.1%甲酸)至刻度,摇匀,滤过,取续滤液进行HPLC分析,以6个成分的峰面积为指标,对不同提取方法及时间条件下的提取效果进行比较,见图2。

结果显示,在回流提取条件下随着提取时间的延长,2个丙二酰异黄酮苷CYM和FMM的峰面积明显下降,2个相应的异黄酮苷CYG和FMG的峰面积显著上升,但异黄酮苷元CY和FM的峰面积基本没有变化,推测应为丙二酰异黄酮苷在加热条件下转化为相应黄酮苷所致,与文献报道相一致^[13];而在超声提取条件下,6个异黄酮及苷类成分在8 h提取过程中峰面积的变

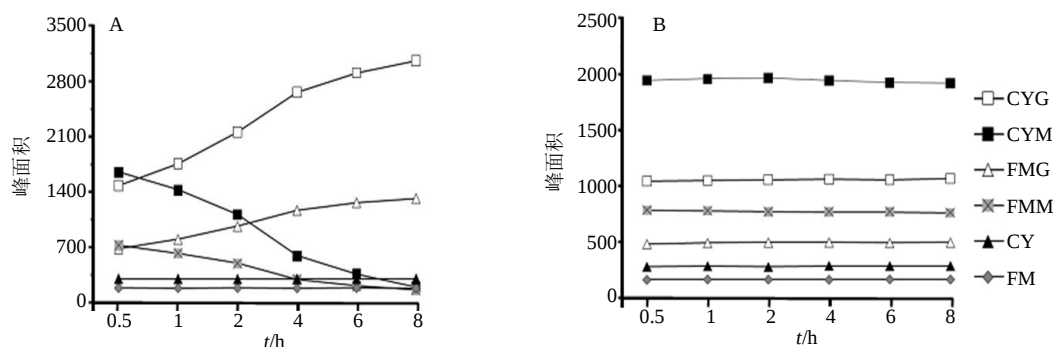


图2 甲醇回流提取 (A) 和超声提取 (B) 对黄芪供试品液中 6 个异黄酮及苷类成分峰面积变化的影响

Fig 2 Effects of methanol reflux extraction (A) and ultrasonic extraction (B) on peak area of six isoflavones and glycosides in *Astragali Radix* sample solution

化均不十分明显。因此,选择采用甲醇超声的方式提取样品,并进一步针对甲醇体积分数(20%、40%、60%、80%、100%),溶剂体积(25、50、75、100 mL)以及提取时间(15、30、45、60 min)进行了优选,结果显示,采用100%甲醇为提取溶剂时6个异黄酮及苷类成分提取率相对较高,而溶剂提取体积及提取时间对各成分提取效果影响不明显,最终确定了供试品溶液的制备方法,即取本品粉末(过四号筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇(含0.1%甲酸)50 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理0.5 h,取出,再称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 mL,

40 °C条件下回收溶剂至干,残渣加甲醇(含0.1%甲酸)溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇(含0.1%甲酸)至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围、检测限与定量限 将“2.2”项下制得的混合对照品溶液,每个浓度进样2针,分别测定6个异黄酮类成分峰面积,以每个成分质量浓度为横坐标(X),平均峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归处理,得到6个成分的回归方程、相关系数及线性范围。进一步以7号对照品液逐级稀释、测定,确定各成分的检测限及定量限,结果显示,6种异黄酮类成分在相应浓度范围内,线性关系良好,并具有较高的灵敏度,见表2。

表2 6种异黄酮成分的回归方程、线性范围和检测限、定量限

Table 2 Regression equations, linear range, limit of detection and limit of quantitation of six isoflavonoid components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
CYG	$Y=31.46 X-2.512$	0.999 9	2.09~209	0.026	0.105
CYM	$Y=31.87 X+5.052$	0.999 9	1.76~176	0.022	0.088
FMG	$Y=36.93 X+13.62$	0.999 8	0.96~96	0.024	0.096
CY	$Y=46.33 X+5.579$	0.999 8	0.87~87	0.022	0.087
FMM	$Y=35.58 X+3.043$	0.998 9	0.76~76	0.019	0.076
FM	$Y=58.04 X+1.492$	0.998 9	0.95~95	0.024	0.095

2.4.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析,连续进样6次,测得峰面积,计算质量分数RSD。结果CYG、CYM、FMG、FMM、CY及FM峰面积RSD分别为1.85%、0.77%、1.69%、1.13%、0.97%及0.88%。

取同一黄芪样品,依“2.1”项与“2.3”项下方法制备与分析,测得峰面积,计算质量分数RSD。结果CYG、CYM、FMG、FMM、CY及

FM峰面积RSD分别为1.47%、0.68%、1.05%、1.37%、0.55%、1.15%。表明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一混合对照品溶液,在0、2、4、6、8、10、12 h测得峰面积,计算质量分数RSD。结果CYG、CYM、FMG、FMM、CY及FM峰面积RSD分别为2.37%、1.00%、2.53%、1.66%、1.85%及1.66%。

取同一黄芪药材样品,依法制备与分析,在0、2、4、6、8、10、12 h测得峰面积,结果

CYG、CYM、FMG、FMM、CY 及 FM 质量分数 RSD 分别为 1.58%、1.28%、1.14%、1.76%、1.20%、0.99%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批次 (SX-3) 黄芪药材样品, 平行 6 份, 依“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 并计算各成分的平均质量分数及 RSD, 结果测得该批次黄芪药材样品的 CYG、CYM、FMG、FMM、CY 及 FM 的质量分数分别为 0.474、0.671、0.163、0.124、0.263、0.059 mg/g, RSD 分别为 0.93%、0.87%、1.21%、1.82、1.16%, 0.15%。表明方法的重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定的黄芪药材 (SX-3) 粉末 (过四号筛) 约 0.5 g, 精密称定,

平行 6 份, 分别按药材含量-对照品 (1:1) 加入一定量的对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算加样回收率, CYG、CYM、FMG、FMM、CY 及 FM 的加样回收率分别为 100.2%、97.4%、98.9%、101.5%、97.4%、98.2%, RSD 分别为 1.28%、1.07%、3.50%、1.54%、1.52%、2.93%。

2.5 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 的确定

2.5.1 相对校正因子的计算 按“2.2”项下方法制备 1~6 号混合对照品溶液, 依法测定 6 个成分的峰面积, 以 CYG 为参照物, 分别采用多点法和斜率法^[18]计算 CYG、FMG、CY、FMM 及 FM 相对于 CYG 的 $f_{CYM/CYG}$ 、 $f_{FMG/CYG}$ 、 $f_{CY/CYG}$ 、 $f_{FMM/CYG}$ 、 $f_{FM/CYG}$, 结果见表 3、4。

表 3 多点法测定的 $f_{s/i}$

Table 3 Relative correction factors (RCFs) calculated by multi-point method

编号	$f_{CYM/CYG}$	$f_{FMG/CYG}$	$f_{CY/CYG}$	$f_{FMM/CYG}$	$f_{FM/CYG}$
1	0.921	0.811	0.652	0.837	0.511
2	0.948	0.829	0.656	0.840	0.526
3	0.951	0.833	0.674	0.842	0.523
4	0.970	0.852	0.686	0.852	0.530
5	0.977	0.861	0.683	0.877	0.532
6	0.998	0.869	0.698	0.906	0.558
均值	0.961	0.843	0.675	0.859	0.530
RSD/%	2.78	2.61	2.65	3.15	2.96

表 4 斜率法测定的 $f_{s/i}$ ($n=6$)

Table 4 Relative correction factors (RCFs) calculated by slope method ($n=6$)

指标	CYG (参照物)	CYM	FMG	CY	FMM	FM
斜率	31.46	31.47	36.93	46.33	35.58	58.04
r	0.999 9	0.999 9	0.999 8	0.999 8	0.999 9	0.999 9
f	—	0.987	0.852	0.679	0.884	0.542

结果显示, 采用多点法计算获得的 $f_{CYM/CYG}$ 、 $f_{FMG/CYG}$ 、 $f_{CY/CYG}$ 、 $f_{FMM/CYG}$ 、 $f_{FM/CYG}$ 分别为 0.961、0.843、0.675、0.859 及 0.530, 与斜率法计算的结果没有显著性差异, 两者的相对误差分别为 -2.73%、-1.11%、-0.65%、-2.93%、-2.24%, 均小于 3.0%, 表明两者 $f_{s/i}$ 均可采用。

2.5.2 不同高效液相色谱仪及色谱柱测得的相对校正因子比较 采用 Agilent 1100, Waters 2695, Thermo U3000 3 种不同高效液相色谱仪, 以 Thermo hypersil C₁₈、Waters symmetry C₁₈、Agela Vensil XBP C₁₈ 3 种不同品牌的色谱柱, 分别测定并计算各成分与 CYG 的 $f_{s/i}$, 结果显示 3 种品牌色谱柱在不同 HPLC 仪上所测定的 $f_{s/i}$ 的 RSD < 3.0%, 表明黄芪中 6 个异黄酮成分在不同高效液

相色谱仪及色谱柱上的耐用性较好, 见表 5。

2.5.3 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响 采用 Agilent 1100 色谱仪和 Thermo hypersil C₁₈ 色谱柱, 分别测定并计算不同柱温条件下 (25、30、35 °C) 各成分与 CYG 的 $f_{s/i}$, 计算 RSD。结果显示, $f_{CYM/CYG}$ 、 $f_{FMG/CYG}$ 、 $f_{CY/CYG}$ 、 $f_{FMM/CYG}$ 、 $f_{FM/CYG}$ 在不同温度条件下的 RSD 分别为 0.15%、0.34%、0.46%、0.32%、0.43%, 表明相对校正因子在温度 25~35 °C 的耐受性良好。

2.5.4 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响 采用 Agilent 1100 色谱仪和 Waters symmetry C₁₈ 色谱柱, 分别测定了不同体积流量条件下 (0.9、1.0、1.1 mL/min) 各成分与 CYG 的 $f_{s/i}$, 结果显示, $f_{CYM/CYG}$ 、 $f_{FMG/CYG}$ 、 $f_{CY/CYG}$ 、 $f_{FMM/CYG}$ 、 $f_{FM/CYG}$ 在

表 5 不同色谱柱在不同高效液相色谱仪条件下测得的 $f_{s/i}$

Table 5 RCFs measured by three C₁₈ columns on different HPLC instruments

仪器	色谱柱	$f_{CYM/CYG}$	$f_{FMG/CYG}$	$f_{CY/CYG}$	$f_{FMM/CYG}$	$f_{FM/CYG}$
Agilent 1100	Thermo hypersil C ₁₈	0.987	0.841	0.672	0.885	0.538
	Waters symmetry C ₁₈	0.994	0.846	0.675	0.880	0.540
	Agela Vensil XBP C ₁₈	0.983	0.839	0.672	0.893	0.535
Waters 2695	Thermo hypersil C ₁₈	0.985	0.838	0.675	0.884	0.541
	Waters symmetry C ₁₈	0.987	0.838	0.679	0.888	0.541
	Agela Vensil XBP C ₁₈	0.981	0.837	0.670	0.881	0.539
Thermo U3000	Thermo hypersil C ₁₈	0.969	0.807	0.660	0.856	0.532
	Waters symmetry C ₁₈	0.970	0.823	0.667	0.858	0.532
	Agela Vensil XBP C ₁₈	0.972	0.819	0.665	0.858	0.532
	均值	0.981	0.832	0.671	0.876	0.537
	RSD/%	0.88	1.54	0.90	1.63	0.72

不同体积流量下的 RSD 分别为 0.23%、0.64%、0.29%、0.58%、0.73%，表明 $f_{s/i}$ 在体积流量 0.9~1.1 mL/min 的耐受性良好。

2.5.5 待测成分色谱峰的定位 中药化学成分复杂，色谱图中除了待测成分峰外还存在其它色谱峰，因此待测成分色谱峰的准确定位是实现 QAMS 的前提。对黄芪样品中 6 个待测组分的保留时间进行了考察，采用与参照物的“保留时间差法”和

“相对保留时间法”进行了分析。结果显示，不同仪器和不同色谱柱对待测成分与参照物保留时间绝对差值的影响较大，RSD 超过 10%；相对而言，待测成分与参照物相对保留时间的差异较小（表 6），CYM、FMG、FMM、CY 及 FM 相对于 CYG 的相对保留时间（RT）均值分别为 1.497、1.823、2.200、2.311、3.202，RSD≤3.85%，表明采用待测组分与内参物相对保留时间值来定位具有可行性。

表 6 不同高效液相/不同色谱柱下各组分测得的相对保留时间

Table 6 Relative retention time measured in different instruments and columns

仪器	色谱柱	RT _{CYM/CYG}	RT _{FMG/CYG}	RT _{CY/CYG}	RT _{FMM/CYG}	RT _{FM/CYG}
Agilent 1100	Thermo hypersil C ₁₈	1.496	1.756	2.119	2.266	3.133
	Waters symmetry C ₁₈	1.505	1.895	2.274	2.391	3.303
	Agela Vensil XBP C ₁₈	1.423	1.751	2.154	2.184	3.008
Waters 2695	Thermo hypersil C ₁₈	1.510	1.771	2.148	2.291	3.169
	Waters symmetry C ₁₈	1.519	1.890	2.285	2.403	3.291
	Agela Vensil XBP C ₁₈	1.519	1.765	2.193	2.195	3.056
Thermo U3000	Thermo hypersil C ₁₈	1.520	1.789	2.167	2.331	3.232
	Waters symmetry C ₁₈	1.519	1.920	2.313	2.438	3.380
	Agela Vensil XBP C ₁₈	1.465	1.866	2.146	2.304	3.244
	均值	1.497	1.823	2.200	2.311	3.202
	RSD/%	2.20	3.76	3.25	3.85	3.78

2.5.6 样品含量测定及 QAMS 法的验证 按“2.3”项下方法，分别制备采集的 16 批不同产地黄芪药材以及 3 批市售饮片供试品溶液，依法测定，进一步采用外标法（external standard method, ESM）和 QAMS 法对所测得的数据分别进行含量计算，并以相对误差（relative error, RE）进行评价，以验证 QAMS 法测定上述 6 种异黄酮类成分含量的准确性，结果见表 7。结果显示，在 16 批不同产地来源药材及 3 批市售饮片均能测得 6 个异黄酮成分，其样品 ESM 法含量测定结果与 QAMS 法测得的结果相比差异较小，RE<5.0%，表明 QAMS 法检测的含量结果较为准确。

3 讨论

在前期研究及文献报道的基础上，首次建立了以 CYG 为内参物，同步测定 CYM、FMG、FMM、CY 及 FM 等 6 种异黄酮类成分的 QAMS 方法，该方法检测简便、耐用性好、准确度高、成本较低，可以为黄芪药材和饮片质量标准的修订提供技术依据。

3.1 分析方法的建立与优化

采用二极管阵列检测器，对 6 个异黄酮类成分进行了 200~400 nm 全波长扫描，结果显示 CYG、CYM、FMG、FMM、CY 和 FM 6 个成分的紫外光谱图十分相似，均在 248~258 nm 波长

表7 ESM法与QAMS法测定黄芪中6种异黄酮成分的含量 ($n=2$)Table 7 Content of six isoflavonoids in samples of *Astragali Radix* by QAMS and ESM ($n=2$)

编号	CYG/(mg·g ⁻¹)	CYM/(mg·g ⁻¹)			FMG/(mg·g ⁻¹)			CY/(mg·g ⁻¹)			FMM/(mg·g ⁻¹)			FM/(mg·g ⁻¹)		
		ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%	ESM	QAMS	RE/%
SX-1	0.453	0.192	0.194	1.1	0.454	0.457	0.5	0.482	0.484	0.5	0.345	0.347	0.5	0.115	0.116	0.5
SX-2	0.673	0.424	0.426	0.7	0.164	0.166	0.9	0.138	0.140	1.2	0.110	0.111	1.0	0.047	0.048	1.2
SX-3	0.474	0.671	0.673	0.3	0.163	0.164	0.6	0.124	0.125	0.8	0.263	0.268	1.9	0.059	0.060	1.7
SX-4	0.526	0.731	0.735	0.5	0.210	0.211	0.8	0.074	0.075	1.9	0.275	0.277	0.6	0.031	0.032	2.1
NM-1	0.723	0.457	0.460	0.6	0.253	0.255	0.7	0.141	0.142	1.1	0.121	0.122	1.0	0.061	0.062	1.3
NM-2	0.489	0.293	0.295	0.8	0.102	0.103	1.3	0.148	0.150	1.1	0.054	0.055	1.9	0.049	0.050	1.4
NM-3	0.280	0.227	0.229	1.0	0.072	0.073	1.7	0.203	0.205	0.9	0.065	0.066	1.6	0.093	0.094	0.6
NM-4	0.784	0.787	0.791	0.5	0.127	0.128	1.1	0.056	0.058	2.4	0.134	0.135	0.9	0.162	0.167	3.1
SHX-1	0.351	0.588	0.592	0.6	0.162	0.163	0.9	0.058	0.060	2.4	0.216	0.217	0.7	0.020	0.021	4.1
SHX-2	0.176	0.431	0.433	0.7	0.137	0.139	1.0	0.085	0.087	1.7	0.276	0.278	0.6	0.059	0.059	0.7
SHX-3	0.221	0.530	0.533	0.6	0.151	0.153	1.0	0.065	0.066	2.1	0.292	0.293	0.6	0.038	0.039	2.7
GS-1	0.306	0.419	0.422	0.7	0.087	0.089	1.4	0.319	0.321	0.7	0.147	0.148	0.9	0.179	0.180	0.4
GS-2	0.356	0.409	0.411	0.7	0.105	0.107	1.2	0.345	0.348	0.6	0.151	0.153	0.8	0.179	0.180	0.4
GS-3	0.314	0.264	0.266	0.9	0.163	0.164	0.9	0.124	0.126	1.3	0.127	0.128	0.9	0.086	0.087	1.2
MJ-1	0.231	0.170	0.172	1.2	0.117	0.118	1.1	0.219	0.221	0.8	0.087	0.088	1.3	0.109	0.110	0.5
MJ-2	0.563	0.646	0.650	0.5	0.204	0.205	0.8	0.131	0.132	1.2	0.252	0.254	0.6	0.057	0.058	1.5
AH-1	0.174	0.156	0.158	1.3	0.067	0.069	1.8	0.217	0.219	0.8	0.051	0.052	1.9	0.100	0.101	0.5
AH-2	0.151	0.130	0.132	1.5	0.052	0.053	2.2	0.102	0.104	1.5	0.054	0.055	1.9	0.044	0.045	0.9
YD-1	0.269	0.254	0.257	0.9	0.085	0.087	1.5	0.232	0.234	0.8	0.101	0.103	1.1	0.137	0.138	1.0

处有最大吸收。研究发现,在 254 nm 波长条件下 6 种待测成分的灵敏度均较好,且色谱图中基线平稳,具有良好的基线分离,可以满足定量分析的要求,因此,最终选择 254 nm 作为检测波长。

本实验对供试品溶液的提取方式进行了较为系统的考察,对提取方式(回流和超声)、提取溶剂(甲醇 20%、40%、60%、80%、100%),溶剂体积(25、50、75、100 mL)、提取时间(15、30、45、60 min)进行了考察,同时考虑到丙二酰基异黄酮成分中酯键的稳定性,在提取溶剂及供试品溶液甲醇中加入了 0.1%的甲酸,不仅可以降低丙二酰基异黄酮苷的降解转化,提升供试品溶液的稳定性,而且弱酸性条件还可以使得样品中异黄酮成分更好地呈现分子态,保证溶剂提取的效果。

本实验色谱条件优化过程中发现,不同型号 C₁₈ 色谱柱对异黄酮类成分的分离效果影响显著,在考察的已有 8 种型号色谱柱中,仅 Waters Symmetry C₁₈, Thermo Hypersil ODS, Agela Vensil XBP C₁₈ 3 种色谱柱可以实现对 6 个异黄酮组分的有效分离($R>1.5$),其余色谱柱的分离效果均不佳,尤其是不能将 CY 与 FMM 色谱峰分开,影响分析结果。从固定相填料性质上看,这 3 种型号均为硅胶基上硅醇基封端的 C₁₈ 填料,其稳定性及选择性较好,可作为黄芪质量分析用色

谱柱。

3.2 参照物的选择

参照 QAMS 法建立的技术指南^[19],内参物尽量选择在样品中含量较高,保留时间适中的有效成分,本实验选择 CYG 为内参物,主要考虑该物质在《中国药典》黄芪药材标准中已有使用,性质稳定且易于获得,故选其作为 QAMS 法的内参物。以 CYG 为参照物时,各成分 $f_{s/i}$ 的 RSD 均小于 3.5%,不同柱温、不同体积流量、不同色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响较小($RSD<3\%$),表明选择 CYG 作为内参物建立 QAMS 法可行。

3.3 黄芪中异黄酮类成分 QAMS 质量标准制定分析

本实验结果显示,黄芪中苷类成分(CYG、CYM、FMG、FMM)含量较高,而苷元(CY、FM)含量相对较低。值得注意的是,本实验研究中检测的 2018 年采集的 7 批药材成分含量与刚采集时测定的含量相比,CYG、CYM、FMG、FMM 含量发生了明显下降,而 CY 及 FM 含量显著上升,其苷类成分平均总含量与苷元成分平均总含量的比值为 3:1,明显要低于 2019 年采集的 9 批黄芪药材中两者 10:1 的比值。有学者研究发现^[20],在温度 37 ℃及润湿条件下,药材或饮片中丙二酰基异黄酮苷及异黄酮苷成分会发生酶解而转化生成异黄酮苷元,使得苷类成分含量下降而苷元成分显著升高。本研究中 2018 年采集药材存放时间较

长,且所在地区夏季湿润潮湿,易于酶解,这可能是导致该年度样本中异黄酮苷含量降低而异黄酮苷元含量相对升高的原因。

黄芪饮片在临床及制剂工艺中大多以水煎煮提取为主,其水提取物及配方颗粒中主要为 CYG 等苷类成分^[21],苷元因极性小基本不被水提取出,因此酶解过程很可能会影响到黄芪质量及临床疗效。这提示黄芪药材及饮片应避免在较高温度和湿度条件下长期存放,并在黄芪药材及饮片质量标准建立过程中,考虑将 CYG、CYM、FMG、FMM4 个异黄酮苷成分总量建立最低含量下限,并设立 CY 及 FM2 个苷元含量的上限值。同时,还应进一步对黄芪药材和饮片的干燥、储藏、加工等影响质量的关键因素进行考察,积累数据,为修订完善黄芪药材的标准奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 302.
- [2] Tang D, Shen Y B, Wang Z H, et al. Rapid analysis and guided isolation of *Astragalus* isoflavonoids by UHPLC-DAD-MSn and their cellular antioxidant defense on high-glucose-induced mesangial cell dysfunction [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(5): 1105-1113.
- [3] Zhang Q A, Fan X H, Zhang Z Q, et al. Extraction, antioxidant capacity and identification of *Semen Astragali Complanati* (*Astragalus complanatus* R. Br.) phenolics [J]. *Food Chem*, 2013, 141: 1295-1300.
- [4] Guo Z, Xu H Y, Xu L, et al. *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory and anti-inflammatory effects of total flavonoids of *Astragalus* [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016, 13(4): 60-73.
- [5] Choi S I, Heo T R, Min B H, et al. Alleviation of osteoarthritis by calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside (CG) isolated from *Astragali Radix* (AR) in rabbit osteoarthritis (OA) model [J]. *Osteoarthritis Cartil*, 2007, 15(9): 1086-1092.
- [6] Bratkov V M, Shkondrov A M, Zdraveva P K, et al. Flavonoids from the genus *astragalus*: Phytochemistry and biological activity [J]. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10(19): 11-32.
- [7] Kuo Y H, Tsai W J, Loke S H, et al. *Astragalus membranaceus* flavonoids (AMF) ameliorate chronic fatigue syndrome induced by food intake restriction plus forced swimming [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(1): 28-34.
- [8] 朱嘉欢, 黄小平, 邓常清. 黄芪和当归的主要活性成分配伍促进衰老造血干细胞增殖作用的研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 111-119.
- [9] The United States Pharmacopeial Convention. USP 40 [S]. 2017: 6812.
- [10] Zhang J, Xu X J, Xu W, et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix Astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(6): 945-952.
- [11] Huang X, Liu Y, Song F R, et al. Studies on principal components and antioxidant activity of different *Radix Astragali* samples using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2009, 78(3): 1090-1101.
- [12] 蔡海霞, 陈君, 李萍. 一测多评法测定黄芪中 4 种异黄酮的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(20): 2712-2717.
- [13] Lv Y W, Hu W, Wang Y L, et al. Identification and determination of flavonoids in *Astragali Radix* by high performance liquid chromatography coupled with DAD and ESI-MS detection [J]. *Molecules*, 2011, 16(3): 2293-2303.
- [14] Du H W, Zhao X L, Zhang A H, et al. Rapid separation, identification and analysis of *Astragalus membranaceus* Fisch using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(3): 226-231.
- [15] Song J Z, Yiu H H, Qiao C F, et al. Chemical comparison and classification of *Radix Astragali* by determination of isoflavonoids and astragalosides [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(2): 399-406.
- [16] Song J Z, Mo S F, Yip Y K, et al. Development of microwave assisted extraction for the simultaneous determination of isoflavonoids and saponins in *Radix Astragali* by high performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(6): 819-824.
- [17] Zheng Y F, Duan W P, Sun J, et al. Structural identification and conversion analysis of malonyl isoflavonoid glycosides in *Astragali Radix* by HPLC coupled with ESI-Q TOF/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(21): E3929.
- [18] 赵一懿, 郭洪祝, 陈有根, 等. 中药多组分含量测定中相对校正因子计算方法的比较与建议 [J]. *中国药品标准*, 2014, 15(4): 245-251.
- [19] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 657-658.
- [20] Du X G, Bai Y J, Wang B, et al. Analysis of principal isoflavone glycosides and aglycone in *Radix Astragali* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2008, 17: 230-235.
- [21] 王谦, 赖慧, 陈立, 等. 高效液相色谱法测定 3 种剂型黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量 [J]. *中国药业*, 2019, 28(6): 23-26.

[责任编辑 时圣明]