

## 黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定

丁慧<sup>1</sup>, 许纪锋<sup>1</sup>, 沈君子<sup>1</sup>, 王改香<sup>2</sup>, 张田勇<sup>3</sup>, 钱勇<sup>3\*</sup>, 谢天培<sup>3</sup>

(1. 上海佰年诗丹德检测技术有限公司, 上海 201203; 2. 上海相宜本草化妆品股份有限公司, 上海 201203;  
3. 上海诗丹德标准技术服务有限公司, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的分析方法, 并对比不同产地中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。 **方法** 对不同产地黄芪样品采用甲醇加热回流提取, 提取溶液采用反相色谱柱 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 检测, 以乙腈: 0.2%甲酸水梯度为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm。 **结果** 毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.2590~51.8000 μg/mL 范围内与峰面积积分值成良好的线性关系( $r^2=1.0000$ ), 毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均加样回收率为 106.5%, RSD 为 1.04%。不同黄芪由于产地和种植不同, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量差异较为明显。 **结论** 该方法简单、灵敏、稳定、可靠, 可用于不同黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定。

**关键词:** 黄芪; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 高效液相色谱法; 含量测定

## Determination of calycosin-7-glucoside in *Astragalus membranaceus*

DING Hui<sup>1</sup>, XU Ji-Feng<sup>1</sup>, SHEN Jun-Zi<sup>1</sup>, WANG Gai-Xiang<sup>2</sup>, ZHANG Tian-Yong<sup>3</sup>,  
QIAN Yong<sup>3\*</sup>, XIE Tian-Pei<sup>3</sup>

(1. Shanghai 100 Standard Testing Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Cheap Herbal Cosmetics Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Standard Technical Service Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of calycosin-7-glucoside in *Astragalus membranaceus* by high performance liquid chromatography (HPLC), and compare the content of calycosin-7-glucoside in *A. membranaceus* from different origins. **Methods** *A. membranaceus* samples were extracted by heating reflux in methanol solution. Separations of extraction solution were carried out on a ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile: 0.2% formic acid water gradient elution, the flow was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 260 nm. **Results** Calycosin-7-glucoside had a good linearity with the peak areas at the range of 0.2590~51.8000 μg/mL ( $r^2=1.0000$ ). The average recovery was 106.5% and the RSD was 1.04%. The difference of calycosin-7-glucoside content was obvious in *A. membranaceus* from different origins and cultivations. **Conclusion** The established method is simple, sensitive, specific, and reproducible, which can be used to determine the content of calycosin-7-glucoside in *A. membranaceus*.

**KEY WORDS:** *Astragalus membranaceus*; calycosin-7-glucoside; high performance liquid chromatography; content determination

基金项目: 上海市科委科研项目(14142201100)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Plan of STCSM (14142201100)

\*通讯作者: 钱勇, 高级工程师, 主要研究方向为中药以及健康产品检测。E-mail: cary@nature-standard.com

\*Corresponding author: QIAN Yong, Senior Engineer, Shanghai Standard Technology Co., Ltd., Building 2, Room 103, No.720, Cailun Road, Shanghai 201203, China. E-mail: dinghui2011@nature-standard.com

## 1 引言

黄芪为豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *monghlicus* (Bge.) Hsiao)或荚膜黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)的干燥根<sup>[1]</sup>。现代医学研究表明,黄芪有增强机体免疫功能、保肝、利尿、抗衰老、抗应激、降压和较广泛的抗菌作用。能消除实验性肾炎蛋白尿,增强心肌收缩力,调节血糖含量。黄芪不仅能扩张冠状动脉,改善心肌供血,提高免疫功能,而且能够延缓细胞衰老的进程。黄芪食用方便,可煎汤、煎膏,浸酒,入菜肴等<sup>[2-7]</sup>。黄芪中的主要成分有多糖类、皂苷类及黄酮类等,主要包括黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷为其主要的黄酮成分,结构图如图 1 所示。黄芪是一种药用价值非常大的中药药材,临床对于黄芪的药理活性和临床应用上研究的主要对象是黄芪的总黄酮类化学成分<sup>[8-10]</sup>。目前对毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定方法研究较少,采用的方法包括红外光谱法、薄层色谱法、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[11-15]</sup>,从灵敏度、准确性上看,HPLC 方法是目前最为有效的方法,但是往往存在前处理繁琐、检测灵敏度或者分离度不高等问题。本研究通过总结前人研究方法,建立了黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱测定方法,并对市售黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量进行测定,以研究不同生产环境下黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷在含量变化规律,为黄芪的等级评定和质量控制提供依据。

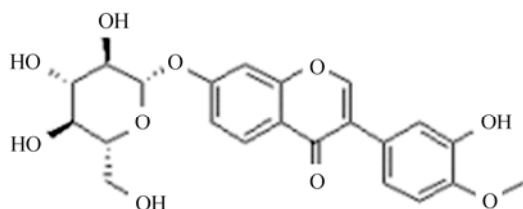


图 1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的结构图  
Fig. 1 Structure of calycosin-7-glucoside

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

黄芪样品均为市售品。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(含量按 97.1%计, 11920-201505, 中国食品药品检定研究院); 乙腈(色谱纯, 上海安谱实验科技有限公司); 甲酸、甲醇(分析纯, 国药试剂); 水为本实验室自制超纯水。

### 2.2 仪器与设备

Agilent1260 高效液相色谱, 带 Chemstation 色谱工作

站(美国安捷伦科技有限公司); 岛津十万分之一电子天平(日本岛津公司); ELGA 纯水机(英国埃尔格公司); 调温电热套(苏州学森仪器设备有限公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A), 0.2%甲酸水(B); 0~20 min 20%A~40%A; 20~30 min 40%A。体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温 30 °C。

#### 2.3.2 对照品溶液的制备

精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 12.95 mg 置于 25 mL 容量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得毛蕊异黄酮葡萄糖苷标准贮备液浓度为 0.518 mg/mL。

#### 2.3.3 供试药材溶液的制备

取样品黄芪粗粉约 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 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, 精密量取续滤液 25 mL, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为供试品溶液。

## 3 结果与分析

### 3.1 线性范围的考察

分别精密量取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品标准贮备液适量, 用流动相分别稀释成浓度为 0.2590、1.4245、2.5900、14.2450、25.9000、51.8000 μg/mL 的 6 个工作液, 按照上述色谱条件分别进样 10 μL, 测定。以峰面积值(Y)为纵坐标, 对照品进样量(X)为横坐标绘制标准曲线, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷回归方程为:  $Y=61.7559X-0.7260$  ( $r^2=1.0000$ ), 毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.2590~51.8000 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

### 3.2 精密度试验

取毛蕊异黄酮葡萄糖苷标准溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积 RSD 为 0.12%, 表明仪器的精密度好。

### 3.3 稳定性试验

取毛蕊异黄酮葡萄糖苷标准溶液, 每隔 0、1、2、4、8、12、24 h 进样一次, 每次 10 μL, 测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积 RSD 为 0.55%, 表明对照品溶液在放置 24 h 内稳定。

### 3.4 重现性试验

精密称取同一批次黄芪样品粗粉 6 份, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 10 μL, 计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

含量平均值为 0.49 mg/g, RSD 为 1.75%。

### 3.5 加样回收率试验

取已知含量的黄芪样品粗粉 9 份, 精密称定, 分别准确加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷 50%、100%、150% 各 3 份, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 10  $\mu$ L, 测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷加样回收率为 106.5%, RSD 为 1.04%。

### 3.6 不同产地的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定

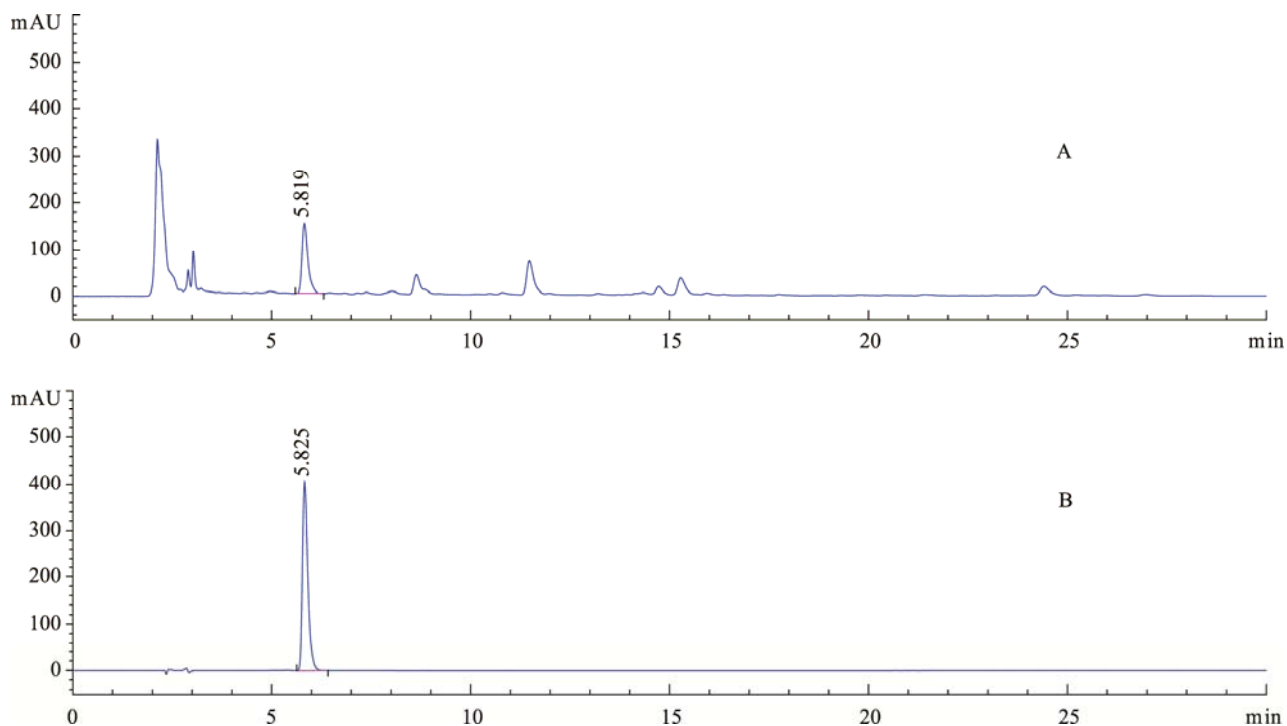
取市售不同产地的黄芪样品, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 10  $\mu$ L, 样品进样 2 次, 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量, 典型供试品与标准品图谱见图 2, 不同产地分析结果见表 1。

## 4 结论与讨论

采用高效液相色谱法对 4 个主要产地, 15 个不同批次的黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量进行测定, 结果表明黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷变化差异大, 这种差异在不同产地之间均存在, 可能黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量与种类及种植过程有较大的关系。中国药典规定, 黄芪中含毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量不得小于 0.02%<sup>[1]</sup>。本研究为选择较高含量黄芪品种提供了参考, 也为分离提取黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷的检测工作提供了依据。

表 1 不同产地黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量( $n=2$ )  
Table 1 Content of calycosin-7-glucoside in *A. membranaceus* from different origins ( $n=2$ )

品名	产地	毛蕊异黄酮葡萄糖苷(%)
黄芪	甘肃	0.028
	山西	0.041
	黑龙江	0.039
	甘肃	0.049
	内蒙古	0.037
	嫩江	0.106
	内蒙	0.048
	内蒙	0.033
	山西	0.0087
	山西	0.018
	甘肃	0.050
	内蒙	0.043
	甘肃	0.058
	山西	0.009
	黑龙江	0.028



A 为黄芪提取样品, B 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品

A: extract sample of *A. membranaceus*; B: reference standards of calycosin-7-glucoside

图 2 黄芪高效液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatograms of *A. membranaceus*

本研究通过方法学验证,证明该方法有较好的线性、精密度和回收率,与前期研究方法相比,受黄芪中其他类物质干扰较少,分离度较好,具有很好的准确性,可作为黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质量控制方法。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:302-302.  
Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the First Volume) [S]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015:302-302.
- [2] 牛琳琳, 琚保军. 黄芪在心血管疾病中的药理及临床应用探究[J]. 中医临床研究, 2012, 4(7): 46-47.  
Niu LL, Ju BJ. Pharmacology and clinical application of *Astragalus* in cardiovascular disease [J]. Clin Res Tradit Chin Med, 2012, 4(7): 46-47.
- [3] 孙云, 谢强敏, 刘小梅, 等. 黄芪对血虚动物模型补气生血功效的作用[J]. 中国临床康复, 2003, 7(15): 2148-2149.  
Sun Y, Xie QM, Liu XM, et al. Invigorating qi and promoting blood effect of *Astragalus membranaceus* in animal model of blood deficient [J]. Clin Rehab China, 2003, 7(15): 2148-2149.
- [4] 赵冰, 杜小刚, 曾宪垠. 黄芪提取物的免疫调节及治疗作用[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(9): 652-657.  
Zhao B, Du XG, Zeng XY. Immune regulation and therapeutic effect of *Astragalus* extract [J]. Chin J Antibiot, 2013, 38(9): 652-657.
- [5] 孙晓波, 李会芳, 方芳. 对黄芪临床功效的再认识[J]. 北京中医, 2004, 23(3): 165-166.  
Sun XB, Li HF, Fang F. Recognition of the clinical efficacy of *Astragalus* [J]. Beijing Tradit Chin Med, 2004, 23(3): 165-166.
- [6] 江尚飞. 黄芪现代应用综述[J]. 中国药业, 2007, 16(18): 62-63.  
Jiang SF. Summary of modern application of *Astragalus* [J]. China Pharmaceut, 2007, 16(18): 62-63.
- [7] 韩娟, 刘宏艳. 黄芪活血功效刍议[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(3): 21-22.  
Han J, Liu HY. Discussion on the effect of activating blood circulation [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2008, 29(3): 21-22.
- [8] 陈国辉, 黄文凤. 黄芪化学成分、药理活性与临床应用概述[J]. 海峡药学, 2008, 20(3): 13-16.  
Chen GH, Huang WF. Chemical constituents, pharmacological activities and clinical application of *Astragalus membranaceus* [J]. Strait Pharm, 2008, 20(3): 13-16.
- [9] 陈建真, 吕圭源, 陈建明, 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.  
Chen JZ, Lv GY, Chen JM, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus flavonoids* [J]. Her Med, 2009, 28(10): 1314-1316.
- [10] 丰成相. 黄芪中主要化学成分的药理学研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2012, (3): 56-58.  
Feng CX. Pharmacology of main chemical constituents in *Astragalus* [J]. Chin Folk Med, 2012, (3): 56-58.
- [11] 刘黎锋, 梁洁, 马晋芳, 等. 近红外光谱法快速测定黄芪提取过程中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量[J]. 江西中医药, 2016, (1): 68-70.  
Liu LF, Liang J, Ma JF. Rapid determination of genistein in *Astragalus* by near infrared spectroscopy [J]. Jiangxi Tradit Chin Med, 2016, (1): 68-70.
- [12] 刘晓庆, 李军. 黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷薄层色谱快速鉴别[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(7): 53-54.  
Liu XQ, Li J. Rapid identification of genistein in *Astragalus* by TLC [J]. J Univ Tradit Chin Med, 2013, 15(7): 53-54.
- [13] 彭衡阳, 肖丹, 徐静, 等. 黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的薄层鉴别[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(5): 100-101.  
Peng HY, Xiao D, Xu J, et al. Identification of genistein in *Astragalus membranaceus* by TLC [J]. Food Res Dev, 2013, 34(5): 100-101.
- [14] 阮佳佳, 林灵超. HPLC法测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定[J]. 广州化工, 2012, 40(12): 142-143.  
Yuan JJ, Lin LC. Determination of genistein in *Astragalus* by HPLC [J]. Chem Ind Guangzhou, 2012, 40(12): 142-143.
- [15] 黄志勤, 李洪亮, 程齐来. HPLC测定黄芪药材中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷[J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 2736-2738.  
Huang ZQ, Li HL, Cheng QL. Determination of genistein in *Astragalus* by HPLC [J]. Spectrum Lab, 2012, 29(5): 2736-2738.

(责任编辑: 杨翠娜)

#### 作者简介



丁 慧, 工程师, 主要研究方向为中药和健康食品的检测。

E-mail: dinghui2011@nature-standard.com



钱 勇, 高级工程师, 主要研究方向为中药以及健康产品检测。

E-mail: cary@nature-standard.com