

HPLC 梯度洗脱法同时测定阿胶益寿晶中的二苯乙烯苷、 大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、 毛蕊异黄酮和芒柄花素

李云静¹, 何忠梅^{2*}

(1. 吉林工程职业学院 生物工程学院, 吉林 四平 136001; 2. 吉林农业大学, 长春 130117)

[摘要] 目的:建立梯度洗脱法同时测定阿胶益寿晶中二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素含量的高效液相色谱法。方法:采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 A 乙腈-甲醇(9:1),流动相 B 0.1% 磷酸溶液梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL;二苯乙烯苷和大黄素甲醚检测波长为 280 nm,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素检测波长为 254 nm。结果:二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素分别在 5.23~104.60 mg·L⁻¹(*r*=0.999 5),5.05~101.00 mg·L⁻¹(*r*=0.999 1),5.92~118.40 mg·L⁻¹(*r*=0.999 3),4.74~94.80 mg·L⁻¹(*r*=0.999 8),4.85~97.00 mg·L⁻¹(*r*=0.999 7),6.91~138.20 mg·L⁻¹(*r*=0.999 7)线性关系良好;平均加样回收率(*n*=6)和 RSD 分别为 98.52%(1.6%),97.95%(1.4%),99.47%(1.6%),96.99%(1.0%),99.24%(1.1%),98.13%(1.4%)。结论:建立的 HPLC 梯度洗脱法同时测定阿胶益寿晶中二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素含量。方法准确、灵敏度高、重复性好,为评价阿胶益寿晶质量控制提供可靠方法。

[关键词] 阿胶益寿晶;二苯乙烯苷;大黄素甲醚;毛蕊异黄酮苷;芒柄花苷;毛蕊异黄酮;芒柄花素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0068-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230068

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1402.066.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 14:02

Simultaneous Determination of Stibene Glucoside, Physcione, Calycosin-7-O-β-D-glucoside, Ononin, Calycosin and Fermlononetin in Ejiao Yishou Jing by HPLC Gradient Elution Method

LI Yun-jing¹, HE Zhong-mei^{2*}

(1. College of Biological Engineering, Jilin Engineering Vocational College, Siping 136001, China;

2. Jilin Agricultural University, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC gradient elution method for simultaneous determination of stibene glucoside, physcione, calycosin-7-O-β-D-glucoside, ononin, calycosin and fermlononetin in Ejiao Yishou Jing. **Method:** An Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with acetonitrile-methanol (9:1) (A) and 0.1% phosphate acid solution (B) as the mobile phases for gradient elution. The column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, with an injection volume of 20 μL. Stibene glucoside and physcione were detected at 280 nm; calycosin-7-O-β-D-glucoside, ononin, calycosin and fermlononetin were detected at 254

[收稿日期] 20151202(003)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20140311029YY)

[第一作者] 李云静, 硕士, 副教授, 从事生物制药、发酵技术、药用酶生产的研究与教学工作, Tel:15590269959

[通讯作者] * 何忠梅, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药有效成分作用机制及产品开发生研究, E-mail:hezongmei1978@163.com

nm. **Result:** Stibene glucoside, physcione, calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside, ononin, calycosin and fermlononetin showed good linearity within the concentration range of 5.23-104.60 mg·L⁻¹ ($r = 0.9995$), 5.05-101.00 mg·L⁻¹ ($r = 0.9991$), 5.92-118.40 mg·L⁻¹ ($r = 0.9993$), 4.74-94.80 mg·L⁻¹ ($r = 0.9998$), 4.85-97.00 mg·L⁻¹ ($r = 0.9997$), and 6.91-138.20 mg·L⁻¹ ($r = 0.9997$) respectively. Their average recovery rate ($n = 6$) and RSD were 98.52% (1.6%), 97.95% (1.4%), 99.47% (1.6%), 96.99% (1.0%), 99.24% (1.1%), and 98.13% (1.4%) respectively. **Conclusion:** This HPLC gradient elution method could be used to simultaneously determine the contents of stibene glucoside, physcione, calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside, ononin, calycosin and fermlononetin in Ejiao Yishou Jing. This method is accurate, highly sensitive and repeatable, providing a reliable method for the quality control of Ejiao Yishou Jing.

[**Key words**] HPLC; gradient elution method; Ejiao Yishou Jing; stibene glucoside; physcione; calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside; ononin; calycosin; fermlononetin

阿胶益寿晶收载于卫生部药品标准《中药成方制剂》第三册^[1],其处方由制何首乌、黄芪(蜜炙)、人参、熟地黄、阿胶、陈皮、木香、甘草 8 味药材组成。其功效是补气养血,用于气血双亏、面黄肌瘦、未老先衰、健忘失眠、四肢无力、腰膝酸软、妇女产后诸虚。该制剂的质量标准仅对阿胶益寿晶的性状及冲剂通则项^[2]作了规定,标准比较简单,不能全面控制药品质量。黄芪(蜜炙)在方中用量最大,制何首乌用量次之,黄芪具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌的功效,可用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛、便血崩漏、表虚自汗、气虚水肿、内热消渴、血虚萎黄、半身不遂、痹痛麻木、痈疽难溃、久溃不敛等的治疗;制何首乌具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨、化浊降脂的功效,可用于血虚萎黄、眩晕耳鸣、须发早白、腰膝酸软、肢体麻木、崩漏带下等的治疗。毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素为黄芪所含的主要成分,二苯乙烯苷、大黄素甲醚为制何首乌所含的主要成分,本研究采用高效液相色谱梯度洗脱法联合波长切换处理,同时对制剂中制何首乌药材所含二苯乙烯苷、大黄素甲醚和黄芪(蜜炙)药材中所含毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素进行测定,从而实现对 6 个成分的同时测定,为控制阿胶益寿晶质量水平和药品标准的继续提高提供了理论和数据支持。

1 材料

Ultimate3000 型高效液相色谱仪,2787 可变波长检测器(美国 Waters);BT125D 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);KQ-100DB 型超声波清洗器(江苏省昆山超声仪器有限公司)。

乙腈,甲醇为色谱纯,水为注射用水,磷酸为分

析纯;对照品二苯乙烯苷(批号 82373-94-2,纯度 98.0%),芒柄花素(批号 485-72-3,纯度 98.0%)购于上海同田生物技术股份有限公司;大黄素甲醚(批号 110758-201415,纯度 99.1%,本品有引湿性),毛蕊异黄酮苷(批号 111920-201505,使用前不用干燥,纯度 97.1%)购于中国食品药品检定研究院;芒柄花苷(批号 486-62-4,纯度 98.0%)购于四川省维克奇生物科技有限公司;毛蕊异黄酮(批号 20575-57-9,纯度 98.0%)购于南京森贝伽生物科技有限公司;阿胶益寿晶 3 批样品[批号分别为 201409082,201501022,201501012,规格 10 g/袋(相当于原药材 3.5 g)]购于河南辅仁堂制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),乙腈-甲醇(9:1)为流动相 A,0.1% 磷酸溶液为流动相 B,梯度洗脱(0~17 min,35.0% A;17~28 min,35.0%~42.0% A;28~54 min,42.0%~60.0% A;54~65 min,60.0%~35.0% A)^[3-6];检测波长(0~28 min,280 nm^[7-8],28~65 min,254 nm^[9]),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。理论板数均不低于 3 000,此系统条件下各组分分离效果良好。

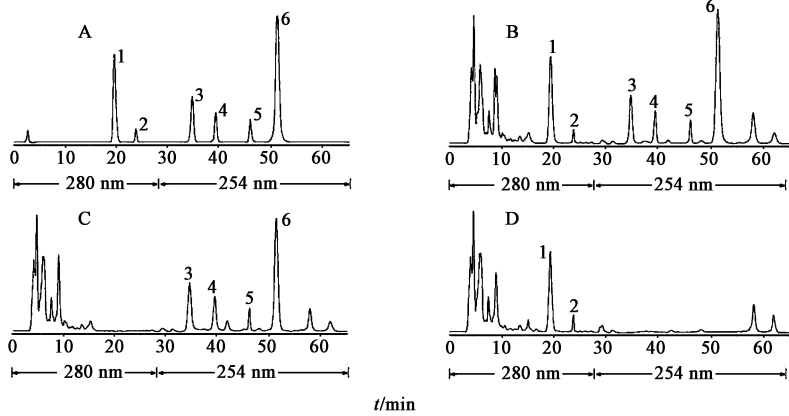
2.2 供试品溶液的制备 取阿胶益寿晶适量,研成细粉,取约 8.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇溶液 50 mL,密塞,称定质量,记录数据后,超声处理 30 min,取出放冷,称定质量,用 80% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀后,过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取对照品二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素各适量,分别用 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,制成含二苯乙烯苷、大黄素甲

醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素分别为 1.046, 1.010, 1.184, 0.948, 0.970, 1.382 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。然后分别精密量取上述 6 个对照品储备液 5.0, 1.0, 2.5, 2.5, 2.0, 5.0 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液稀释至刻度, 制成含二苯乙烯苷 52.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 大黄素甲醚 10.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 毛蕊异黄酮苷 29.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 芒柄花苷 23.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 毛蕊异黄酮 19.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和芒柄花素 69.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 即得混合对照品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

按照卫生部药品标准



A. 对照品; B. 供试品; C. 缺制何首乌阴性; D. 缺黄芪阴性; 1. 二苯乙烯苷; 2. 大黄素甲醚; 3. 毛蕊异黄酮苷; 4. 芒柄花苷; 5. 毛蕊异黄酮; 6. 芒柄花素

图 1 阿胶益寿晶 HPLC

Fig. 1 HPLC of Ejiao Yishou Jing

2.6 线性关系考察

精密吸取 2.3 项下制备的对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mL, 分别置 20 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释成系列浓度的对照品溶液。以峰面积为纵坐标, 各对照品质量浓度为横坐标, 建立线性方程, 结果见表 1。

表 1 线性关系考察

Table 1 Results of linear relationship test

成分	回归方程	线性范围 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>r</i>
二苯乙烯苷	$Y = 1.1349 \times 10^6 X - 431.8$	5.23 ~ 104.60	0.999 5
大黄素甲醚	$Y = 4.2943 \times 10^5 X - 109.1$	5.05 ~ 101.00	0.999 1
毛蕊异黄酮苷	$Y = 8.3497 \times 10^5 X + 258.9$	5.92 ~ 118.40	0.999 3
芒柄花苷	$Y = 8.0061 \times 10^5 X - 185.6$	4.74 ~ 94.80	0.999 8
毛蕊异黄酮	$Y = 6.1972 \times 10^5 X - 237.4$	4.85 ~ 97.00	0.999 7
芒柄花素	$Y = 1.6618 \times 10^6 X + 337.7$	6.91 ~ 138.20	0.999 7

2.7 重复性试验

精密称取同一批阿胶益寿晶样品 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 测定二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素峰面

《中药成方制剂》第三册 (WS3-B-0560-91) 中记载的阿胶益寿晶质量标准中规定的药味比例, 以相同工艺分别制备缺制何首乌样品和缺黄芪 (蜜炙) 样品。按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别制成缺何首乌阴性样品溶液和缺黄芪 (蜜炙) 阴性样品溶液。

2.5 专属性试验

分别取混合对照品溶液、阿胶益寿晶供试品溶液以及上述制备的 2 种阴性样品溶液各 20 μL 测定, 记录色谱图, 结果显示阴性样品无干扰, 见图 1。

积, 计算各组分质量分数分别为 0.319, 0.061, 0.194, 0.138, 0.115, 0.431 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 所测各组分含量的 RSD 分别为 1.0%, 1.1%, 1.0%, 1.0%, 0.9%, 0.9%。

2.8 精密度试验

精密吸取 2.3 项下混合对照品溶液 20 μL , 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样共 6 次, 记录色谱图, 计算峰面积的 RSD, 二苯乙烯苷 1.0%, 大黄素甲醚为 1.0%, 毛蕊异黄酮苷为 1.1%, 芒柄花苷为 0.9%, 毛蕊异黄酮为 1.0%, 芒柄花素为 0.8%。结果表明精密度良好。

2.9 稳定性试验

取 2.7 项下的其中 1 个供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 进样 20 μL , 记录色谱图, 计算二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素峰面积的 RSD, 分别为 1.0%, 1.1%, 1.1%, 1.0%, 1.0%, 1.0%, 结果显示 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的阿胶益寿晶 6 份, 研成细粉, 取约 4.0 g, 精密称定, 置于 50 mL

量瓶中,精密加入混合对照品溶液 25 mL,80% 甲醇溶液 25 mL,按 2.2 项下方法操作,制得加样供试品

溶液。记录色谱图,计算各组分的平均加样回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 阿胶益寿晶中 6 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery test of Ejiao Yishou Jing

成分	称取量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
二苯乙炔苷	4.001 7	1.276 5	1.307 5	2.590 2	100.47	98.52	1.6
	4.000 2	1.276 1	1.307 5	2.563 3	98.45		
	3.987 5	1.272 0	1.307 5	2.541 1	97.06		
	4.002 9	1.276 9	1.307 5	2.549 7	97.35		
	4.000 8	1.276 3	1.307 5	2.588 2	100.34		
	4.001 1	1.276 4	1.307 5	2.550 4	97.44		
大黄素甲醚	4.001 7	0.244 1	0.252 5	0.495 7	99.64	97.95	1.4
	4.000 2	0.244 0	0.252 5	0.486 6	96.08		
	3.987 5	0.243 2	0.252 5	0.490 8	98.06		
	4.002 9	0.244 2	0.252 5	0.493 5	98.73		
	4.000 8	0.244 0	0.252 5	0.488 0	96.63		
	4.001 1	0.244 1	0.252 5	0.492 9	98.53		
毛蕊异黄酮苷	4.001 7	0.776 3	0.740 0	1.500 6	97.88	99.47	1.6
	4.000 2	0.776 0	0.740 0	1.522 8	100.92		
	3.987 5	0.773 6	0.740 0	1.520 1	100.88		
	4.002 9	0.776 6	0.740 0	1.496 7	97.31		
	4.000 8	0.776 2	0.740 0	1.513 0	99.57		
	4.001 1	0.776 2	0.740 0	1.518 2	100.27		
芒柄花苷	4.001 7	0.552 2	0.592 5	1.130 8	97.65	96.99	1.0
	4.000 2	0.552 0	0.592 5	1.124 2	96.57		
	3.987 5	0.550 3	0.592 5	1.122 9	96.64		
	4.002 9	0.552 4	0.592 5	1.121 8	96.10		
	4.000 8	0.552 1	0.592 5	1.136 1	98.57		
	4.001 1	0.552 2	0.592 5	1.123 5	96.42		
毛蕊异黄酮	4.001 7	0.460 2	0.485 0	0.941 3	99.20	99.24	1.1
	4.000 2	0.460 0	0.485 0	0.949 7	100.97		
	3.987 5	0.458 6	0.485 0	0.936 8	98.60		
	4.002 9	0.460 3	0.485 0	0.935 1	97.90		
	4.000 8	0.460 1	0.485 0	0.938 4	98.62		
	4.001 1	0.460 1	0.485 0	0.945 9	100.16		
芒柄花素	4.001 7	1.724 7	1.727 5	3.410 8	97.60	98.13	1.4
	4.000 2	1.724 1	1.727 5	3.459 6	100.46		
	3.987 5	1.718 6	1.727 5	3.407 0	97.74		
	4.002 9	1.725 2	1.727 5	3.417 5	97.96		
	4.000 8	1.724 3	1.727 5	3.428 1	98.63		
	4.001 1	1.724 5	1.727 5	3.389 9	96.41		

2.11 样品测定 取不同批号阿胶益寿晶样品 3 批,照 2.2 项下方法制备供试品溶液,依法进样测定计算样品中二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素含量。结果见表 3。

表 3 阿胶益寿晶样品中 6 种成分的质量分数

Table 3 Determination results of Ejiao Yishou Jing content

批号	mg·g ⁻¹					
	二苯乙烯苷	大黄素甲醚	毛蕊异黄酮苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素
201409082	0.319	0.061	0.194	0.138	0.115	0.431
201501022	0.316	0.055	0.191	0.135	0.118	0.426
201501012	0.322	0.068	0.202	0.142	0.119	0.439

3 讨论

分别取二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品溶液,进行紫外光谱扫描,结果二苯乙烯苷和大黄素甲醚在 254,280 nm 波长处均有较好吸收,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素在 254 nm 波长处有较好吸收。笔者在试验中曾采用 254 nm 波长下对文中 6 个组分进行检测,但此时二苯乙烯苷、大黄素甲醚与其他杂质成分分离效果极差,可能是制何首乌中所含其他蒽醌类对其干扰,考虑到各峰峰面积的均衡性及分离效果,参考文献[7]采用 280 nm 作为二苯乙烯苷和大黄素甲醚的检测波长,采用 254 nm 作为毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素的检测波长,结果显示所测 6 个成分均达到较好的分离效果。故选用 280,254 nm 波长切换对阿胶益寿晶中二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素进行同时测定。

选择了乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-甲醇(9:1)与 0.1% 磷酸溶液 4 种流动相不同比例梯度洗脱进行比对,结果显示,乙腈-甲醇(9:1)与 0.1% 磷酸溶液为流动相分离效果好,峰形好。

分别对提取溶剂(甲醇、80% 甲醇溶液、50% 甲醇溶液),提取时间(20,30,35 min),进行考察比较,结果显示 80% 甲醇溶液超声处理 30 min 效果最佳。

试验以阿胶益寿晶中二苯乙烯苷、大黄素甲醚、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量为指标,通过高效液相色谱法建立了同时测定以上 6 种成分的含量测定方法,经系统适应性试验和方法学考察,样品中各组分能较好分离,方法简便、准确、重复性好,可用于阿胶益寿晶相应指标的质量控制。

根据本文测定的各组分含量的平均值,结合实际生产情况,取所测平均值的 80% 作为本品各组分的暂定含量,即暂定本品每克含制何首乌以二苯乙烯苷计不得低于 0.25 mg,以大黄素甲醚计不得低于 0.050 mg;含黄芪(蜜炙)以毛蕊异黄酮苷计不得低于 0.15 mg,以芒柄花苷计不得低于 0.11 mg,以毛蕊异黄酮计不得低于 0.090 mg,以芒柄花素计不得低于 0.34 mg。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂第三册(W53-B-0560-91)[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,1991:1.
- [2] 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,2015:附录 6.
- [3] 蔡丽芬,钟国跃,瞿显友,等. HPLC 测定不同生长年限及采收期何首乌中二苯乙烯苷和蒽醌类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(10):1221-1224.
- [4] 纪松岗,李翔,朱臻宇,等. 高效液相色谱法测定黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的含量[J]. 第二军医大学学报,2006,27(1):81-84.
- [5] 王晓辉,刘涛,李清,等. 高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分[J]. 色谱,2006,24(5):486-488.
- [6] 李帅峰,郑传柱,张丽,等. 不同产地何首乌药材的质量分析[J]. 江苏中医药,2015,47(8):69-71.
- [7] 徐向红,平欲晖,谢一辉. 制何首乌中四个有效成分含量的高效液相色谱法测定[J]. 中国药理学杂志,2009,44(1):52-54.
- [8] 朱培芳,赵荣华,施扬宪. HPLC 法同时测定何首乌中二苯乙烯苷和 5 种蒽醌类化合物的方法[J]. 中华中医药杂志,2012,27(2):463-465.
- [9] 付娟,杨世海,黄林芳. 超高效液相色谱法同时测定黄芪中 6 种黄酮类成分的含量[J]. 中国药理学杂志,2013,48(11):916-919.

[责任编辑 顾雪竹]