

中药材黄芪与红芪的色谱鉴别法

赵健雄, 封士兰, 胡芳弟

(兰州医学院中西医结合研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 目的: 鉴别中药材黄芪和红芪. 方法: 高效液相色谱法, 数据分析用 waters 公司 Patten Match 软件. 结果: 黄芪和红芪药材的区别是在高效液相色谱指纹图谱中黄芪药材有 26 个特征峰, 红芪药材有 23 个特征峰; 红芪中毛蕊异黄酮的含量低于芒柄花素, 黄芪中毛蕊异黄酮的含量高于芒柄花素; 红芪中不含黄芪甲苷, 黄芪中含有黄芪甲苷. 结论: 可以用色谱法准确、可靠地鉴别黄芪和红芪药材.

关键词: 高效液相色谱; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 黄芪甲苷; 黄芪; 红芪

中图分类号: O657.7

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2005)01-0046-05

黄芪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^[1], 始载于《神农本草经》^[2]. 红芪为豆科植物多序岩黄芪(*Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz)的干燥根^[1], 据考证《本草经集注》已有红芪入药的记载^[3]. 它们都具有补气固表、利尿排毒、排脓、敛疮生肌等多种功效^[1], 都能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 红芪副作用较黄芪小^[4]. 西北一些地方将红芪作为黄芪使用^[5], 我国台湾、港、澳及东南亚一些地区, 有药用红芪的习惯, 认为红芪是黄芪的优良品种^[6]. 1985 年版药典始将红芪列为一种中药. 传统的药材鉴别是根据药材的外观性状、粉末特征进行鉴别的, 方法简单快速, 但是需要大量、长期的经验积累, 当遇到外型破坏的原药材或粉末状药材就很难鉴别. 我们用高效液相色谱法研究黄芪和红芪的指纹图谱, 指标成分的定性定量分析, 结果在同样的色谱条件下, 黄芪与红芪的图谱和指标成分的含量有明显的差别, 即使外观形态被破坏或粉末状的黄芪和红芪药材也可以很容易鉴别, 该方法为这 2 种药材的区别提供了简单、快速的科学依据.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

美国 Waters2695 型高效液相色谱仪, 2996 二

极管阵列检测器, M³² 色谱管理站, 乙腈和甲醇为色谱纯(山东禹王实业有限公司禹城化工厂)、冰醋酸为分析纯(北京化工厂)、超纯水(兰州医学院第一附属医院药剂科), 黄芪、红芪采自甘肃省武都县、陇西县、漳县、岷县, 由兰州医学院生药学教研室赵汝能教授、马志刚教授鉴定. 芒柄花素(纯度 99.37%)、毛蕊异黄酮(纯度 99.83%)由上海中药研究所提供, 黄芪甲苷对照品、黄芪对照药材(购自中国生物药品检定所).

1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷对照品, 用甲醇溶解并定容. 制成浓度为毛蕊异黄酮 2.35 mg/mL, 芒柄花素 2.32 mg/mL, 黄芪甲苷 1.22 mg/mL 的对照品溶液.

1.3 供试品溶液的制备

1.3.1 正丁醇法

用四分法称取药材 2.5 g, 用甲醇超声提取 3 次(30、30、30 mL), 每次 30 min, 蒸干甲醇. 残渣用 40 mL 水溶解, 再用正丁醇萃取四次(40、40、20、20 mL), 合并正丁醇提取物, 减压回收正丁醇至干, 残渣用甲醇超声溶解, 定容于 5 mL 容量瓶中. 用 0.45 μm 膜过滤, 取滤液备用.

1.3.2 甲醇法

用四分法称取药材 2.5 g, 用甲醇超声提取 3 次,

收稿日期: 2004-09-06; 修订日期: 2004-11-02.

基金项目: 甘肃省省长基金资助项目(No. GS015-A45-007, GS024-A43-018).

作者简介: 赵健雄(1943-), 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合抗肿瘤和中药质量标准研究.

过滤提取液, 滤液定容于 25 mL 容量瓶中, 用 0.45 μm 膜过滤, 取滤液备用.

2 结果与讨论

2.1 指纹图谱研究

色谱条件: 大连依利特 C_{18} 色谱柱 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm); 水-乙腈梯度流动相, 见表 1. 温度 25 $^{\circ}\text{C}$; 以黄酮为参照物检测波长确定为 254 nm, 进样量 10 μL .

表 1 黄芪、红芪药材图谱分析流动相

Table 1 Mobile phase of chromatographic analysis of Huangqi and Hongqi			
时间/min	流速/(mL/min)	水/%	乙腈/%
0	1.0	96	4
20	1.0	75	25
40	1.0	55	45
60	1.0	30	70
70	1.0	20	80
80	1.0	0	100

检测波长的选择: 对 190~400 nm 扫描的各波长下的色谱图进行分析比较, 结果在 254 nm 波长下各峰分离良好, 峰数目也比较多, 而且指纹图谱的参照物毛蕊异黄酮和芒柄花素在此波长都有最大吸收, 因此, 选择 254 nm 作为检测波长.

供试品溶液制备方法的选择: 用 2 种方法制备的供试品溶液, 按色谱条件测定黄芪和红芪的指纹图谱, 结果用甲醇法提取, 放置 1~2 d 会析出颗粒状水溶性结晶, 导致指纹图谱的稳定性差, 峰数少. 用正丁醇法处理样品可以除去水溶性的单糖和多糖, 延长色谱柱的使用寿命, 测定的峰数多, 分离良好, 因此选择正丁醇法处理样品.

流动相的选择: 首先以常用的甲醇和水作为流动相进行检测, 调整各种比例, 分离效果不理想. 于是将水换为醋酸溶液, 并分别选用 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的醋酸溶液, 结果 1.0% 的醋酸溶液和甲醇一起组成梯度流动相分离效果较好, 但是峰数较少. 又将甲醇换为乙腈, 以不同比例和不同梯度的乙腈和水作为流动相, 获得理想的分离(见表 1).

参照物色谱峰的鉴定: 在 254 nm 波长下, 用表 1 的流动相测定参照物毛蕊异黄酮和芒柄花素, 其保留时间分别为 28.40、37.38 min, 并与黄芪、红芪样品图谱中相应色谱峰进行比较, 发现黄芪样品图

谱中的 13 号、19 号峰的保留时间及紫外光谱图分别与毛蕊异黄酮、芒柄花素一致, 故黄芪样品图谱中 13 号和 19 号特征峰鉴定为毛蕊异黄酮和芒柄花素, 见图 1. 红芪样品图谱中的 10 号、14 号峰的保留时间及紫外光谱图分别与毛蕊异黄酮、芒柄花素一致, 故红芪样品图谱中 10 号和 14 号特征峰鉴定为毛蕊异黄酮和芒柄花素, 见图 2. 黄芪与红芪药材的高效液相色谱图有明显的差别, 见图 3.

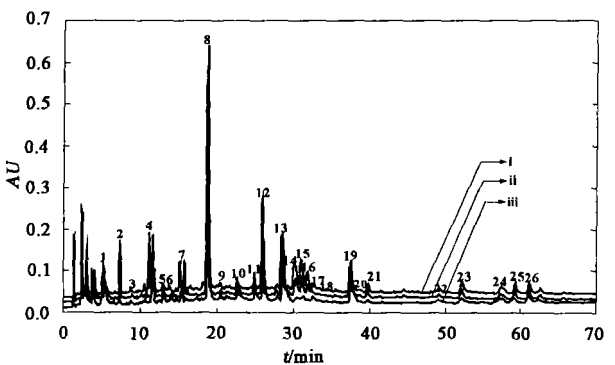


图 1 黄芪药材特征图谱

Fig. 1 Typical chromatogram for determination of Huangqi (图中 13, 19 号峰分别为毛蕊异黄酮和芒柄花素, i 为黄芪对照药材, ii 为陇西黄芪, iii 为漳县黄芪)

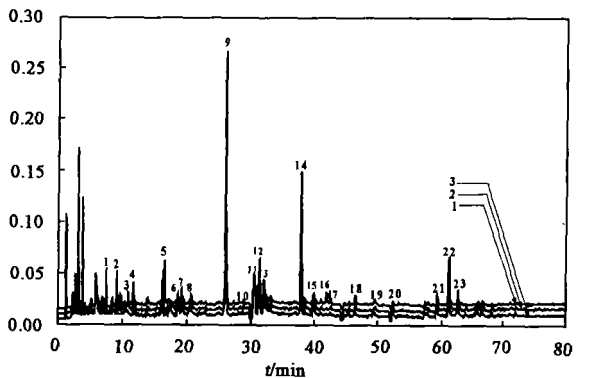


图 2 1 武都米仓山、2 岷县、3 陇西首阳红芪色谱图 (10 号和 14 号峰分别为毛蕊异黄酮和芒柄花素)

Fig. 2 Typical chromatogram for determination of Hongqi from 1 Wudu Mi Cang mountain, 2 Minxian, 3 Longxi Shouyang (10th and 14th peaks were formononetin, calycosin).

指纹图谱分析、数据处理及相似度: 用色谱条件测定了 10 批黄芪药材样品和 10 批红芪药材指纹图谱. 以黄芪对照药材为对照, 对黄芪各药材样品的各个峰紫外光谱图进行对比分析, 找到 26 个共有

峰; 由于武都米仓山是地道红芪产地, 所以以武都米仓山红芪为对照药材, 对各个峰紫外光谱图进行对比分析, 找到 23 个共有峰. 分别对黄芪、红芪各个样

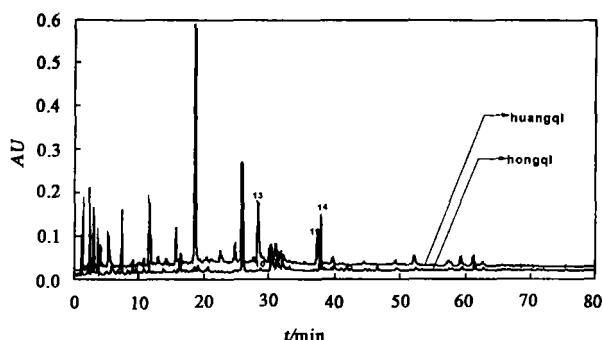


图 3 红芪药材图谱(10 号和 14 号峰分别为毛蕊异黄酮和芒柄花素),

黄芪药材图谱(13 号和 19 号峰分别为毛蕊异黄酮和芒柄花素)

Fig. 3 Typical chromatogram of hongqi (10th and 14th peaks were formononetin, calycosin. Typical chromatogram of huangqi (13th and 19th peaks were formononetin, calycosin)

品的相似度进行计算. 数据处理用 Waters Patten Match 相似度软件, 采用的原理是夹角余弦法. 以共有峰的峰面积计算相似度, 10 个黄芪样品的平均相似度为 93.36%, 10 个红芪样品的平均相似度为 97.30%. 黄芪样品共有峰与 19 号峰相比的平均相对保留时间分别为: 1(0.143), 2(0.196), 3(0.237), 4(0.308), 5(0.368), 6(0.390), 7(0.459), 8(0.498), 9(0.545), 10(0.600), 11(0.661), 12(0.689), 13(0.759), 14(0.777), 15(0.807), 16(0.829), 17(0.848), 18(0.862), 19(1), 20(1.030), 21(1.058), 22(1.311), 23(1.389), 24(1.576), 25(1.625), 26(1.665). 红芪样品共有峰与 14 号峰相比的平均相对保留时间分别为: 1(0.198), 2(0.242), 3(0.289), 4(0.308), 5(0.429), 6(0.495), 7(0.508), 8(0.516), 9(0.687), 10(0.759), 11(0.806), 12(0.829), 13(0.848), 14(1), 15(1.057), 16(1.109), 17(1.125), 18(1.183), 19(1.312), 20(1.388), 21(1.576), 22(1.624), 23(1.661).

精密性与重现性: 分别取黄芪对照药材样品溶液, 连续进样 3 次, 测定指纹图谱相似度的日内精密性, 各共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%) 分

别为 95.93、98.87、99.16, $RSD = 1.82\%$; 分别在 0、1、2 d 进样, 测定指纹图谱相似度的日间精密性, 各共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%) 分别为 99.99、97.93、99.16, $RSD = 1.05\%$; 分别取岷县梅川镇杏林村黄芪 3 份, 按供试品溶液制备方法制备样品溶液, 测定指纹图谱相似度的重复性, 共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%) 分别为 94.08、94.03、94.32, $RSD = 0.16\%$.

黄芪药材与红芪药材指纹图谱对比: 图 3 是黄芪药材与红芪药材的指纹图谱对比, 可以明显看到他们的不同. 通过计算它们的相似度为 46.49%.

2.2 指标成分含量测定

2.2.1 黄芪甲苷的含量测定

色谱条件为 Kromasil ODS-1(5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm) 色谱柱(天津琛航科学仪器有限公司), Kromasil ODS 保护柱(5 μm , 4.6 mm $\times$ 10 mm), 流动相为乙腈: 水(67: 33), 进样量 10 μL , 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$. 黄芪甲苷的回归方程和相关系数为: $A = 4.52 \times 10^4 C - 2.11 \times 10^4$, $r = 0.9993$, 线性范围为: 1.125 ~ 6.075 μg . 样品处理方法同 1.3.1, 结果红芪中未检出黄芪甲苷, 黄芪中黄芪甲苷的平均含量为 1.19 mg/g($n = 10$). 色谱图见图 4, 图 5.

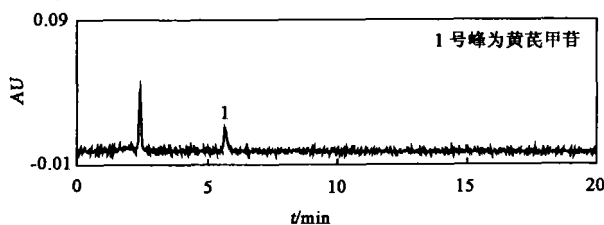


图 4 黄芪甲苷对照品 HPLC 图

Fig. 4 Chromatogram of astragaloside IV

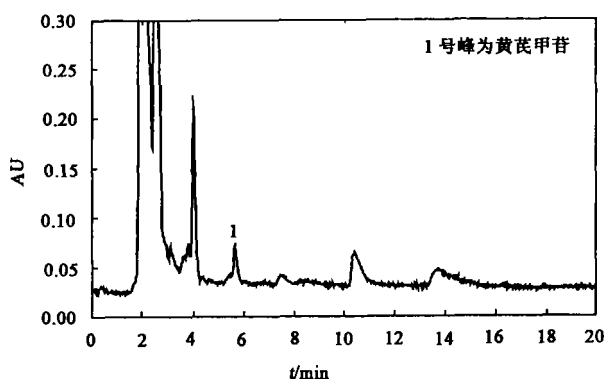


图 5 黄芪样品的 HPLC 图

Fig. 5 Chromatogram from sample of huangqi

2.2.2 毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量测定

色谱条件为 Kromasil C₁₈(5 μm, 4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 流动相为甲醇: 水, 梯度洗脱, 0~ 10 min, 水: 甲醇(40: 60~ 50: 50), 10~ 30 min, 水: 甲醇(50: 50~ 60: 40), 30 min, 水: 甲醇(60: 40), 测定波长 254 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 ℃, 进样量 10 μL. 毛蕊异黄酮和芒柄花素的回归方程和相关系数分别为: $A = 1.12 \times 10^5 C - 7.70 \times 10^4, r = 0.9992$; $A = 1.09 \times 10^5 C - 9.19 \times 10^4, r =$

0.9962. 线性范围分别为: 2.350~ 47.0 ng; 2.325~ 46.5 ng. 样品处理方法同 1.3.1, 黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量为 0.71~ 13.06 μg/g、0.68~ 9.90 μg/g, 红芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量为 0.55~ 4.10 μg/g、6.25~ 17.74 μg/g, 色谱图见图 6~ 图 8.

3 结论

(1) 可以用指纹图谱、黄芪甲苷成分的有无、毛

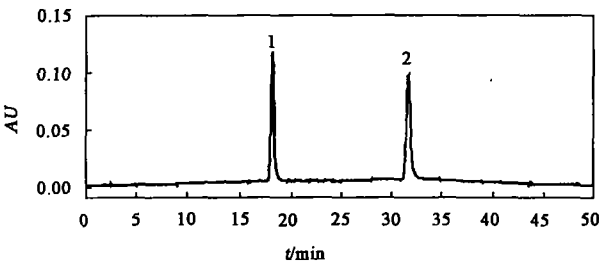


图 6 毛蕊异黄酮(1)和芒柄花素(2)对照品的 HPLC 图
Fig.6 Chromatogram of formononetin(1), calycosin(2)

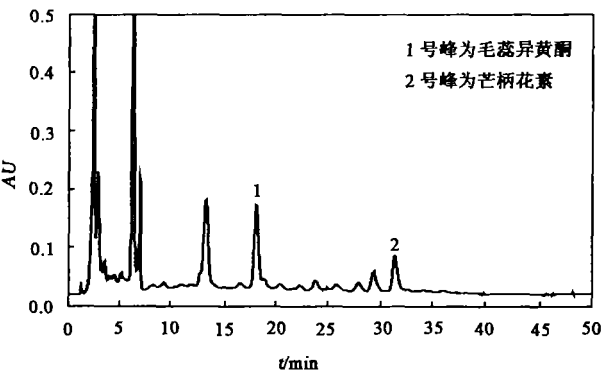


图 7 黄芪样品的 HPLC 图

Fig.7 Chromatogram from sample of huangqi

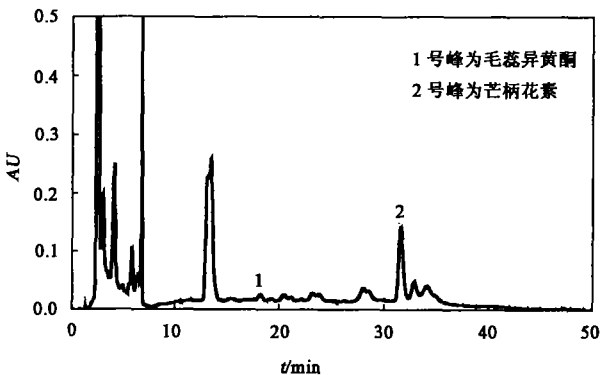


图 8 红芪样品的 HPLC 图

Fig.8 Chromatogram from Sample of Huangqi

蕊异黄酮和芒柄花素的相对含量这 3 项指标中的任何一个指标来区别黄芪和红芪.

(2) 当用指标成分黄芪甲苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素鉴别黄芪和红芪药材时, 必须有对照品, 否则无法鉴别. 而用指纹图谱鉴别时只要有对照药材或者保存有特征色谱图就可以鉴别黄芪和红芪药材.

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 249.

[2] 李桂春, 高天爱, 文建民, 等. 黄芪、红芪及其类同品的质量考察[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(8): 454-456.
[3] 李成义, 张雅聪. 红芪研究进展[J]. 中草药, 1991, 22(12): 559-560.
[4] Ren Xiaoni(任小妮), Gu Shangyou(顾尚友), Zhang Yinzhi(张荫芝). Journal of Lanzhou Medical College (兰州医学院学报)[J]. 1985, 4: 92.
[5] 杨智, 刘静明, 王伏华, 等. 中药红芪的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(10): 615-616.
[6] 李广民, 王维宁, 胡妙申, 等. 中药红芪生药学研究[J]. 中药通报, 1987, 12(8): 453-455.

Identification of Huangqi and Hongqi Herbs by HPLC

ZHAO Jian-xiong, FENG Shi-lan, HU Fang-di
(Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Subject: Identification of Huangqi and Hongqi herbs. Method: High-performance liquid chromatography (HPLC). Data were analyzed by Patten match soft from Waters company. Result: Huangqi has 26 common peaks. Hongqi has 23 common peaks. Content of formononetin is lower than calycosin in Hongqi, but Huangqi is opposite. Huangqi possesses Astragloside, but Hongqi has not. Conclusion: It can be a better method to identify Huangqi and Hongqi herbs.

Key words: HPLC; formononetin; calycosin; Astragloside; huangqi; hongqi

Classifying number: O657.7

声 明

本刊加入“万方数据—数字化期刊群”声明

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊现已入网“万方数据—数字化期刊群”。因此,向本刊投稿并录用的文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据—数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请特别声明将另作处理。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。“万方数据—数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,征订本刊。

《分析测试技术与仪器》编辑部