

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)12-0084-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.12.020



超高效液相色谱法同时测定红芪和黄芪药材中有效成分含量*

焦洁, 郭建博, 郑旭, 胡萌萌, 蔡虎[△]

(陕西省食品药品检验研究院·国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立同时测定红芪和黄芪药材中有效成分含量的超高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters BEH C₁₈ 柱(200 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 0.2 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 1 μL。结果 香草酸、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮质量浓度分别在 6.05~121.00 μg/mL、4.37~87.32 μg/mL、0.30~6.02 μg/mL、1.09~21.81 μg/mL、6.10~122.12 μg/mL、1.00~20.05 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.9996$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5.0%; 平均加样回收率分别为 98.26%, 96.72%, 98.78%, 97.56%, 99.18%, 99.19%, RSD 均小于 4.0% ($n=6$)。武都红芪药材样品和蒙古黄芪药材样品的共有成分毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮含量差异较大, 分别为 2.73, 46.61, 8.45 μg/g 和 42.36, 13.03, 37.45 μg/g。结论 所建立的方法可靠, 操作简单, 可为后期红芪及黄芪药材的质量控制提供参考。

关键词: 红芪; 黄芪; 超高效液相色谱法; 共有成分; 含量测定; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮

Simultaneous Determination of Effective Components in Hedysari Radix and Astragali Radix by UPLC

JIAO Jie, GUO Jianbo, ZHENG Xu, HU Mengmeng, CAI Hu

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory of Drug Microbiological Detection Technology, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous

*基金项目: 陕西省重点研发计划[2019SF-075]; 陕西省“医研校企”中医药传承创新平台[陕中医药函(2022)54号-5]。

第一作者: 焦洁, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品、药包材、医疗器械、化妆品等的安全性评价, (电子信箱) 674272301@qq.com。

[△]通信作者: 蔡虎, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品、药包材、医疗器械、化妆品等的安全性评价及科研, (电话) 029-62288418。

- 4] 崔海鹏, 刘玉玲, 刘凯, 等. 泽泻汤加味方对盐敏感性 HBZY21 细胞中 Ang II - NADPH - ROS 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(3): 331-336.
- 5] 刘凯, 赵娟, 刘玉玲, 等. 泽泻汤加味方通过 AT1R 通路抑制高盐和 Ang II 诱导 HBZY-1 中 NOX4 表达的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(5): 590-595.
- 6] 景文莉, 王长志, 范洪亮, 等. 泽泻汤加味方对高盐高血压大鼠肾脏 AQP-2 表达的影响[J]. 天津医药, 2014, 42(12): 1193-1196.
- 7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 47, 59, 107, 157, 268, 277, 314, 347.
- 8] PARK JP, KANG SA. Antioxidant effect and blood pressure control ability of lactobacillus fermented *Gastrodia elata* Bl. in hypertension model rats (SHR)[J]. Korean Journal of Food and Nutrition, 2020, 33(5): 493-504.
- 9] QIAN L, YAN S, LI Y, et al. The effects of gastrodin injection on hypertension: A systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2020, 99(27): 1-9.
- 10] FU Y, YUAN P, KE Y, et al. Regulation of PI3k - WNK pathway by ethyl acetate partition fraction of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino in SHR, NRK52e cells, and IMCD3 cells[J]. Natural Product Communications, 2020, 15(4): 1-10.
- 11] FU Y, YUAN P, CAO Y, et al. Geniposide in *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino modulates blood pressure via inhibiting WNK pathway mediated by the estrogen receptors[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2020, 72(12): 1956-1969.
- 12] CAI RL, LI M, XIE SH, et al. Antihypertensive effect of total flavone extracts from *Puerariae Radix* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133(1): 177-183.
- 13] SHI W, YUAN R, CHEN X, et al. Puerarin reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats by targeting eNOS[J]. American Journal of Chinese Medicine, 2019, 47(1): 19-38.
- 14] DING L, JIA C, ZHANG Y, et al. Baicalin relaxes vascular smooth muscle and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2019, 111: 325-330.
- 15] LIU H, CHENG Y, CHU J, et al. Baicalin attenuates angiotensin II - induced blood pressure elevation and modulates MLCK / p - MLC signaling pathway[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2021, 143: 112124.

(收稿日期: 2022-09-13; 修回日期: 2022-12-07)

determination of effective components in Hedysari Radix and Astragali Radix. **Methods** The chromatographic column was Waters BEH C₁₈ column (200 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 0.2 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 1 μL. **Results** The linear ranges of vanillic acid, ferulic acid, calycosin - 7 - glucoside, isoferulic acid, ononin and calycosin were 6.05 - 121.00 μg/mL, 4.37 - 87.32 μg/mL, 0.30 - 6.02 μg/mL, 1.09 - 21.81 μg/mL, 6.10 - 122.12 μg/mL and 1.00 - 20.05 μg/mL respectively ($R^2 \geq 0.9996$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 5.0%. The average recovery rates of the above six components were 98.26%, 96.72%, 98.78%, 97.56%, 99.18% and 99.19% respectively, with RSDs lower than 4.0% ($n = 6$). The contents of calycosin - 7 - glucoside, ononin and calycosin in Hedysari Radix samples (Wudu) were 2.73, 46.61 and 8.45 μg/g respectively, which were significantly different from 42.36, 13.03 and 37.45 μg/g in Astragali Radix samples (Inner Mongolia) respectively. **Conclusion** The established method is reliable and simple, which can provide a reference for the quality control of Hedysari Radix and Astragali Radix in the later stage.

Key words: Hedysari Radix; Astragali Radix; UPLC; common component; content determination; calycosin - 7 - glucoside; ononin; calycosin

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, 是内蒙古和甘肃道地药材。红芪为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. - Mazz. 的干燥根, 是甘肃道地药材。二者为同科不同属药材, 均有补气升阳、利水消肿、止汗、托毒排脓及敛疮生肌功效^[1], 但主要成分及药理作用存在差异。在皂苷类和黄酮类成分方面, 黄芪、红芪分别已分离出 125, 21 个化合物。黄芪主要有细胞免疫、降血糖、保护心脑血管、改善肾功能等作用, 红芪主要有抗骨质疏松、抗肿瘤、抗炎等作用, 且二者均有抗免疫、抗衰老、免疫调节等药理作用^[2-4]。目前, 红芪的相关研究报道和临床应用远少于黄芪。本研究中探讨了红芪、黄芪药材的共有成分和特有成分, 为二者的对比分析及红芪药材的推广提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters H - Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); SK5200GT 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); MS430TS 型电子天平、XPE205 型电子天平(梅特勒 - 托利多仪器 < 上海 > 有限公司); Merck Milli - Q 超纯水仪(默克化工技术 < 上海 > 有限公司); DK - 98 - II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂

毛蕊异黄酮对照品(批号为 DST190915012, 含量 ≥ 98%), 芒柄花苷对照品(批号为 DST190711044, 含量 ≥ 98%), 均购于成都德斯特生物技术有限公司; 毛蕊异黄酮苷对照品(批号为 111920 - 201505, 含量 ≥ 97.1%), 阿魏酸对照品(批号为 110773 - 201614, 含量 ≥ 99%), 异阿魏酸对照品(批号为 111698 - 201103, 含量 ≥ 99.2%), 香草酸对照品(批号为 110776 - 201503, 含量 ≥ 99.8%), 均购于中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为

超纯水; 蒙古黄芪(陇海药材有限责任公司, 批号为 120974 - 202011), 武都红芪(陇南同人红芪购销有限责任公司, 批号为 20200805), 均经陕西中医药大学中药资源教研室王西芳教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters BEH C₁₈ 柱(200 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 1 min 时 8%A → 13%A, 1 ~ 10 min 时 13%A, 10 ~ 15 min 时 13%A → 20%A, 15 ~ 18 min 时 20%A → 23%A, 18 ~ 23 min 时 23%A → 20%A, 23 ~ 25 min 时 20%A → 13%A, 25 ~ 27 min 时 13%A → 8%A); 流速: 0.2 mL/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 1 μL。

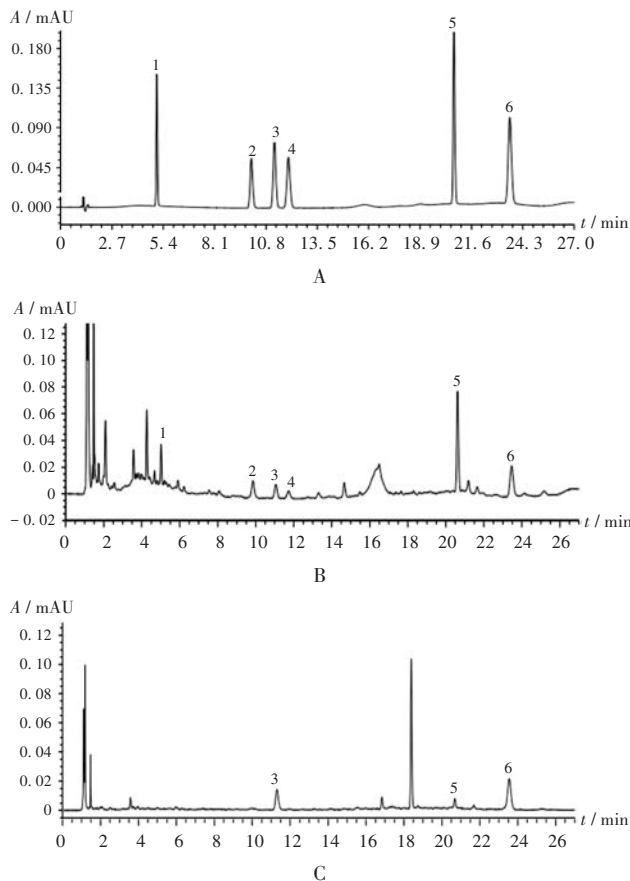
2.2 溶液制备

取香草酸、阿魏酸、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷对照品各适量, 精密称定, 用甲醇制成质量浓度分别为 403.19, 436.59, 466.24, 488.04, 400.82, 404.91 μg/mL 的混合对照品溶液。取红芪、黄芪药材样品粉末各 3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30 mL 甲醇, 超声(功率 250 W, 频率 43 kHz)处理 30 min, 取出, 滤过, 用甲醇少量多次冲洗残渣, 浓缩, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 经 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液 I 和 II^[4]。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取 2.2 项下溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱中, 在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰, 表明方法系统适用性良好。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液各适量, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 得系列混合对照品溶液; 取适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 结果见表 1。



1. 香草酸 2. 阿魏酸 3. 毛蕊异黄酮苷 4. 异阿魏酸
5. 芒柄花苷 6. 毛蕊异黄酮

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 I C. 供试品溶液 II
图1 超高效液相色谱图

1. Vanillic acid 2. Ferulic acid 3. Calycosin-7-glucoside
4. Isoferulic acid 5. Ononin 6. Calycosin

A. Mixed reference solution B. Test solution I C. Test solution II
Fig. 1 UPLC chromatograms

表1 线性关系及定量限、检测限考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test, limit of quantitation and limit of detection

待测成分	回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)
香草酸	$Y_1 = 16.823 X_1 + 3.899.3$	0.999 8	6.05~121.00	0.14	0.04
阿魏酸	$Y_2 = 12.641 X_2 - 2.320.1$	0.999 9	4.37~87.32	0.44	0.13
毛蕊异黄酮苷	$Y_3 = 13.323 X_3 + 551.37$	0.999 6	0.30~6.02	0.30	0.09
异阿魏酸	$Y_4 = 15.654 X_4 - 7.618.5$	0.999 9	1.09~21.81	0.47	0.14
芒柄花苷	$Y_5 = 23.601 X_5 - 73.675$	0.999 9	6.10~122.12	0.17	0.04
毛蕊异黄酮	$Y_6 = 24.966 X_6 + 8.424.8$	0.999 7	1.00~20.05	0.24	0.07

检测限与定量限考察:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以信噪比(S/N)为3和10时的待测成分质量浓度为检测限和定量限,结果见表1。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面

积。结果香草酸、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 分别为1.21%, 0.83%, 0.52%, 0.76%, 0.65%, 1.02%, 均小于2.0% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件分别于0,2,4,6,8,10,12,24 h时进样测定,记录峰面积。结果前述6种成分峰面积的 RSD 分别为2.02%, 2.63%, 4.81%, 4.54%, 3.18%, 4.36%, 均小于5.0% ($n=8$),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:称取同一批红芪药材样品3 g,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果前述6种成分含量的 RSD 分别为3.05%, 3.32%, 2.12%, 2.73%, 2.56%, 3.55%, 均小于5.0% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批已知含量的红芪药材样品约1.5 g,精密称定,平行6份,置具塞锥形瓶中,加入一定质量浓度的混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表2。

2.4 样品含量测定

取红芪、黄芪药材样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算各待测成分含量,结果见表3(-为未测出)。可见,黄芪、红芪药材的3种共有成分含量差异较大,黄芪药材中毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮含量约分别为红芪药材的16倍和5倍,红芪药材中芒柄花苷含量约为黄芪药材的4倍。

3 讨论

3.1 样品处理

黄芪与红芪药材样品的提取一般多采用回流提取法,部分采用萃取法,并应用蒸发光检测器测定^[5]。预试验中考察了甲醇(回流法、超声法)提取、乙醇(回流法、超声法)提取,发现以甲醇为溶剂的提取效果较佳,加热回流提取法和超声提取法的提取效果相差不大。考虑到超声提取操作简单,溶剂损耗少、耗费时间短,故选择甲醇超声提取;同时考察了提取温度、提取时间、提取次数对提取效果的影响,结果当提取温度为25℃、提取时间为30 min、提取1次时,提取效果最佳。

3.2 检测波长选择

通过查阅相关文献及UPLC全波长色谱扫描图谱分析,测得红芪药材中有机酸类及黄酮类成分的最佳检测波长分别约为280,250,230 nm^[6-8]。通过对比分析,红芪药材有效成分在250 nm波长处峰形较好、分离度及响应度也较高,故以250 nm为检测波长。

表 2 加样回收试验结果 (n = 6)
Tab. 2 Results of the recovery test (n = 6)

待测成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)
香草酸	54.68	103.80	155.03	96.68	98.26	1.23
	55.03	103.80	157.44	98.66		
	55.21	103.80	155.79	96.90		
	56.44	518.80	573.68	99.70		
	55.50	518.80	569.26	99.03		
	55.56	518.80	567.09	98.60		
阿魏酸	69.07	22.20	90.62	97.07	96.72	3.46
	70.42	22.20	90.42	90.09		
	69.27	22.20	90.82	97.07		
	71.29	110.90	180.62	98.58		
	70.10	110.90	179.74	98.86		
	70.17	110.90	179.53	98.61		
毛蕊异黄酮苷	4.18	175.10	177.35	98.90	98.78	0.84
	4.12	175.10	177.34	98.93		
	4.13	175.10	174.27	97.17		
	4.23	875.40	875.60	99.54		
	4.15	875.40	872.89	99.24		
	4.16	875.40	870.02	98.91		
异阿魏酸	7.39	52.30	57.82	96.42	97.56	0.83
	7.34	52.30	58.17	97.19		
	7.27	52.30	58.06	97.11		
	7.48	261.50	263.12	97.76		
	7.31	261.50	264.41	98.32		
	7.51	261.50	265.29	98.58		
芒柄花苷	70.43	96.60	165.42	98.33	99.18	0.85
	69.94	96.60	167.23	100.71		
	72.04	96.60	167.55	98.87		
	71.29	483.10	551.83	99.47		
	71.01	483.10	549.33	99.01		
	71.56	483.10	548.14	98.65		
毛蕊异黄酮	12.85	320.70	324.98	97.33	99.19	1.30
	12.84	320.70	332.26	99.60		
	12.72	320.70	326.40	97.81		
	13.01	1 603.60	1 619.33	100.17		
	12.87	1 603.60	1 615.83	99.96		
	12.80	1 603.60	1 620.73	100.27		

表 3 药材样品含量测定结果 (μg / g, n = 3)

Tab. 3 Results of content determination of six components in medicinal material samples (μg / g, n = 3)

药材样品	香草酸	阿魏酸	毛蕊异黄酮苷	异阿魏酸	芒柄花苷	毛蕊异黄酮
黄芪	-	-	42.36	-	13.03	37.45
红芪	36.43	46.01	2.73	4.83	46.61	8.45

3.3 样品含量测定

本研究结果显示,红芪、黄芪药材的共有成分为芒

柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷。黄芪药材中毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷的含量显著高于红芪药材,红芪药材中芒柄花苷含量显著高于黄芪药材。文献[9]显示,黄芪药材中各黄酮类成分含量均高于红芪药材,与本研究结果存在差异,分析原因可能为各药材产地、采收年限、生长环境、生产加工等存在差异^[10-12],但该差异不影响药材对比研究方法的确定。

3.4 图谱分析

本研究结果显示,在同一色谱条件下可同时测定红芪药材中香草酸、阿魏酸、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷 6 种有效成分及黄芪药材中芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷 3 种成分的含量,且峰形较好、分离度较高,表明此色谱条件可用于 2 种药材的单指标及多指标成分对比分析。且黄芪药材样品中其余色谱峰峰形也较好,后期可作进一步研究。

本研究可为相近种属药材成分的对比研究提供研究思路,可采用同一条件进行单一药材多成分研究与 2 个及以上药材多指标成分对比研究,研究范围相对广泛。本研究中对黄芪与红芪药材的有效成分进行了定量比较研究,以期为二者的临床应用提供理论依据,以更好地促进和推动中药黄芪和红芪资源的合理利用^[13-16]。

综上所述,本研究中所建立的方法可靠,操作简单,可为后期红芪及黄芪药材的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:159.

[2] 白海英,张凯雪,包 芳,等. 黄芪和红芪对比研究进展[J]. 西北药学杂志,2020,35(3):460-466.

[3] 张淑娟,张育贵,辛二旦,等. 黄芪和红芪比较研究进展[J]. 山西医科大学学报,2020,51(5):462-465.

[4] 李越峰,牛江涛,曹 瑞,等. 甘肃道地药材红芪与炙红芪指纹图谱对比研究[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(16):1634-1638.

[5] 许 京,叶 迎,王瑞海,等. 甘肃一年生、二年生红芪和黄芪 HPLC-ELSD 指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):71-76.

[6] 叶 迎,王瑞海,包 强,等. 甘肃一、二年生红芪与黄芪黄酮类成分指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):83-89.

[7] 李越峰,牛江涛,曹 瑞,等. 不同干燥工艺对红芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素含量的影响[J]. 中国现代中药,2019,21(7):941-945.

[8] 牟佳佳,陈 芳,陈党辉,等. 黄芪中 5 种黄酮类成分的含量测定及其指纹图谱研究[J]. 药物评价研究,2019,42(5):900-906.

[9] 叶 迎,王瑞海,柏 冬,等. 甘肃不同产地及不同生长年限