

· 化学与分析 ·

鹿红颗粒中黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 的含量测定

赵国英¹, 袁秀荣¹, 李玲¹, 李同莉¹, 薛金贵², 周华^{2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的: 建立鹿红颗粒中黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 的含量测定方法。方法: 采用 HPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量, Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (34:66), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, ELSD 参数为蒸发区温度 90 °C, 雾化区温度 40 °C, 气流速度 1.50 mL·min⁻¹; 采用 HPLC-VWD 测定羟基红花黄色素 A 含量, 流动相甲醇-乙腈-0.2% 磷酸水 (35:2:63), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 403 nm。结果: 黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 的线性范围分别为 0.165 2 ~ 10.58, 0.021 ~ 1.34 μg, 平均回收率依次为 98.56% (RSD 1.99%), 101.84% (RSD 2.54%), 样品中质量分数分别为 0.333, 1.803 mg·g⁻¹。结论: 建立的含量测定方法简单易行、重复性良好, 适用于鹿红颗粒的质量评价。

[关键词] 鹿红颗粒; 黄芪甲苷; 羟基红花黄色素 A; 高效液相色谱; 方法学考察

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0040-04

[doi] 10.11653/syjf2014060040

Determination of Astragaloside IV and Hydroxysafflor Yellow A in Luhong Granules

ZHAO Guo-ying¹, YUAN Xiu-rong¹, LI Ling¹, LI Tong-li¹, XUE Jin-gui², ZHOU Hua^{2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish methods for determination of astragaloside IV and hydroxysafflor yellow A in Luhong granules. **Method:** The content of astragaloside IV was determined by HPLC-ELSD, chromatography was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 25 °C, mobile phase composition was acetonitrile-water (34:66), flow rate was at 1.0 mL·min⁻¹; An ELSD was used as detector with gas flow rate of 1.5 mL·min⁻¹, nebulization temperature at 40 °C and evaporative light temperature at 90 °C. HPLC-VWD was adopted to determine the content of hydroxysafflor yellow A with mobile phase of methanol-acetonitrile-0.2% phosphoric acid (35:2:63), column temperature at 30 °C, flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength at 403 nm. **Result:** Regression equation of astragaloside IV was $Y = 1.6925X + 5.8322$ ($R^2 = 0.9991$) with linear range of 0.165 2-10.58 μg and average recovery of 98.56% (RSD 1.99%); Regression equation of hydroxysafflor yellow A was $Y = 0.0325X + 0.4449$ ($R^2 = 1.000$) with linear range of 0.021-1.34 μg and average recovery of 101.84% (RSD 2.54%); The mass fraction of them in samples were 0.333, 1.803 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** These methods were simple and feasible with good reproducibility, which were suitable for quality control of Luhong granules.

[Key words] Luhong granules; astragaloside IV; hydroxysafflor yellow A; HPLC; methodological study

[收稿日期] 20131030(006)

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目(11DZ1971701)

[第一作者] 赵国英, 在读硕士, 从事中药新药研究, Tel:021-51322044, E-mail: zgy_flj@163.com

[通讯作者] * 周华, 教授, 从事慢性心力衰竭的中西医结合治疗研究, Tel:021-20256060, E-mail: zhouhuam@hotmail.com

鹿红颗粒为曙光医院周华教授的临床经验方,由黄芪、党参、红花、鹿角、桂枝、南葶苈子组成,具有调补阴阳、益气强心、活血通络的功效,主要用于治疗慢性心力衰竭,疗效确切^[1]。方中黄芪为君药,红花为臣药,研究表明二者具有强心、保护心肌损伤、缓解大鼠心功能下降等作用^[2-4],故将黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 列为鹿红颗粒质量控制的指标成分。本实验在参考 2010 年版《中国药典》^[5]基础上,建立和改进了鹿红颗粒中黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 的含量测定方法,为该颗粒的质量评价提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(Varian 380-LC 型蒸发光散射检测器,G1314A 型紫外检测器,美国安捷伦公司)。黄芪甲苷、羟基红花黄色素 A 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110781-200613,111637-201106),鹿红颗粒(自制,批号 20130925,20130926,20130927),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-10]

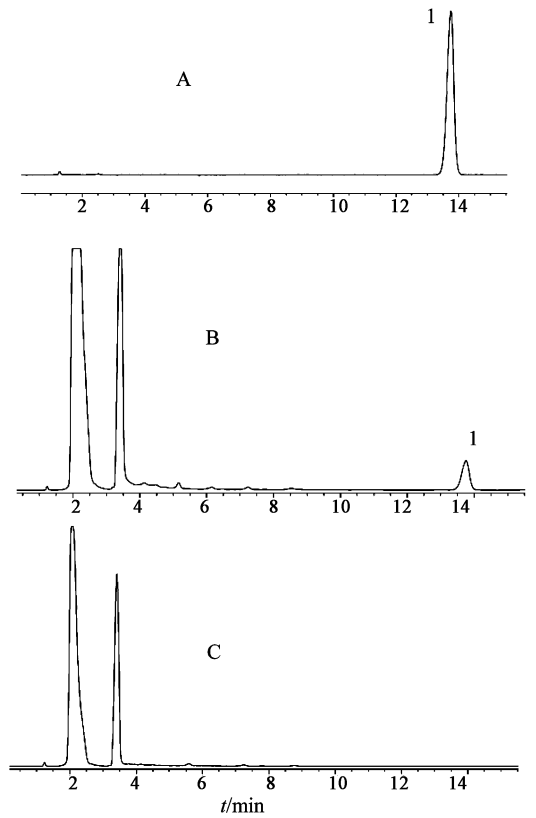
2.1.1 黄芪甲苷 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(34:66),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,蒸发光散射检测器条件为蒸发区温度 90 °C,雾化区温度 40 °C,气流速度 1.50 mL·min⁻¹。理论板数以黄芪甲苷峰计算应不低于 4 000,见图 1。

2.1.2 羟基红花黄色素 A Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-0.2% 磷酸水(35:2:63),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 403 nm,进样量 10 μL。理论板数以羟基红花黄色素 A 计算应不低于 3 000,见图 2。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 0.5 g·L⁻¹ 的对照品溶液。精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量,加 25% 甲醇制成 0.134 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

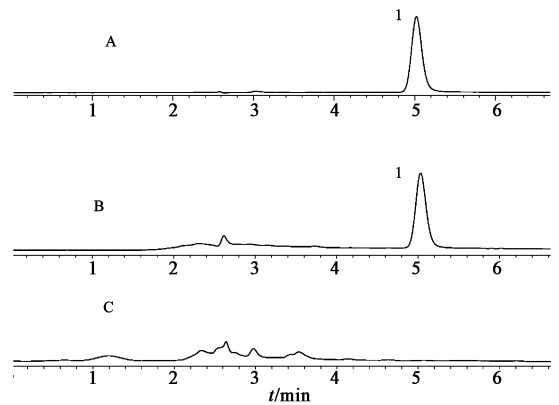
2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 黄芪甲苷 精密称取本品约 3 g 至具塞锥形瓶中,加甲醇 60 mL 超声处理(250 W, 33 kHz) 30 min,放冷,滤过,收集续滤液,用甲醇适当洗涤滤渣,与上述续滤液合并,蒸干,残渣加水 20 mL 微热使溶解,置于分液漏斗中,用水饱和正丁醇振摇提取 4 次,每次 40 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加



A. 对照品;B. 供试品;C. 空白对照;1. 黄芪甲苷

图 1 鹿红颗粒中黄芪甲苷 HPLC



A. 对照品;B. 供试品;C. 空白对照;1. 羟基红花黄色素 A

图 2 鹿红颗粒中羟基红花黄色素 A 的 HPLC

甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,经 0.22 μm 滤膜滤过,即得。按处方比例称取除黄芪之外的其余药味制备成缺黄芪的样品,按上述方法制成空白对照溶液。

2.3.2 羟基红花黄色素 A 精密称取样品约 2 g,精密加入 25% 甲醇 50 mL,称定质量,超声 40 min,放冷,称定质量,用 25% 甲醇补足减失的质量,摇匀,精密吸取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用 25% 甲醇稀释定容,过滤,取续滤液,即得。按处方组成称取除红花之外的其余药味制成缺红花的样品,按上述方

法制备空白对照溶液。

2.4 线性关系考察 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 $0.794\ 0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液,稀释成 $0.529\ 0, 0.264\ 5, 0.132\ 3, 0.066\ 13, 0.033\ 06, 0.016\ 53, 0.008\ 260\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,各吸取 $20\ \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪,按 **2.1.1** 项下方法测定,以黄芪甲苷质量浓度的自然对数为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.692\ 5X + 5.832\ 2$ ($R^2 = 0.999\ 1$),线性范围 $0.165\ 2 \sim 10.58\ \mu\text{g}$ 。

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品溶液适量,加 25% 甲醇配制质量浓度分别为 $0.067\ 00, 0.033\ 50, 0.016\ 75, 0.008\ 375, 0.004\ 180, 0.002\ 100\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列溶液,各精密吸取 $10\ \mu\text{L}$ 进样,按 **2.1.2** 项下色谱条件测定,以峰面积为横坐标,质量浓度为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.032\ 5X + 0.444\ 9$ ($R^2 = 1.000$),线性范围 $0.021 \sim 1.34\ \mu\text{g}$ 。

2.5 稳定性试验 取鹿红颗粒,按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置 $0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24\ \text{h}$,按 **2.1** 项下色谱条件测定,结果表明黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 分别为 $2.23\%, 0.51\%$,表明供试品溶液在 $24\ \text{h}$ 内较稳定。

2.6 精密度试验 分别精密吸取黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 对照品溶液各 $10\ \mu\text{L}$,按 **2.1** 项下色谱条件测定,连续重复进样 6 次,结果黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 分别为 $1.18\%, 0.50\%$,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批号样品 6 份,按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.1** 项下色谱条件测定,结果黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 分别为 $2.32\%, 1.97\%$,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批号样品 9 份,分别加入低、中、高质量浓度的对照品溶液,每个质量浓度平行 3 份,按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.1** 项下色谱条件测定,结果见表 1。

2.9 样品测定 称取 3 批样品,按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.1** 项下色谱条件测定,结果见表 2。

3 讨论

慢性心力衰竭按严重程度可分为 A, B, C, D 共 4 个阶段^[11],其中 B 阶段的中药治疗尚属市场空白期,临床应用和动物试验证明鹿红方不仅能改善症

状,提高生活质量,还可延缓心肌重构的发展,通过对鹿红方中指标性成分进行相关研究,可为产品质量控制提供依据。黄芪甲苷的含量测定方法较多,本文参照 2010 年版《中国药典》采用 HPLC 测定,相较于薄层扫描法、比色法和荧光法, HPLC 重复性较好^[12],但由于黄芪甲苷仅在 $200\ \text{nm}$ 左右处有末端吸收,故采用 ELSD 作为检测器。羟基红花黄色素 A 在 $403\ \text{nm}$ 处有较好吸收,故选择紫外检测器。

表 1 鹿红颗粒中有效成分含量测定的加样回收率试验

成分	No.	样品中		回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
		质量 /mg	加入量 /mg			
黄芪甲苷	1	0.656 8	0.534 0	1.173 0	96.67	98.56
	2	0.675 3	0.534 0	1.197 6	97.81	
	3	0.663 8	0.534 0	1.189 8	98.50	
	4	0.622 3	0.630 5	1.249 4	99.47	
	5	0.629 3	0.630 5	1.263 7	100.61	
	6	0.632 4	0.630 5	1.276 7	102.19	
	7	0.617 8	0.727 5	1.332 6	98.25	
	8	0.618 7	0.727 5	1.315 2	95.75	
	9	0.613 2	0.727 5	1.324 6	97.79	
羟基红花黄色素 A	1	0.430 7	0.335 0	0.769 5	101.14	101.84
	2	0.429 2	0.335 0	0.757 9	98.10	
	3	0.424 8	0.335 0	0.759 2	99.81	
	4	0.436 4	0.429 0	0.884 7	104.50	
	5	0.434 5	0.429 0	0.887 3	105.55	
	6	0.435 1	0.429 0	0.885 8	105.06	
	7	0.416 2	0.502 3	0.920 3	100.35	
	8	0.415 6	0.502 3	0.922 1	100.84	
	9	0.411 8	0.502 3	0.920 3	101.23	

表 2 鹿红颗粒中黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 的含量测定 ($n = 3$)

批号	黄芪甲苷	RSD	羟基红花黄色素 A	RSD
	$/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	/%	$/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	/%
20130925	0.32	1.8	1.82	1.2
	0.33		1.79	
	0.33		1.77	
20130926	0.34	2.0	1.83	1.0
	0.34		1.82	
	0.35		1.80	
20130927	0.33	2.1	1.78	1.1
	0.34		1.80	
	0.32		1.82	

多枝雾水葛化学成分(I)

刘旭阳¹, 谢郁峰², 张慧¹, 刘天竹¹, 文畅², 郭丽冰^{1*}

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 广东药学院药科学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 研究多枝雾水葛 *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn. var. *microphylla* (Wedd.) W. T. Wang. 的化学成分。方法: 采用多种柱色谱方法进行分离纯化, 通过波谱解析和理化性质进行化学结构鉴定。结果: 从多枝雾水葛的三氯甲烷和正丁醇部位分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为 β -谷甾醇(1), 二十二酸十三烷酯(2), 正三十四烷醇(3), 正三十四烷酸(4), 正二十八烷醇(5), 木栓酮(6), 表木栓醇(7), 豆甾醇(8), 22,23-二氢波甾醇(9), 胡萝卜苷(10), 胡萝卜苷棕榈酸酯(11), 邻苯二甲酸二辛酯(12), 山奈酚-7-O- α -L-吡喃鼠李糖苷(13), 槲皮素-7-O-吡喃鼠李糖苷(14), 槲皮素-3,7-2-O- α -L-吡喃鼠李糖苷(15), 牡荆苷(16)。结论: 所有化合物均首次从该植物中分离得到, 其中化合物 2~5, 7~9, 11~12 为首次从该属植物中分离得到。

[关键词] 多枝雾水葛; 化学成分; 三萜; 甾醇; 黄酮苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0043-05

[doi] 10.11653/syfy2014060043

Chemical Constituents from *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn. Var. *microphylla* (Wedd.) W. T. Wang.

LIU Xu-yang¹, XIE Yu-feng², ZHANG Hui¹, LIU Tian-zhu¹, WEN Chang², GUO Li-bing^{1*}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China;
2. Medicine Academy of Sciences, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20130523(010)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073045)

[第一作者] 刘旭阳, 硕士, E-mail: lxy5611@126.com

[通讯作者] * 郭丽冰, 本科, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药化学成分研究与开发, Tel: 020-39352179, E-mail: guolibing512@126.com

[参考文献]

- [1] 周华, 杨婧. 鹿红方治疗充血性心力衰竭合并心绞痛临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(4): 286.
- [2] 朱燕辉, 严丰祥. 黄芪甲苷及其生物学活性[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(4): 781.
- [3] 秦华珍, 柳俊辉. 黄芪治疗心血管疾病药理研究进展[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(2): 69.
- [4] 金鸣, 朴永哲, 吴伟, 等. 红花黄色素缓解心肌缺血大鼠心功能下降作用的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(2): 43.
- [5] 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: 283.
- [6] 聂颖兰, 范斌, 郭娜, 等. HPLC-ELSD 法测定健脾益肾胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 130.

- [7] 田景奎, 吴丽敏, 刘建建, 等. HPLC-ELSD 测定芪体颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(10): 812.
- [8] 陈祖云, 石凌云, 黄勇, 等. HPLC-ELSD 法测定脑通颗粒中黄芪甲苷和人参皂苷 Rb₁ 的含量及稳定性[J]. 中国药房, 2011, 22(23): 2164.
- [9] 桑育黎, 郝延军. 通窍鼻炎颗粒质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 83.
- [10] 雷志丹, 雷志钧, 夏新华, 等. HPLC 测定红花中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 药品鉴定, 2011, 18(7): 45.
- [11] 戴闰柱. 2005 年美国慢性收缩性心力衰竭治疗指南浅析[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(12): 1065.
- [12] 欧阳春华. 黄芪甲苷含量测定几种常用方法的比较[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(15): 139.

[责任编辑 全燕]