

# 双波长 HPLC 同时测定金刚藤软胶囊中 5 个活性成分的含量

卫阳飞<sup>1</sup>, 戚欢阳<sup>2</sup>, 宋海<sup>1</sup>, 岳国仁<sup>1\*</sup>

(1. 河西学院 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000;  
2. 中国科学院 兰州化学物理研究所, 兰州 730000)

**[摘要]** **目的:**建立双波长 HPLC 同时测定金刚藤软胶囊中绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素和山柰酚含量的方法。**方法:**采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 检测波长 306 nm(绿原酸、白藜芦醇)和 365 nm(芦丁、槲皮素、山柰酚)。**结果:**绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚分别在 0.058 5 ~ 2.34 μg(*r* = 0.999 8), 0.025 3 ~ 1.01 μg(*r* = 0.999 9), 0.042 2 ~ 0.844 μg(*r* = 0.999 6), 0.018 1 ~ 0.722 μg(*r* = 0.999 9), 0.0165 ~ 0.660 μg(*r* = 0.999 9) 呈现良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.0%, 100.6%, 96.0%, 102.7%, 98.5%, RSD 分别为 1.2%, 2.2%, 1.8%, 2.9%, 1.3%。**结论:**该方法操作简便、重复性好, 可作为金刚藤软胶囊中 5 个活性成分的含量测定方法。

**[关键词]** 金刚藤软胶囊; 绿原酸; 白藜芦醇; 芦丁; 槲皮素; 山柰酚; 高效液相色谱法; 双波长检测

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0036-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015120036

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1026.015.html>

**[网络出版时间]** 2015-04-28 10:26

**Simultaneous Determination of Five Effective Constituents in Jinggangteng Soft Capsule by Dual-wavelength HPLC** WEI Yang-fei<sup>1</sup>, QI Huan-yang<sup>2</sup>, SONG Hai<sup>1</sup>, YUE Guo-ren<sup>1\*</sup> (1. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Hexi University, Zhangye 734000, China; 2. Lanzhou Insitute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a dual-wavelength HPLC method for simultaneous determination of five constituents (chlorogenic acid, resveratrol, rutin, quercetin, kaempferol) in Jinggangteng soft capsule. **Method:** The Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with a column temperature of 25 °C was used; the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid at gradient elution program and with a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelengths were set at 306 nm (chlorogenic acid and resveratrol) and 365 nm (rutin, quercetin and kaempferol). **Result:** The linear response ranges of chlorogenic acid, resveratrol, rutin, quercetin, and kaempferol were 0.058 5-2.34 μg (*r* = 0.999 8), 0.025 3-1.01 μg (*r* = 0.999 9), 0.042 2-0.844 μg (*r* = 0.999 6), 0.018 1-0.722 μg (*r* = 0.999 9), and 0.016 5-0.660 μg (*r* = 0.999 9), respectively. The average recoveries were 98.0%, 100.6%, 96.0%, 102.7%, and 98.5% with RSDs of 1.2%, 2.2%, 1.8%, 2.9%, and 1.3%, respectively. **Conclusion:** The developed method was convenient and reliable, which could be applied to determination of five effective constituents in Jinggangteng soft capsule.

**[Key words]** Jinggangteng soft capsule; chlorogenic acid; resveratrol; rutin; quercetin; kaempferol; HPLC; dual-wavelength

金刚藤软胶囊以独一味药材组成, 具有清热解 毒、消肿散结的功效, 临床主要用于附件炎和附件炎

**[收稿日期]** 20140825(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(21462016); 河西学院青年教师科研基金项目(QN2014-15)

**[第一作者]** 卫阳飞, 硕士, 助教, 从事天然药物分析研究, Tel:0936-6630750, E-mail: wyfhxy@163.com

**[通讯作者]** \* 岳国仁, 博士, 教授, 从事药物合成及分析研究, Tel:18293600234, E-mail: xinziwuzhijin@163.com

性包块的治疗<sup>[1]</sup>。金刚藤软胶囊中主要药效成分为鞣酸、皂苷、多酚及黄酮类成分<sup>[2-5]</sup>，金刚藤软胶囊的质量控制是以《国家药品标准——新药转正标准》中记载的薯蓣皂苷元作为考察指标，但此成分最大吸收波长在 203 nm，存在 HPLC 测定时干扰组分较多，前处理方法繁琐等缺点<sup>[6-8]</sup>。现有的质量标准研究文献均不完善<sup>[9-11]</sup>，为了更好地控制金刚藤软胶囊的质量，本试验选用该胶囊中鞣酸、多酚及绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚这 5 个活性成分作为考察指标，采用高效液相色谱方法进行了定量测定，为金刚藤软胶囊的质量控制提供了更为可靠的依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1260 系列高效液相色谱仪(包括四元泵,二极管阵列检测器,智能化柱温箱,OpenLAB 工作站,美国安捷伦公司),KQ250B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),AUW120D 型电子分析天平(日本岛津公司),RE-2000A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

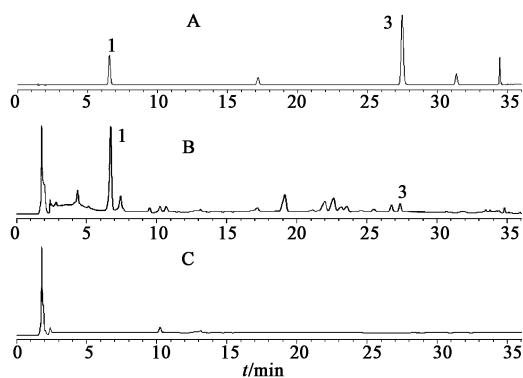
**1.2 试药** 绿原酸(批号 110753-200413),芦丁(批号 100080-200207),槲皮素(批号 111538-200403),山柰酚(批号 110861-200808)对照品均购自中国食品药品检定研究院,含量测定用;白藜芦醇对照品(批号 36794),购自阿拉丁试剂有限公司,纯度 $\geq 99.0\%$ ;金刚藤软胶囊(四川科伦药业股份有限公司,批号 C130302063, C130707063, C130901063;北京长城制药厂,批号 14020201);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 10% ~ 20% A; 20 ~ 30 min, 20% ~ 30% A; 30 ~ 40 min, 30% ~ 90% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,检测波长 306 nm(绿原酸、白藜芦醇)和 365 nm(芦丁、槲皮素、山柰酚),进样量 10 μL。在上述色谱条件下 5 个成分与相邻色谱峰得到很好的分离,分离度均 > 1.5,理论塔板数以绿原酸计算 > 9 000。见图 1, 2。

### 2.2 溶液的制备

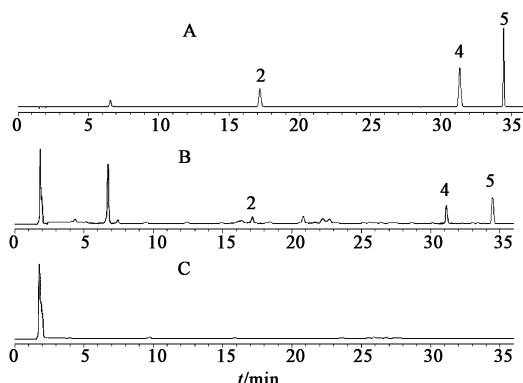
**2.2.1 对照品储备液** 分别精密称取绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚对照品适量至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解制成含绿原酸 1.17 g·L<sup>-1</sup>,白藜芦醇 1.01 g·L<sup>-1</sup>,芦丁 0.844 g·L<sup>-1</sup>,槲皮素 0.722 g·



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 绿原酸; 3. 白藜芦醇

图 1 金刚藤软胶囊 306 nm HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Jingangteng soft capsule at 306 nm



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 2. 芦丁; 4. 槲皮素; 5. 山柰酚

图 2 金刚藤软胶囊 365 nm HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Jingangteng soft capsule at 365 nm

L<sup>-1</sup>,山柰酚 0.165 g·L<sup>-1</sup>的对照品储备液。

**2.2.2 混合对照品溶液** 精密量取绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚对照品储备液适量,加甲醇溶解制成含绿原酸 0.234 g·L<sup>-1</sup>,白藜芦醇 0.101 g·L<sup>-1</sup>,芦丁 0.084 4 g·L<sup>-1</sup>,槲皮素 0.072 2 g·L<sup>-1</sup>,山柰酚 0.066 0 g·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取 8 粒金刚藤软胶囊(批号 C130707063)内容物,混匀后称取约 2.5 g,精密称定,置 250 mL 锥形瓶中,加甲醇 150 mL,超声处理 1 h(250 W),抽滤并减压浓缩,定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,取上清液 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

**2.2.4 阴性对照溶液的制备** 本处方中只有菝葜一味药材,故只需考察软胶囊中辅料对含量测定的影响,按照金刚藤软胶囊的制备方法<sup>[12]</sup>,制成阴性样品,再按 2.2.3 项下方法制成阴性样品溶液。

**2.3 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL,用甲醇定容至 6 个 10

mL 量瓶中,制备系列对照品溶液,分别精密吸取 10  $\mu$ L,按 2.1 项下色谱条件测定绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚峰面积,以质量浓度( $X$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标,进行线性回归,结果见表 1。

表 1 5 个活性成分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linearity range of five effective components

成分	回归方程	$r$	线性范围/ $\mu$ g
绿原酸	$Y = 1.71 \times 10^4 X + 20.83$	0.999 8	0.058 5 ~ 2.34
白藜芦醇	$Y = 7.35 \times 10^4 X + 21.89$	0.999 9	0.025 3 ~ 1.01
芦丁	$Y = 1.54 \times 10^4 X + 16.17$	0.999 6	0.042 2 ~ 0.844
槲皮素	$Y = 3.80 \times 10^4 X + 6.05$	0.999 9	0.018 1 ~ 0.722
山柰酚	$Y = 3.89 \times 10^4 X - 0.45$	0.999 9	0.016 5 ~ 0.660

**2.4 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 10  $\mu$ L,按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次测定,结果绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 0.7%, 1.2%, 1.1%, 0.8%,表明仪器精密度良好。

**2.5 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 10  $\mu$ L,按 2.1 项下色谱条件分别于 0,4,8,12,24,48 h 测定,结果绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 1.0%, 1.4%, 1.2%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

**2.6 重复性试验** 取同一批号样品(批号 C130707063)6 份,每份约 2.5 g,精密称定,按照 2.2.3 项下方法平行制备供试品溶液,分别精密吸取 10  $\mu$ L,按 2.1 项下色谱条件测定,计算,结果绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚的含量分别为 0.862 9, 0.141 1, 0.224 7, 0.139 2, 0.119 3  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; RSD 分别为 0.2%, 0.9%, 1.6%, 1.8%, 1.0%,表明重复性良好。

**2.7 加样回收率试验** 精密称取已知含量的同一批(批号 C130707063)样品共 6 份,每份约 2.5 g,分别精密加入质量浓度为 1.17, 1.01, 0.844, 0.722, 0.165  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的绿原酸、白藜芦醇、芦丁、槲皮素、山柰酚对照品 1.75, 0.25, 0.75, 0.50, 2.50 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10  $\mu$ L,按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 2。

**2.8 样品含量测定** 取不同厂家、批次的金刚藤软胶囊内容物各 3 份,每份约 2.5 g,精密称定,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱

表 2 金刚藤软胶囊中 5 个活性成分的加样回收率

Table 2 Recoveries of five effective components in Jingangteng soft capsule

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%			
绿原酸	2.151	2.048	4.170	98.6	98.0	1.2			
	2.139	2.048	4.109	96.2					
	2.120	2.048	4.117	97.5					
	2.181	2.048	4.184	97.8					
	2.176	2.048	4.187	98.2					
	2.183	2.048	4.223	99.6					
	白藜芦醇	0.357 0	0.252 5	0.616 8			102.9	100.6	2.2
		0.337 0	0.252 5	0.583 0			97.4		
		0.355 8	0.252 5	0.604 0			98.3		
		0.359 5	0.252 5	0.616 3			101.7		
0.353 3		0.252 5	0.607 3	100.6					
0.354 5		0.252 5	0.613 0	102.4					
芦丁		0.556 5	0.633 0	1.185	99.3	96.0	1.8		
		0.560 8	0.633 0	1.160	94.7				
		0.559 5	0.633 0	1.164	95.5				
		0.556 3	0.633 0	1.157	94.9				
	0.565 8	0.633 0	1.176	96.4					
	0.571 3	0.633 0	1.173	95.1					
	槲皮素	0.349 3	0.361 0	0.720 0	102.7			102.7	2.9
		0.342 0	0.361 0	0.695 3	97.9				
		0.352 5	0.361 0	0.717 0	101.0				
		0.346 3	0.361 0	0.729 3	106.1				
0.345 8		0.361 0	0.725 3	105.1					
0.352 5		0.361 0	0.726 3	103.5					
山柰酚		0.299 5	0.412 5	0.701 3	97.4	98.5	1.3		
		0.287 0	0.412 5	0.695 5	99.0				
		0.298 3	0.412 5	0.698 8	97.1				
		0.300 0	0.412 5	0.711 8	99.8				
	0.302 0	0.412 5	0.713 8	99.8					
0.303 3	0.412 5	0.705 8	97.6						

条件分别进样 10  $\mu$ L 测定,外标法计算样品中 5 个成分的含量,测定结果见表 3。

### 3 讨论

**3.1 供试品溶液制备条件的选择** 考察了回流提取和超声提取;考察了甲醇、乙醇提取溶剂;提取 2.5 g 金刚藤内容物,分别用量 100,150,200 mL 提取溶剂;超声提取时间分别为 0.5,1,1.5,2 h。结果

表3 不同厂家、批次金刚藤软胶囊中5个活性成分的含量(n=3)

**Table 3 Determination results of five effective components in Jinggangteng soft capsule from different manufacturers and batches (n=3)**

mg·g<sup>-1</sup>

厂家	批次	绿原酸	白藜芦醇	芦丁	槲皮素	山柰酚
四川科伦药业股份有限公司	C130302063	0.843 5	0.143 9	0.212 7	0.144 7	0.111 9
	C130707063	0.862 9	0.141 1	0.224 7	0.139 2	0.119 3
	C130901063	0.876 5	0.146 9	0.229 5	0.143 4	0.127 7
北京长城制药厂	14020201	0.769 1	0.150 2	0.221 7	0.165 5	0.137 0

表明2.5 g 金刚藤内容物用150 mL 甲醇超声提取1 h 时提取效果最佳。

**3.2 色谱条件的选择** 选用不同的色谱柱,与Phenomenex-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)相比,Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)在该试验中分离效果较好;对不同的流动相甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液和乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液进行了考察,其中乙腈-0.1%磷酸水溶液洗脱体系可达到分离度要求;考察了不同的洗脱程序;在190~400 nm 波长进行紫外扫描。365 nm 适用于芦丁、槲皮素、山柰酚的测定,白藜芦醇最大吸收波长为306 nm,在365 nm 处吸收极弱,而绿原酸在306 nm 处吸收强于365 nm,故选择365 nm 和适宜绿原酸、白藜芦醇测定的306 nm 作为该次试验的两个检测波长。

[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,2010:290.

[2] 尹玲. 金刚藤抗炎活性部位群的提取纯化工艺及其质量分析研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2010:1-60.

[3] 陈树和. 菝葜抗炎有效部位群提取物的多指标成分同谱含量分析及其血清药化学研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2012:1-35.

[4] 杨斌,丘岳,王柳萍,等. 广西山银花绿原酸体外抗炎作用及分子机制研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(4):542-545.

[5] 张生潭,王兆玉,兰新宇,等. 响应面法优化麻疯树叶总黄酮提取工艺及其抗菌活性研究[J]. 中药材,2013,36(2):308-311.

[6] 国家药典委员会. 国家药品标准——新药转正标准. 第80册[S]. 北京:人民卫生出版社,2009:156-159.

[7] 王志宏,李雪婷,王沛,等. HPLC 法测定痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):71-73.

[8] 周浓,郭吉芬,杨丽云,等. HPLC 测定不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):54-56.

[9] 颜彦,李文霞,叶晓川. RP-HPLC 同时测定菝葜药材中总槲皮素和山柰酚含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(2):288-290.

[10] 范银洲,向海艳,罗艳琴,等. RP-HPLC 同时测定金刚藤4个黄酮类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(10):62-65.

[11] 张文婷,黄琴伟,邓金明,等. 反相高效液相色谱法测定金刚藤软胶囊中白藜芦醇的含量[J]. 医药导报,2010,29(1):88-89.

[12] 任秀云. 金刚藤有效成分提取物软胶囊及其制备方法:中国,200410022530.2[P]. 2005-11-16.

[责任编辑 顾雪竹]