

HPLC 同时测定更年舒丸中的 6 种成分的含量

王丽萍, 曹英杰, 段晓颖

(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:建立同时测定更年舒丸中没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚含量的方法。方法:采用 HPLC 测定, Agilent C₁₈ 色谱柱(ZORBAX, SB-AQ, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 甲酸水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 检测波长 238 nm(马钱苷), 270 nm(没食子酸、葛根素、大黄素、大黄素甲醚), 320 nm(阿魏酸)。结果:6 个成分的方法学考察均合格, 阴性均无干扰, 平均加样回收率为 98.2% ~ 103.2%, RSD 1.4% ~ 1.9%。结论:该方法简便、准确、专属性强, 为更年舒丸及其类似组方制剂的质量评价提供了研究基础。

[关键词] 高效液相色谱法; 更年舒丸; 没食子酸; 马钱苷; 葛根素; 阿魏酸; 大黄素; 大黄素甲醚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0083-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020083

Simultaneous Determination of Six Constituents in Gengnianshu Pills by HPLC WANG Li-ping, CAO Ying-jie, DUAN Xiao-ying (The First Affiliated Hospital of Heman University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of gallic acid, loganin, puerarin, ferulic acid, emodin and physcion in Gengnianshu pills. **Method:** HPLC was applied on an Agilent C₁₈ column (Zorbax SB-AQ 4.6mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% formic acid water as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Detection wavelenghtes were set at 238 nm (loganin), 270 nm (gallic acid, puerarin, emodin and physcion), and 320 nm (ferulic acid). **Result:** The methodology of 6 components met the requirements, the blank test showed no interference, the average recovery rates were 98.2% - 103.2%, and RSD was 1.4% - 1.9%. **Conclusion:** This method is easy, accurate with high specificity. This study provides scientific basis for the quality evaluation of Gengnianshu pills.

[Key words] HPLC; Gengnianshu pills; gallic acid; loganin; puerarin; ferulic acid; emodin; physcion; quantitative analysis

更年舒丸是河南中医学院一附院临床验方, 由制何首乌、山茱萸、菟丝子、当归、葛根等 10 余味药组成, 临床用于治疗妇女绝经前后肝肾亏虚、气血失调所致潮热汗出, 烦躁易怒, 失眠多梦, 精神抑郁, 心悸头晕, 乏力纳差, 健忘等。

方中制何首乌益气补肾养血固精为君药; 山茱萸养血; 菟丝子补肾气, 增精髓; 当归调肝补血和血为佐药; 葛根生津止渴解肌除烦, 且解百药之毒, 为使药, 诸药合用, 具有阴阳双补、气血同益、调阴阳、固冲任之功。

现代药理研究认为, 妇女更年期综合征产生的

主要原因在于卵巢功能衰退引起的雌激素水平显著下降, 而大黄对人体具有雌激素调节作用^[1], 何首乌和大黄中的大黄素能显著产生植物雌激素样作用^[2]。同时, 山茱萸具有滋补肝肾的作用, 中医理论认为保肝肾可抗衰老, 山茱萸提取物具有延缓老年小鼠卵巢衰老的功效^[3]。葛根素对雌激素低下动物显示弱雌激素活性, 对正常雌激素水平动物无明显雌激素样活性, 提示葛根素具有雌激素受体部分激动剂的特性^[4]。该方临床使用多年以来, 疗效确切, 安全有效, 通过增加体内雌性激素水平改善植物神经功能紊乱从而可以较好地改善更年期的临床症状。

[收稿日期] 20140728(001)

[基金项目] 河南省科技攻关项目(0524420029)

[第一作者] 王丽萍, 从事化学研究, Tel:0371-66233639, E-mail:luckkid@126.com

本实验采用 HPLC 同时测定更年舒丸中没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚 6 种成分,旨在为更年舒丸的全面质量控制提供参考方法。

1 材料

1.1 仪器 2695 型高效液相色谱仪,2996 型二极管阵列检测器,Empower 工作软件(美国 Waters); CP225D 型电子天平(德国 Sartorius)。

1.2 试药 没食子酸(批号 110831-201204),马钱苷(批号 111640-201005),葛根素(批号 110752-200912),阿魏酸(批号 110773-201005),大黄素(批号 110756-200110),大黄素甲醚(批号 110758-201013)对照品均购于中国食品药品检定研究院;处方饮片由河南中医学院第一附属医院饮片库房提供;更年舒丸样品由河南中医学院第一附属医院药剂实验室提供(批号 130910),乙腈、甲酸(色谱纯, Sigma 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(ZORBAX SB-AQ 4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 5% ~ 12% A; 12 ~ 35 min, 12% ~ 17% A; 35 ~ 36 min, 17% ~ 48% A; 36 ~ 63 min, 48% ~ 59% A),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 10 μL,检测波长 238 nm(马钱苷),270 nm(没食子酸、葛根素、大黄素、大黄素甲醚),320 nm(阿魏酸)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚对照品适量,用甲醇溶解并配制成质量浓度分别为 0.345 6, 0.921 0, 2.646 0, 0.210 8, 0.263 0, 0.059 6 g · L⁻¹ 的各对照品储备溶液。

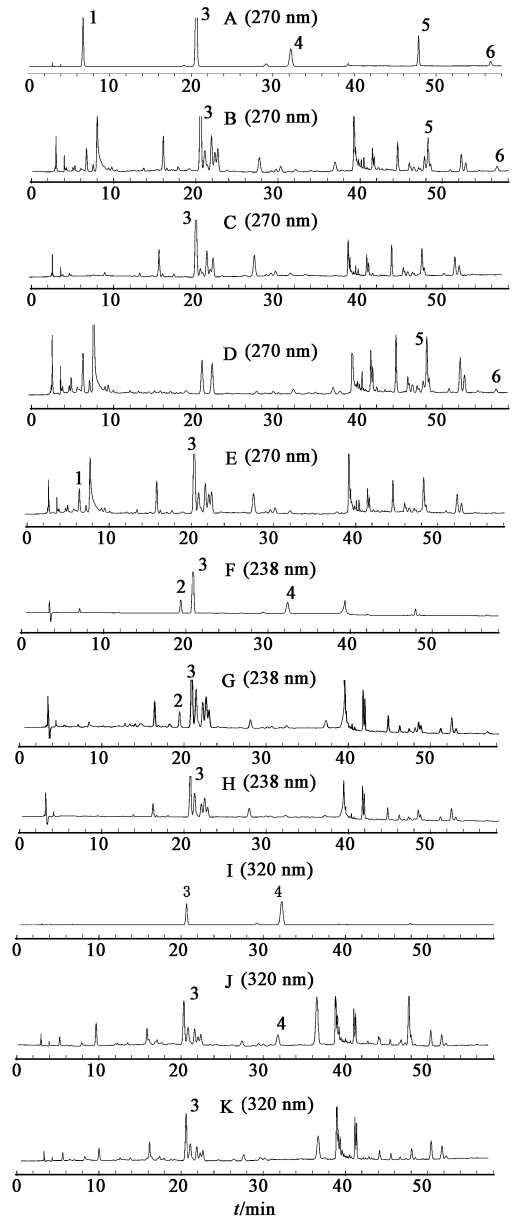
混合对照品溶液 精密量取没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚对照品储备液 0.40, 0.40, 0.32, 0.40, 0.30, 1.00 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过 50 目)约 2.0 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,密塞,精密称定质量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz)放冷至室温,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照更年舒丸的处方比例

和制备工艺,分别制备缺山茱萸、葛根、当归、制何首乌阴性样品,以及缺山茱萸、制何首乌双阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 吸取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果表明,没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚与其他峰分离度良好,各化合物对应的色谱峰理论塔板数均大于 3 000,阴性无干扰,见图 1。



A, F, I. 混合对照品; B, G, J. 供试品; C. 缺山茱萸、制何首乌阴性样品; D. 缺葛根阴性样品; E. 缺制何首乌阴性样品; H. 缺山茱萸阴性样品; K. 缺当归阴性样品; 1. 没食子酸; 2. 马钱苷; 3. 葛根素; 4. 阿魏酸; 5. 大黄素; 6. 大黄素甲醚

图 1 更年舒丸 HPLC

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Gengnianshu pills

2.4 标准曲线及线性范围的考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进样 4,6,8,10,12,14 μL ,测定峰面积,以对

照品进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程式见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项下混合对照

表 1 6 种成分回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficients and linear ranges

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
没食子酸	$Y = 3\ 101\ 978.9X + 25\ 078.4$	0.999 6	0.055 30 ~ 0.193 54
马钱苷	$Y = 3\ 772\ 347.6X - 72\ 429.2$	0.999 7	0.147 36 ~ 0.515 76
葛根素	$Y = 5\ 177\ 377.5X - 269\ 822.8$	0.999 8	0.338 69 ~ 1.185 41
阿魏酸	$Y = 1\ 078\ 930.6X - 4\ 563.2$	0.999 7	0.033 73 ~ 0.118 05
大黄素	$Y = 3\ 774\ 993.7X - 5\ 297.8$	0.999 7	0.031 56 ~ 0.110 46
大黄素甲醚	$Y = 2\ 539\ 149.1X + 46\ 149.9$	0.999 8	0.023 84 ~ 0.083 44

品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,测定没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚的峰面积,结果该 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.5%,0.3%,0.5%,0.8%,0.8%,0.9%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一更年舒丸供试品溶液 10 μL ,分别在 0,4,8,12,16,20 h 进样,记录峰面积,没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.0%,0.9%,0.8%,1.2%,1.6%,1.6%,表明供试品溶液在 20 h 内较稳定。

2.7 重复性试验 取同一批(批号 130910)更年舒丸样品 6 份。按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积,计算各成分的 RSD,结果没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚的 RSD 分别为 1.1%,0.8%,0.7%,0.9%,1.7%,1.2%。

2.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批(批号 130910)更年舒丸样品粉末 1.0 g,至 50 mL 量瓶中,分别精密加入各对照品储备液适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,进样量 10 μL ,计算加样回收率,结果见表 2。

2.9 样品测定 取 3 个批号的更年舒丸样品,每批 3 份,按 2.2.2 项下方法分别制备各供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进样,记录峰面积,以标准曲线法分别计算各成分的含量,结果见表 3。

3 讨论

提取条件的选择 分别考察了加热回流、超声提

表 2 更年舒丸样品中 6 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery tests

成分	样品 中量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / $\%$	RSD / $\%$
没食子酸	0.390 0	0.373 2	0.775 2	103.2	1.4
马钱苷	0.846 9	0.828 9	1.679 5	100.4	1.4
葛根素	2.085 8	2.116 8	4.239 7	101.8	1.5
阿魏酸	0.204 0	0.198 1	0.398 6	98.2	1.9
大黄素	0.240 4	0.236 7	0.478 7	100.7	1.9
大黄素甲醚	0.139 7	0.137 1	0.280 2	102.5	1.8

注:称样量均为 1.001 4 g。

表 3 3 批更年舒丸样品中 6 种成分的含量测定

Table 3 Determination results of Gengnianshu pills $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	没食 子酸	马钱苷	葛根素	阿魏酸	大黄素	大黄素 甲醚
130910	0.390 0	0.846 9	2.085 8	0.204 0	0.240 4	0.139 7
131217	0.428 1	0.870 7	2.326 5	0.220 5	0.239 8	0.150 1
140305	0.399 1	0.817 2	2.032 9	0.217 9	0.240 5	0.137 0

取法对上述 6 种成分的提取效率,结果表明超声提取与回流提取法提取率差别不大,且前者简便易行;同时还比较了超声 20,30,40 min 的提取效果,结果表明超声 30 min 有效成分提取率高于 20 min,与 40 min 提取率接近,故确定采取超声时间 30 min。

为保证各指标成分的检测灵敏度,根据 DAD 检测器上获得的紫外吸收光谱图,同时兼顾低含量成分(阿魏酸、大黄素等)的检测灵敏度,最终确定上述 6 个成分的检测波长分别为:没食子酸、葛根素、

大黄素、大黄素甲醚为 270 nm, 马钱苷 238 nm, 阿魏酸 320 nm, 在此条件下, 阴性无干扰, 所需检测的指标成分分离度及峰形均较佳, 灵敏度也较高。

曾分别以甲醇-0.1% 磷酸水、甲醇-0.2% 甲酸水、乙腈-0.1% 磷酸水系统为流动相^[5-11], 对更年舒丸供试品溶液中待测成分的分离情况进行了考察, 结果以乙腈-0.2% 甲酸水系统分离效果较好, 出峰快, 峰形良好, 本测定方法具有专属性强、分离效果好, 结果准确等特点。

本文建立了同时测定更年舒丸中没食子酸、马钱苷、葛根素、阿魏酸、大黄素、大黄素甲醚 6 种成分的含量测定方法, 方法准确可靠, 可用于更年舒丸的质量控制, 同时也为相关具有类似组方的复方制剂质量研究提供了参考。

[参考文献]

[1] USUI T, IKEDAL Y, TAGAMI T, et al. The phytochemical lindleyin, isolated from Rheirhizoma, mediates hormonal effects through estrogen receptors [J]. J Endocrinol, 2002, 175(2): 288-296.
[2] 杨利娟, 黄君梅, 王飞. 何首乌、骨碎补、淫羊藿的植物雌激素作用研究[J]. 中药与临床, 2012, 3(30): 37-39.
[3] 李育, 江励华, 赵凤鸣, 等. 山茱萸炮制增效活性部位

对老年小鼠卵巢衰老的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17(10): 108-109.
[4] 郑高利, 张信岳, 郑经伟, 等. 葛根素和葛根总异黄酮的雌激素样活性[J]. 中药材, 2002, 25(8): 566-568.
[5] 陈云龙, 卢小凤, 廖锦彬, 等. HPLC 测定双黄祛毒片中 7 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 119-122.
[6] 孙玉雯, 张莹, 刘起华, 等. UPLC 法同时测定益髓生血颗粒中 9 种成分的含量[J]. 中药材, 2013, 36(7): 1171-1173.
[7] 程小丽, 魏胜利, 刘春生, 等. RP-HPLC-DAD 同时测定大黄中 9 种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 99-102.
[8] 傅予, 刘庆焕, 王文彤. HPLC 法测定养血生发胶囊中 5 种活性成分[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 188-190.
[9] 曾俊芬, 宋金春, 鲁建武, 等. HPLC 同时测定通脉口服液 5 种有效成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(6): 461-463.
[10] 陈晓鹏, 鄂秀辉, 夏忠庭, 等. HPLC 法同时测定养血清脑颗粒中 7 个主要成分[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1921-1924.
[11] 郭琪, 程利娟, 雷虹, 等. HPLC 法同时测定麻仁润肠丸中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1677-1681.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月, 是由中国科协主管, 中国药学会主办, 中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊, 在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”, 以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路, 内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元, 208 页, 全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R, 国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅, 邮发代号 2-45。本刊地址: 北京东直门内南小街 16 号; 邮政编码 100700; 电子信箱 cjcmm2006@188.com; 联系方式详见中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn