

# 补肺活血胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、 毛蕊异黄酮的测定方法\*

唐清, 朱晓泉, 郑玉莹, 关敏怡, 彭维, 苏薇薇  
(中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 采用 HPLC 构建测定补肺活血胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮的方法。以 Hitachi High-Tech C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 为色谱柱, 以乙腈 - φ = 0.2% 甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 260 nm, 色谱柱温度为 25 °C, 流速为 0.8 mL/min。经方法学验证, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮分别在 0.022 5 ~ 0.901 8 μg ( $R^2 = 1$ )、0.007 5 ~ 0.299 0 μg ( $R^2 = 1$ ) 范围内线性关系良好, 二者的平均回收率分别为 93.97% (RSD = 3.46%)、90.04% (RSD = 3.25%)。结果表明, 所建立的方法简单、快捷, 适用于补肺活血胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮的测定。

**关键词:** 高效液相色谱; 补肺活血胶囊; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 毛蕊异黄酮; 测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2017) 06-0123-05

## Determination of Calycosin-7-O-β-D-glucoside and Calycosin in Bufeihuoxue Capsules by HPLC

TANG Qing, ZHU Xiaoxiao, ZHENG Yuying, GUAN Minyi, PENG Wei, SU Weiwei  
(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The HPLC method was established for determination of Calycosin-7-O-β-D-glucoside and Calycosin in Bufeihuoxue Capsules. The separation was performed on Hitachi High-Tech C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) column eluted with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.2% formic acid solution in gradient elution mode at the flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelength was 260 nm and the column temperature was 25 °C. The method was validated and shown that Calycosin-7-O-β-D-glucoside and Calycosin had a good linear relationship in the range of 0.022 5 ~ 0.901 8 μg ( $R^2 = 1$ ), 0.007 5 ~ 0.299 0 μg ( $R^2 = 1$ ), respectively. The average recovery rates were 93.87% (RSD = 3.46%)、90.04% (RSD = 3.25%), respectively. The established method is simple, rapid and reproducible, which is suitable for the determination of Calycosin-7-O-β-D-glucoside and Calycosin from Bufeihuoxue Capsules.

**Key words:** high performance liquid chromatography; Bufeihuoxue Capsule; Calycosin-7-O-β-D-glucoside; Calycosin; determination

中药补肺活血胶囊具有益气活血、补肺固肾的功效, 用于肺心病(缓解期)属气虚血瘀证, 症

见咳嗽气促、咳喘胸闷、心悸气短、肢冷乏力、腰膝酸软、口唇紫绀、舌淡苔白或舌紫暗等<sup>[1]</sup>。方

\* 收稿日期: 2017-06-21

基金项目: 广东省中医药局科研课题 (20161050)

作者简介: 唐清 (1993年生), 女; 研究方向: 药物分析; E-mail: tangq27@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 苏薇薇 (1959年生), 女; 研究方向: 创新药物的研究开发、中药上市后质量与药效再评价技术; E-mail: lssww@126.com

中黄芪为君药,入肺脾二经,益肺健脾,补脾肺肾之气,是补气要药。补肺活血胶囊中黄芪发挥药效的物质基础为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮,本研究建立 HPLC 法同时测定这两种成分,为更好地监控补肺活血胶囊的质量提供了依据。

## 1 实验材料

### 1.1 实验药品与试剂

毛蕊异黄酮(成都普菲德生物技术有限公司,151208)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(中国食品药品检定研究院,111920-201505);4批补肺活血胶囊及黄芪阴性样品均由广东雷允上药业有限公司提供。甲醇(天津大茂化学试剂厂,批号:20160316、20160817、20160901,分析纯)、乙腈(Honeywell,批号:Q4TA1H,色谱级);甲酸(阿拉丁,批号:D1502086,色谱级);水为超纯水。

### 1.2 实验仪器

十万分之一电子分析天平(MS205DU,瑞士Mettler Toledo公司);万分之一电子分析天平(ME204,瑞士Mettler toledo公司);超纯水器(Simplicity,美国密理博Millipore公司);数控超声波清洗器(KQ500DE,昆山市超声仪器有限公司);电热恒温水浴锅(HWS24,上海一恒科技有限公司);旋转蒸发器(SB-1200水浴锅,N-1100);Ultimate 3000 DGLC 高效液相色谱仪(美国Dionex公司,DGP-3600SD双三元泵、SRD-3600脱气机、WPS-3000SL自动进样器、TCC3000-RS柱温箱、DAD检测器、Chromleon6.8数据处理软件)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮对照品适量,精密称定,加 $\varphi=50\%$ 甲醇制成每1 mL含毛蕊异黄酮葡萄糖苷30  $\mu\text{g}$ 、毛蕊异黄酮20  $\mu\text{g}$ 的混合溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取补肺活血胶囊内容物,研细,取约1.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,加热回流1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 mL,回收溶剂至干,残渣加 $\varphi=50\%$ 甲醇溶解,转移至5 mL量瓶中,加 $\varphi=50\%$ 甲醇至刻度,摇匀,即得补肺活血胶囊供试品溶液。

2.1.3 黄芪阴性对照溶液的制备 取黄芪阴性样品,同2.1.2项下操作。

### 2.2 色谱条件

Hitachi High-Tech  $\text{C}_{18}$  (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , No. 27H5I-024) 色谱柱:以乙腈为流动相 A,以 $\varphi=0.2\%$ 甲酸溶液为流动相 B,进行梯度洗脱:0~25 min,16% A,84% B;25~65 min,16%~42% A,84%~58% B。检测波长为260 nm;柱温25  $^{\circ}\text{C}$ ;流速0.8 mL/min;进样量10  $\mu\text{L}$ 。理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷计算不低于13 000。混合对照品、黄芪阴性对照、样品色谱图见图1。由图1可知,毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮的出峰位置上无其他物质的干扰。

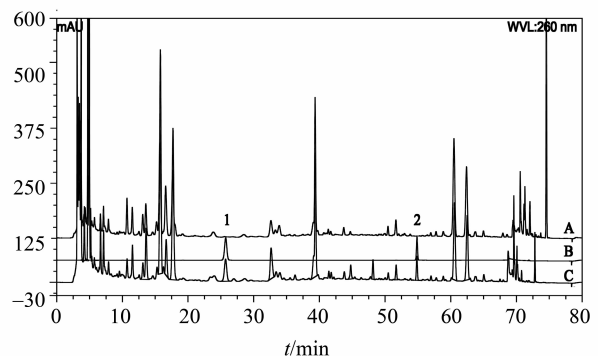


图1 黄芪阴性对照(A)、混合对照品(B)、补肺活血胶囊样品(C) HPLC 图谱  
1: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 2: 毛蕊异黄酮  
Fig. 1 HPLC chromatogram of Astragali negative control (A), mixed control (B), test samples (C)  
1: calycosin-7-O-glucoside; 2: calycosin

### 2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液0.5、1、2、5、10、15、20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪中,按“2.2”项下色谱条件进行分析,并对峰面积进行测定,绘制成标准曲线,以峰面积积分值A对进样量C进行回归分析。毛蕊异黄酮葡萄糖苷回归方程为: $A_1 = 47.456C - 0.1418$  ( $R^2 = 1$ ),表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在0.0225~0.9018  $\mu\text{g}$ 范围内,浓度与峰面积呈良好线性关系;毛蕊异黄酮回归方程为: $A_2 = 68.324C - 0.0638$  ( $R^2 = 1$ ),表明毛蕊异黄酮在0.0075~0.2990  $\mu\text{g}$ 范围内,浓度与峰面积呈良好线性关系。线性关系数据见表1、表2,标准曲线见图2、图3。

表 1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷线性及范围

Table 1 Regression equations and liner ranges of calycosin-7-O-glucoside

序号	1	2	3	4	5	6	7
进样量 $C/\mu\text{g}$	0.022 54	0.045 09	0.090 18	0.225 40	0.450 90	0.676 40	0.901 80
峰面积 $A_1/\text{mAU}$	0.964 3	1.995 0	4.119 4	10.532 8	21.252 4	31.965 0	42.656 4

表 2 毛蕊异黄酮线性及范围

Table 2 Regression equations and liner ranges of calycosin

序号	1	2	3	4	5	6	7
进样量 $C/\mu\text{g}$	0.007 48	0.0149 5	0.029 90	0.074 75	0.149 50	0.224 20	0.299 00
峰面积 $A_2/\text{mAU}$	0.462 2	0.957 0	1.972 1	5.034 1	10.147 1	15.258 3	20.366 4

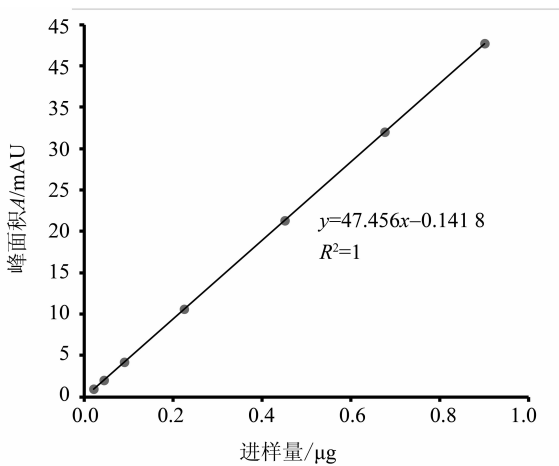


图 2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品标准曲线

Fig. 2 Standard curve of calycosin-7-O-glucoside reference substance

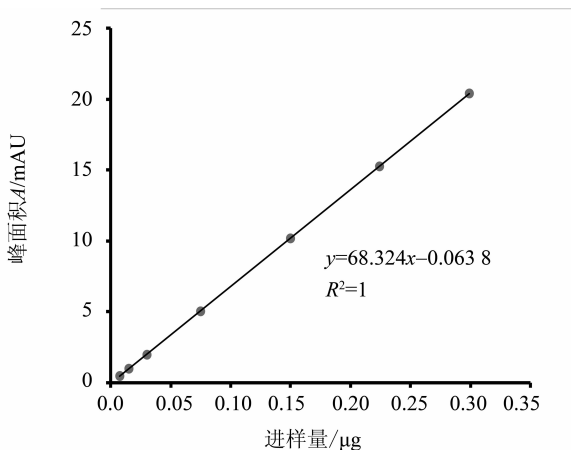


图 3 毛蕊异黄酮对照品标准曲线

Fig. 3 Standard curve of calycosin reference substance

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，按“2.2”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录峰面积。毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 为 0.34%，毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 为 0.32%，表明该方法精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取补肺活血胶囊内容物（批号：150035），按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份补肺活血胶囊供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件测定，记录峰面积。毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 为 2.40%；毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 为 2.43%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取补肺活血胶囊内容物（批号：150035），按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12、24、48 h 进样 10  $\mu\text{L}$ ，测定峰面积，计算得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 为 0.29%；毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 为 0.30%。表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 取补肺活血胶囊内容物（批号：150035）约 0.6 g 共 9 份，精密称定，分别精密加入低、中、高浓度的对照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件测定，计算加样回收率。毛蕊异黄酮葡萄糖苷的回收率为 93.87%，RSD 为 3.46%；毛蕊异黄酮的回收率为 90.04%，RSD 为 3.25%。见表 3、4。

### 2.4 样品测定

取补肺活血胶囊样品，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液，按外标法计算样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮的含量，结果见表 5。

表 3 毛蕊异黄酮葡萄糖苷加样回收率试验结果  
Table 3 Recovery tests results of calycosin-7-O-glucoside

序号	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均值/%	RSD /%
1	0.604 5	0.222 7	0.110 7	0.322 8	90.42		
2	0.600 1	0.221 1	0.110 7	0.330 0	98.37		
3	0.604 1	0.222 6	0.110 7	0.333 3	100.00		
4	0.602 7	0.222 0	0.221 4	0.431 6	94.67		
5	0.604 3	0.222 6	0.221 4	0.428 3	92.91	93.87	3.46
6	0.603 0	0.222 1	0.221 4	0.425 7	91.96		
7	0.602 7	0.222 0	0.332 1	0.526 0	91.54		
8	0.601 9	0.221 7	0.332 1	0.530 3	92.92		
9	0.602 0	0.221 8	0.332 1	0.527 6	92.08		

表 4 毛蕊异黄酮加样回收率试验结果  
Table 4 Recovery tests results of calycosin

序号	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.604 5	0.076 0	0.037 3	0.109 4	89.54		
2	0.600 1	0.075 5	0.037 3	0.111 6	96.78		
3	0.604 1	0.076 0	0.037 3	0.110 4	92.23		
4	0.602 7	0.075 8	0.074 6	0.143 2	90.35		
5	0.604 3	0.076 0	0.074 6	0.142 6	89.28	90.04	3.25
6	0.603 0	0.075 9	0.074 6	0.141 4	87.80		
7	0.602 7	0.075 8	0.111 8	0.173 3	87.21		
8	0.601 9	0.075 7	0.111 8	0.175 1	89.01		
9	0.602 0	0.075 7	0.111 8	0.174 4	88.28		

表 5 样品含量测定结果  
Table 5 Results of contents determination of samples

批号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	毛蕊异黄酮	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 + 毛蕊异黄酮
160905	0.147 8	0.260 8	0.408 6
161008	0.142 4	0.291 5	0.433 9
161010	0.276 8	0.200 1	0.476 9
161012	0.253 9	0.236 4	0.490 3

### 3 讨 论

依据含量测定结果,不同批次的补肺活血胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮含量的总和相差不大,但含量的比例不一样。造成这种差异的原因:①不同产地黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量具有明显差异<sup>[2-5]</sup>;②在补肺活血胶囊生产过程中,毛蕊异黄酮葡萄糖苷易受热脱去葡萄糖转变为毛蕊异黄酮。因此,同时测定补肺活血胶囊中这两种成分才有实际意义,这在国内尚未见有文献报道。本研究建立了一种 HPLC 法同时检测这两种成分,具有操作简单,重复性、加样回收率好等优点,为全面监控补肺活血胶囊质量、完善其质量标

准提供了科学依据。

#### 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,2015:1000-1001.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 1000-1001.

[2] 石子仪, 鲍忠, 姜勇, 等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (9): 779-783.  
SHI Z Y, BAO Z, JIANG Y, et al. Quantitative analysis of calycosin glycoside and from ononetin in Radix Astragalus

- gali from different sources [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32 (9) : 779 - 783.
- [3] 姚雪莲, 裴彩云, 王宗权. 不同产地、不同采收期黄芪药材及饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素含量测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (5) : 797 - 805. YAO X L, PEI C Y, WANG Z Q. Determination of calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside and formononetin in crude drugs and slices of Astragalus from different habitats and gathering periods [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32 (5) : 797 - 805.
- [4] 刘晓庆, 李军, 薛恒跃, 等. 不同来源、不同等级黄芪饮片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量分析[J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (5) : 874 - 880. LIU X Q, LI J, XUE H Y, et al. Content analysis of calycosin glucoside in Astragalus slices of different sources and different grades [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33 (5) : 874 - 880.
- [5] 刘杨, 包华音, 王晓燕. 不同产地黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的定量分析[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28 (3) : 8 - 10. LIU Y, BAO H Y, WANG X Y. Determination of Calycosin-7-Glucoside in Astragali Radix from Different Place by HPLC [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2014, 28 (3) : 8 - 10.

---

## 简讯

### 《中山大学学报（自然科学版）》再次入选中国精品科技期刊

2017年10月31日,由中国科学技术信息研究所组织的“2017年中国科技论文统计结果发布会”在北京国际会议中心举行。会上,公布了第四届中国精品科技期刊名单,本刊再次光荣入选。

“中国精品科技期刊”是由中国科学技术信息研究所“精品科技期刊服务与保障系统项目组”于2008年首次遴选产生,已分别于2008年、2011年、2014年和2017年公布4届。此次公布的第四届中国精品科技期刊名单是该项目组根据中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价的结果,共包括300种以中文出版的中国精品科技期刊和15种以英文出版的中国国际化精品科技期刊。

本次入选“第四届中国精品科技期刊”,是本刊继2008年、2011年、2014年连续入选第1-3届“中国精品科技期刊”后的再次入选。

(本刊通讯员)