

## 马鬃蛇药酒中染料木苷、染料木素、 原儿茶酸和没食子酸的测定

卓燊<sup>1</sup>, 陈君<sup>2</sup>, 秦海洸<sup>1\*</sup>

(1. 广西科技大学医学院, 广西 柳州 545005; 2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

**[摘要]** **目的:** 采用高效液相梯度洗脱法测定马鬃蛇药酒(MZSYJ)中染料木苷、染料木素、原儿茶酸和没食子酸的含量。**方法:** Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。染料木苷和染料木素: 流动相 A 为乙腈-甲醇(2:1), 流动相 B 为 0.2% 甲酸水溶液, 检测波长 261 nm。原儿茶酸和没食子酸: 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.3% 磷酸溶液, 检测波长 268 nm。**结果:** 染料木苷和染料木素分别在 0.010 4~0.208 0 μg( $r=0.999\ 3$ ), 0.004 8~0.096 0 μg( $r=0.999\ 6$ ) 进样量与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 97.18%, 96.94%, RSD 分别为 1.52%, 1.40%; 原儿茶酸和没食子酸分别在 0.038 2~0.764 0 μg( $r=0.999\ 1$ ), 0.011 6~0.232 0 μg( $r=0.999\ 4$ ) 进样量与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 95.97%, 98.39%, RSD 分别为 1.10%, 1.45%。**结论:** 该方法测定结果准确、灵敏、重复性好。

**[关键词]** 马鬃蛇药酒; 染料木苷; 染料木素; 原儿茶酸; 没食子酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0072-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100072

## Determination of Genistin, Genistein, Protocatechuic Acid and Gallic Acid in MZSYJ by HPLC

ZHUO Shen<sup>1</sup>, CHEN Jun<sup>2</sup>, QIN Hai-guang<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545005, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for determination of the content of genistin, genistein, protocatechuic acid and gallic acid in Mazongshe Yaojiu (MZSYJ). **Method:** An Hypersil C<sub>18</sub> column was used as the chromatographic column, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. Genistin and genistein: the mobile phase A consisted of acetonitrile-methanol (2:1), the mobile phase B consisted of 0.2% formic acid solution, the UV detection wavelength was at 261 nm. Protocatechuic acid and gallic acid: the mobile phase A consisted of methanol, the mobile phase B consisted of 0.3% phosphoric acid solution. The UV detection wavelength was at 268 nm. **Result:** There were a good linear relationship between the concentration of genistin, genistein and peak area value when the concentrations of genistin and genistein were within the range of 0.010 4-0.208 0 μg ( $r=0.999\ 3$ ), 0.004 8-0.096 0 μg ( $r=0.999\ 6$ ). The average recovery were 97.18% (RSD 1.52%) and 96.94% (RSD 1.40%). There were a good linear relationship between the concentration of protocatechuic acid, gallic acid and peak area value when the concentrations of protocatechuic acid and gallic acid were within the range of 0.038 2-0.764 0 μg ( $r=0.999\ 1$ ), 0.011 6-0.232 0 μg ( $r=0.999\ 4$ ). The average recovery were 95.97% (RSD 1.10%) and 98.39% (RSD 1.45%). **Conclusion:** The method was accurate, sensitive, reproducible

**[收稿日期]** 20131016(010)

**[基金项目]** 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(Z2012602)

**[第一作者]** 卓燊, 硕士, 主管中药师, 从事中药药效与理论研究, Tel:0772-2056086

**[通讯作者]** \* 秦海洸, 教授, 硕士研究生导师, 从事皮肤病、性病的中医药物治疗研究, E-mail: qinghaiguanglunwen@163.com

and may be used in the of genistin, genistein, protocatechuic acid and gallic acid in MZSYJ.

[Key words] Mazongshe Yaojiu; genistin; genistein; protocatechuic acid; gallic acid

马鬃蛇药酒为中药复方制剂,源于卫生部药品标准《中药成方制剂》第八册,由千斤拔、鸡血藤、马鬃蛇、黑老虎根、杜仲藤、桑寄生、龙须藤、牛大力、山苍子、半枫荷、走马胎、狗脊、金樱子等13味药物组成。具有祛风湿、通经络、消肿痛、强筋骨的功效,可用于腰肌劳损,风湿之腰腿痛、关节痛等症的治疗<sup>[1-3]</sup>。原质量标准仅对个别药味进行了显色鉴别,未对方中的任何药味进行含量测定,为保证产品质量,确保临床疗效,本文采用高效液相梯度洗脱法对千斤拔中染料木苷、染料木素和鸡血藤中原儿茶酸、没食子酸进行含量测定方法研究,为完善该制剂质量标准提供依据,能有效控制产品的内在质量,确保人民用药安全有效。实验结果表明该方法准确、可靠、方便、快速。

## 1 仪器与试剂

LC-10ATVP型高效液相色谱仪(日本岛津,岛津自动进样器SIL-10ADVP),ANASTAR色谱数据工作站,SPD-10AVP型紫外-可见检测器。染料木苷(批号111709-200501)、染料木素(批号111704-201302,纯度为99.1%)、原儿茶酸(批号110809-201205,纯度为99.9%)和没食子酸(批号110831-201204,纯度为89.9%)对照品,均购于中国食品药品检定研究院,马鬃蛇药酒(规格:每瓶装250 mL,批号为130811,130824,130828)购于广东一禾药业有限公司,甲醇、乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),磷酸(分析纯,广州化学试剂二厂),甲酸(色谱纯,上海源叶生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 染料木苷和染料木素的含量测定<sup>[4-10]</sup>

**2.1.1 色谱条件及系统适应性** Hypersil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相A为乙腈-甲醇(2:1),流动相B为0.2%甲酸水溶液;(0~21 min, 36% A, 64% B; 22~43 min, 36%~59% A, 64%~41% B; 44~55 min, 59% A, 41% B)进行梯度洗脱;检测波长261 nm,流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>。在此条件下染料木苷和染料木素与其他组分分离效果良好,以染料木素计理论塔板数应不低于2 500。

**2.1.2 对照品混合溶液的制备** 精密称取染料木苷对照品和染料木素对照品各适量,加75%乙醇制成对照品混合溶液(染料木苷为0.010 4 g·L<sup>-1</sup>,染料木素为0.004 8 g·L<sup>-1</sup>)。

**2.1.3 供试品溶液的配制** 精密量取本品4.0 mL,置50 mL量瓶中,加75%乙醇至刻度,摇匀,滤过,取滤液作为供试品溶液。

**2.1.4 阴性对照溶液的配制** 按马鬃蛇药酒处方比例称取适量除千斤拔的其余药味,按马鬃蛇药酒的前处理和制剂生产工艺制成缺千斤拔的阴性样品,按照上述供试品溶液的配制方法制成缺千斤拔的阴性对照溶液。

**2.1.5 线性关系考察** 精密吸取对照品混合溶液1, 5, 10, 15, 20 μL,按上述色谱条件进行测定,以峰面积积分值为纵坐标,染料木苷、染料木素量为横坐标分别绘制标准曲线,得回归方程 $Y_{\text{染料木苷}} = 5.3649 \times 10^6 X + 564.7$  ( $r = 0.9993$ );  $Y_{\text{染料木素}} = 2.5971 \times 10^6 X + 293.4$  ( $r = 0.9996$ )。结果表明染料木苷在0.010 4~0.208 0 μg进样量与峰面积线性关系良好;染料木素在0.004 8~0.096 0 μg进样量与峰面积线性关系良好。

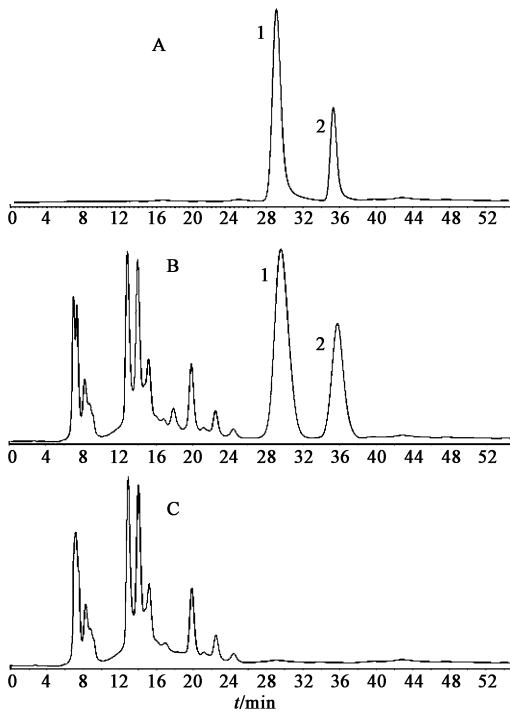
**2.1.6 阴性对照试验** 分别精密吸取10 μL的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液,按2.1.1项的色谱条件进行色谱分析,结果供试品溶液色谱中,在与染料木苷对照品和染料木素对照品相同保留时间处有吸收峰,而阴性对照溶液在相同保留时间处未显吸收峰,见图1。

**2.1.7 精密度试验** 取对照品混合溶液重复进样6次,按2.1.1项的色谱条件测定染料木苷和染料木素的峰面积,结果表明,仪器具有良好的精密度,染料木苷和染料木素的RSD分别为0.53%, 0.82%。

**2.1.8 重复性试验** 取同一批样品,按上述方法制备6份供试品溶液,分别测定其含量,染料木苷和染料木素的RSD分别为0.37%, 0.42%。结果表明本方法具有良好的重复性。

**2.1.9 稳定性试验** 取同一供试品溶液,在放置0, 1, 2, 4, 6, 8 h后精密吸取10 μL进样,测定其峰面积值,染料木苷和染料木素的RSD分别为0.59%, 0.72%,供试品溶液8 h内基本稳定。

**2.1.10 加样回收率试验** 取已知含量(染料木苷含量0.128 g·L<sup>-1</sup>,染料木素含量0.062 g·L<sup>-1</sup>)的同一批样品适量,精密量取本品2.0 mL,置50 mL量瓶中,精密加入对照品混合溶液25 mL,加75%乙醇至刻度,摇匀,滤过,取滤液作为加样供试品试液。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照品; 1. 染料木苷; 2. 染料木素

图 1 染料木苷和染料木素的 HPLC

精密吸取加样供试液 10  $\mu\text{L}$ , 按上述含量测定方法测定其峰面积, 计算回收率, 结果表明本方法回收率良好, 见表 1。

表 1 染料木苷和染料木素回收率试验

成分	测得量	回收率	平均值	RSD
	/mg	/%	/%	/%
染料木苷	0.509	97.31	97.18	1.52
	0.513	98.85		
	0.502	94.62		
	0.511	98.08		
	0.507	96.54		
	0.510	97.69		
染料木素	0.241	97.50	96.94	1.40
	0.238	95.00		
	0.240	96.67		
	0.242	98.33		
	0.239	95.83		
	0.242	98.33		

注: 染料木苷样品中含量 0.256 mg, 加入量 0.260 mg; 染料木素样品中含量 0.124 mg, 加入量 0.120 mg。

## 2.2 原儿茶酸和没食子酸的含量测定<sup>[16-20]</sup>

**2.2.1 色谱条件及系统适应性** Hypersil  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (4.6 mm  $\times$  200 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.3% 磷酸溶液, (0 ~ 19 min, 42.0% A, 58.0% B; 20 ~ 26 min, 42.0% ~ 71.0% A, 58.0% ~ 29.0% B; 27 ~ 38 min, 71.0% A, 29.0% B 进行梯度

洗脱, 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 268 nm。在此条件下原儿茶酸和没食子酸与其他组分基线分离良好, 以没食子酸计理论塔板数应不低于 3 000。

**2.2.2 对照品混合溶液的制备** 精密称取原儿茶酸和没食子酸对照品适量, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解后稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品混合溶液 (原儿茶酸为 0.038 2 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 和没食子酸 0.011 6 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取本品 4.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.4 阴性对照溶液的制备** 按马鬃蛇药酒处方比例称取适量除鸡血藤的其余药味, 按马鬃蛇药酒的前处理和制剂生产工艺制成缺鸡血藤的阴性样品, 按照上述供试品溶液的配制方法制成缺鸡血藤的阴性对照溶液。

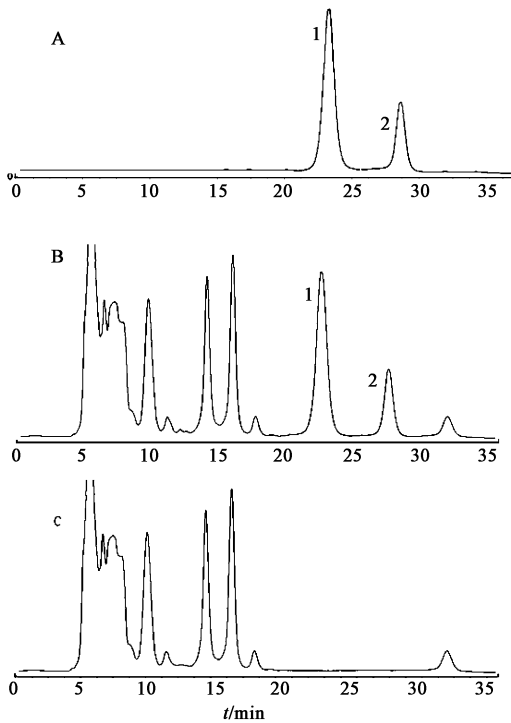
**2.2.5 线性关系考察** 分别精密吸取对照品混合溶液 1, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{L}$ , 按 2.2.1 项下的色谱条件进行梯度洗脱, 以峰面积积分为纵坐标, 原儿茶酸、没食子酸量为横坐标分别绘制标准曲线, 回归方程为原儿茶酸  $Y = 6.2357 \times 10^6 X + 359.4$  ( $r = 0.9991$ ); 没食子酸  $Y = 4.3681 \times 10^6 X - 659.0$  ( $r = 0.9994$ )。结果表明原儿茶酸在 0.038 2 ~ 0.764 0  $\mu\text{g}$  进样量与峰面积线性关系良好; 没食子酸在 0.011 6 ~ 0.232 0  $\mu\text{g}$  进样量与峰面积线性关系良好。

**2.2.6 阴性对照试验** 分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$  的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液, 按 2.2.1 项的色谱条件进行色谱分析, 结果供试品溶液色谱中, 在与原儿茶酸和没食子酸对照品相同保留时间处有吸收峰, 而阴性对照溶液在相同保留时间处未显吸收峰, 见图 2。

**2.2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 在放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 后精密吸取 10  $\mu\text{L}$  进样, 测定其峰面积值, 原儿茶酸和没食子酸 RSD 分别为 0.93%, 0.79%。结果表明, 供试品溶液 8 h 内基本稳定。

**2.2.8 精密度试验** 取对照品混合溶液重复进样 6 次, 按 2.2.1 项的色谱条件测定原儿茶酸和没食子酸的峰面积, 结果表明, 仪器具有良好的精密度, 原儿茶酸和没食子酸的 RSD 分别为 0.26%, 0.33%。

**2.2.9 重复性试验** 取同一批样品, 按上述方法制备 6 份供试品溶液, 分别测定其含量, 原儿茶酸和没食子酸的 RSD 分别为 0.52%, 0.37%。结果表明本方法具有良好的重复性。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照品; 1. 原儿茶酸; 2. 没食子酸

图2 原儿茶酸和没食子酸的 HPLC 图

**2.2.10 加样回收率试验** 取已知含量(原儿茶酸为  $0.464 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、没食子酸为  $0.147 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的同一批样品适量,精密量取  $2.0 \text{ mL}$ ,置  $50 \text{ mL}$  具塞锥形瓶中,分别精密加入对照品混合溶液  $25 \text{ mL}$ ,加  $50\%$  甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为加样供试液。精密吸取加样供试液  $10 \mu\text{L}$ ,按上述含量测定方法测定其峰面积,计算回收率,结果表明本方法回收率良好,见表 2。

表2 原儿茶酸和没食子酸回收率试验

成分	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
原儿茶酸	1.849	96.44	95.97	1.10
	1.862	97.80		
	1.833	94.76		
	1.840	95.50		
	1.839	95.39		
	1.844	95.92		
没食子酸	0.582	99.31	98.39	1.45
	0.579	98.28		
	0.577	97.59		
	0.585	100.34		
	0.573	96.21		
	0.58	98.62		

注:原儿茶酸样品中含量  $0.928 \text{ mg}$ ,加入量  $0.955 \text{ mg}$ ,没食子酸样品中含量  $0.294 \text{ mg}$ ,加入量  $0.290 \text{ mg}$ 。

**2.3 样品测定** 取 3 批样品按 2.1 项下染料木苷

和染料木素测定方法和 2.2 项下原儿茶酸和没食子酸测定方法测定本品含量,结果见表 3。

表3 马鬃蛇药酒中各成分含量测定( $n=3$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 

批号	染料木苷 RSD /%	染料木素 RSD /%	原儿茶酸 RSD /%	没食子酸 RSD /%
130811	0.128	1.25	0.062	1.87
130824	0.148	1.70	0.057	1.75
130828	0.139	1.81	0.066	1.76

### 3 讨论

本文曾分别采用乙腈-甲醇(2:1)与  $0.2\%$  甲酸水溶液(梯度洗脱)、甲醇- $0.3\%$  磷酸溶液(梯度洗脱)和乙腈- $0.3\%$  磷酸溶液(梯度洗脱)为流动相,同时对千斤拔中染料木苷、染料木素和鸡血藤中原儿茶酸、没食子酸进行含量测定,结果以乙腈- $0.3\%$  磷酸溶液(梯度洗脱)为流动相时所测 4 个成分均达不到基线分离;以乙腈-甲醇(2:1)与  $0.2\%$  甲酸水溶液(梯度洗脱)为流动相时染料木苷和染料木素分离效果极好,而原儿茶酸和没食子酸拖尾现象严重;以甲醇- $0.3\%$  磷酸溶液(梯度洗脱)为流动相时原儿茶酸和没食子酸能达到基线分离,但染料木苷和染料木素分离效果欠佳。采用某一特定流动相进行梯度洗脱同时测定这 4 个成分含量还需进一步进行研究。

### [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,2010:180,附录 30,附录 36.
- [2] 国家药典委员会. 国家药品标准中药成方制剂. 第八册[S]. 北京:人民卫生出版社,1998:32.
- [3] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准(2009版)[S]. 湖南:湖南科学技术出版社,2010:17.
- [4] 李丹毅,富艳彬,华会明,等. 蔓性千斤拔根的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(7):1259.
- [5] 任朝琴,袁玮,朱斌,等. HPLC 筛选千斤拔中黄酮类成分的水提工艺[J]. 华西药学杂志,2012,27(5):571.
- [6] 蔡毅,梁雁,李小云,等. 广西产 3 种千斤拔的生药学鉴别[J]. 华西药学杂志,2012,27(5):493.
- [7] 刘佳胜,周日宝,李凤娟,等. 人工栽培大叶千斤拔总黄酮含量的动态变化研究[J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(5):43.
- [8] 谷筱玉,王硕,袁经权,等. 蔓性千斤拔中染料木素和染料木苷的提取工艺研究[J]. 中药材,2011,34(6):988.

# HPLC同时测定增液汤中多种指标性成分的含量

杜中英, 戚进, 余伯阳\*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

**[摘要]** **目的:**建立同时测定增液汤中5-羟糠醛、毛蕊花糖苷、安格洛苷C、哈帕俄苷、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮A和甲基麦冬黄烷酮B 7种不同类型成分含量的方法。**方法:**按照传统经方制备增液汤,采用HPLC方法,色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动乙腈-0.02%甲酸水梯度洗脱,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长296 nm。**结果:**5-羟糠醛、毛蕊花糖苷、安格洛苷C、哈帕俄苷、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮A、甲基麦冬黄烷酮B线性范围分别为4.12~165.00, 3.98~159.20, 6.97~278.80, 7.25~290.00, 4.29~171.60, 0.07~2.80, 0.12~5.00 mg·L<sup>-1</sup>,相关系数(*r*)均>0.999 6;平均加样回收率分别为97.42%, 96.97%, 97.58%, 96.94%, 99.16%, 99.46%, 100.33%。**结论:**该方法操作简便、结果准确可靠,具有较好的重复性和稳定性,为提高当前增液汤的质控标准提供了研究方法和数据参考。

**[关键词]** 增液汤; 5-羟糠醛; 毛蕊花糖苷; 安格洛苷C; 哈帕俄苷; 肉桂酸; 甲基麦冬黄烷酮A; 甲基麦冬黄烷酮B

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0076-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100076

## Simultaneous Determination of Seven Components in Zengye Decoction by HPLC

DU Zhong-ying, QI Jin, YU Bo-yang\*

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,  
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, china)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of 5-HMF, harpagoside, acteoside, angoroside C, cinnamic acid, methylophiopogonanone A and methylophiopogonanone B in Zengye Decoction. **Method:** A Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used; The mobile phase was acetonitrile-0.02% formic acid in gradient elution at flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup> detected at 296 nm; The column temperature was maintained at 30℃. **Result:** The linear range (mg·L) of 5-HMF, acteoside, angoroside C, harpagoside, cinnamic acid, methylophiopogonanone A and methylophiopogonanone B was 4.12-165.00, 3.98-

**[收稿日期]** 20131125(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(30901956)

**[第一作者]** 杜中英, 硕士生, 从事中药质量标准研究, Tel:15051867885, E-mail:duzhongying1017@126.com

**[通讯作者]** \*余伯阳, 教授, 博士生导师, 从事生药质量控制研究 Tel:25-86185157, E-mail:boyangyu59@163.com

- [9] 李莉, 刘志华, 秦民坚. HPLC法同时测定千斤拔属植物7种黄酮的含量[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(5):54.
- [10] 杨启明, 张春风, 杨中林. HPLC测定不同产地蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(8):744.
- [11] 刘军民, 安冉, 翟明. 鸡血藤商品药材质量评析[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5):573.
- [12] 张火旺. HPLC测定鸡血藤片中原儿茶酸的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(2):273.
- [13] 边宝林, 王宏洁, 司南. 鸡血藤药材中表儿茶素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6):31.
- [责任编辑 顾雪竹]