

HPLC 测定复方黄葵颗粒中 8 种成分

江静怡¹, 刘欢¹, 王丽灵¹, 刘志辉^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

【摘要】 目的:建立 HPLC 同时测定复方黄葵颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素、马钱苷、莫诺苷的方法。方法:采用 Aglient C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈-0.05% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长分别为 240,260,360 nm,柱温 30 ℃。结果:毛蕊异黄酮葡萄糖苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素、莫诺苷、马钱苷线性范围分别为 3.5~35.0(*r*=0.999 6),32.09~320.9(*r*=0.999 7),2.21~22.12(*r*=0.999 7),18.68~186.9(*r*=0.999 8),6.32~63.20(*r*=0.999 7),3.54~35.44(*r*=0.999 6),12.39~123.9(*r*=0.999 6),12.88~128.8 mg·L⁻¹(*r*=0.999 6)。平均回收率分别为 98.1% (RSD 1.7%),99.7% (RSD 0.6%),98.7% (RSD 2.5%),100.1% (RSD 1.4%),99.7% (RSD 1.0%),99.9% (RSD 2.7%),99.0% (RSD 1.2%),99.7% (RSD 1.3%)。结论:所建立方法简便、准确,重复性好,可作为复方黄葵颗粒的质量控制。

【关键词】 复方黄葵颗粒; 黄芪; 黄蜀葵花; 酒萸肉; 高效液相色谱
【中图分类号】 R284.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-9903(2015)05-0095-04
【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050095

Simultaneous Determination of Eight Components in Compound Huangkui Granules by HPLC
JIANG Jing-yi¹, LIU Huan¹, WANG Li-ling¹, LIU Zhi-hui^{2*} (1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneously determining the contents of calycosin-7-*O*- β -D-glucoside, hypericin, rutin, isoquercetin, myricetin, quercetin, loganin, morroniide in compound Huangkui granules. **Method:** The determination was performed on an Aglient C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatographic column, the mobile phase was acetonitrile-0.05% formic acid aqueous solution with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 240, 260 and 360 nm, column temperature was 30 ℃. **Result:** The calibration curves of calycosin-7-*O*- β -D-glucoside, hypericin, rutin, isoquercetin, myricetin, quercetin, loganin, morroniide were linear in the ranges of 3.5-35.0 (*r*=0.999 6), 32.09-300.9 (*r*=0.999 7), 2.21-22.12 (*r*=0.999 7), 18.68-186.9 (*r*=0.999 8), 6.32-63.20 (*r*=0.999 7), 3.54-35.44 (*r*=0.999 6), 12.39-123.9 (*r*=0.999 6), 12.88-128.8 mg·L⁻¹ (*r*=0.999 6), respectively. The average recoveries were 98.1% (RSD 1.7%), 99.7% (RSD 0.6%), 98.7% (RSD 2.5%), 100.1% (RSD 1.4%), 99.7% (RSD 1.0%), 99.9% (RSD 2.7%), 99.0% (RSD 1.2%), 99.7% (RSD 1.3%), respectively. **Conclusion:** The method established is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Huangkui granules.

【Key words】 compound Huangkui granules; Astragali Radix; Abelmoschi Corolla; wine-prepared Corni Fructus; HPLC

复方黄葵颗粒为南京中医药大学附属医院余江毅主任医师经验方,由黄芪、黄蜀葵花、酒萸肉 3 味中药组成,具有补气健脾、益肝肾功能,用于治疗消渴症并发症(糖尿病肾病),在临床上疗效显著。

【收稿日期】 20141029(001)
【基金项目】 江苏省药学会-奥赛康医院药学基金项目(201302);江苏省科技支撑计划项目(BE2012777)
【第一作者】 江静怡,在读硕士,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:18252066813,E-mail:jiangjingyi1123@126.com
【通讯作者】 * 刘志辉,主任中药师,从事中药制剂开发及中药质量标准研究,Tel:025-86529291,E-mail:liuzh1008@126.com

为了能全面评价该制剂的质量,本实验采用 HPLC 同时测定制剂中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素、马钱苷、莫诺苷这 8 种成分的含量,对于复方黄葵颗粒的质量控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

2695 型高效液相色谱仪(包括 2998 型 PDA 检测器美国 Waters 公司),BP-211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 120809)、金丝桃苷(批号 111207)、芦丁(批号 130918)、杨梅素(批号 131013)、异槲皮素(批号 110404)、槲皮素(批号 121020)对照品均由成都普菲德生物技术有限公司所提供,马钱苷(批号 121120)、莫诺苷(批号 130301)均由南京宁歧医药科技有限公司所提供,纯度 $\geq 98\%$;乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯化水,复方黄葵颗粒(江苏省中医院提供,批号 140525,140526,140527,规格 10 g/袋)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相 0.05% 甲酸溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min,95%~93% B;3~8 min,93%~92% B;8~10 min,92%~91% B;10~15 min,91%~85% B;15~20 min,85%~84% B;20~27 min,84%~82% B;27~30 min,82%~80% B;30~40 min,80%~78% B;40~50 min,78%~77% B;50~55 min,77%~72% B;55~60 min,72%~58% B;60~61 min,58%~95% B;61~65 min,95% B),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm(山茱萸有效成分)^[1-2],260 nm(黄芪有效成分)^[3],360 nm(黄蜀葵花有效成分)^[4]。样品与对照品在相同位置有吸收,无阴性干扰,分离度>1.5,理论塔板数按上述对照品计算均不低于 5 000。见图 1,2。

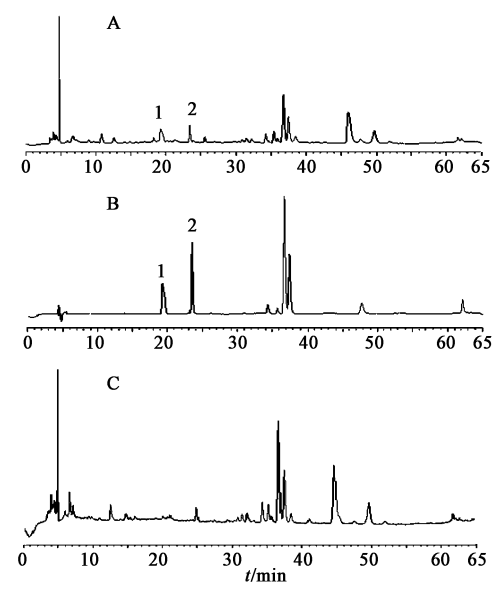
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、莫诺苷、马钱苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素适量,加入甲醇制成每 1 mL 分别含 3.50,12.4,12.9,32.1,2.21,18.7,6.32,3.54 μ g 的混合对照品溶液。

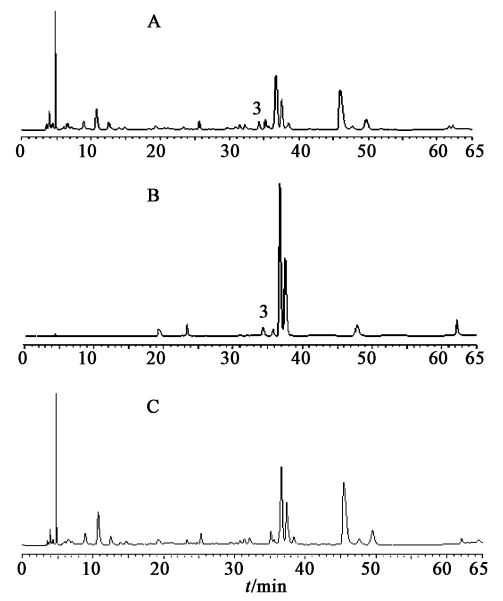
2.2.2 供试品溶液的制备 取复方黄葵颗粒 0.5 g,精密称定,加 70% 乙醇 50 mL,精密称定,超声溶解 20 min,放冷后精密称定,并补足减失质量,上清液经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 取缺黄芪阴性样品、缺黄蜀

葵花阴性样品及缺酒萸肉阴性样品,分别按 2.2.2 项下方法制备相应供试品溶液,即得。

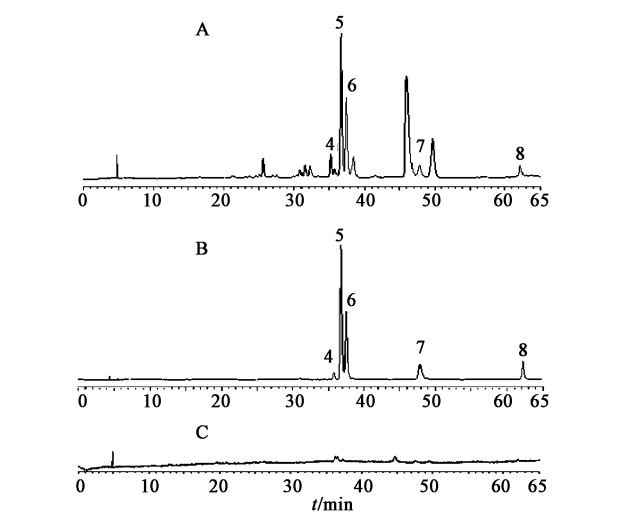


A. 样品;B. 对照品;C. 缺酒萸肉阴性样品;1. 莫诺苷;2. 马钱苷
图 1 复方黄葵颗粒在 240 nm HPLC
Fig. 1 HPLC chromatogram of compound Huangkui granules at 240 nm



A. 样品;B. 对照品;C. 缺黄芪阴性样品;3. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷
图 2 复方黄葵颗粒在 260 nm HPLC
Fig. 2 HPLC chromatogram of compound Huangkui granules at 260 nm

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液 1,2,4,6,8,10 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成不同浓度对照品混合溶液,精密吸取上述溶液 10 μ L,分别进样,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标绘制标



A. 样品;B. 对照品;C. 缺黄蜀葵花阴性样品;4. 芦丁;5. 金丝桃苷;
6. 异槲皮苷;7. 杨梅素;8. 槲皮素

图 3 复方黄葵颗粒在 360 nm HPLC
Fig. 3 HPLC chromatogram of compound Huangkui granules at 360nm

准曲线,得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、莫诺苷、马钱苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素的回归方程、相关系数和线性范围,结果见表 1。

表 1 8 种有效成分的线性方程、相关系数及线性范围
Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linearity range of eight compounds

成分	线性方程	相关系数	线性范围 /mg·L ⁻¹
毛蕊异黄酮	$Y = 2 \times 10^6 X - 77\ 609$	0.999 6	3.5 ~ 35.0
葡萄糖苷			
莫诺苷	$Y = 3 \times 10^6 X - 434\ 029$	0.999 7	12.39 ~ 123.9
马钱苷	$Y = 3 \times 10^6 X - 472\ 611$	0.999 7	12.88 ~ 128.8
金丝桃苷	$Y = 4 \times 10^6 X - 1 \times 10^6$	0.999 7	32.09 ~ 320.9
芦丁	$Y = 3 \times 10^6 X - 76\ 274$	0.999 7	2.21 ~ 22.12
异槲皮苷	$Y = 4 \times 10^6 X - 797\ 272$	0.999 8	18.69 ~ 186.9
杨梅素	$Y = 4 \times 10^6 X - 260\ 269$	0.999 7	6.32 ~ 63.20
槲皮素	$Y = 4 \times 10^6 X - 99\ 991$	0.999 6	3.54 ~ 35.44

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,连续进样测定 6 次,以峰面积计算,得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、莫诺苷、马钱苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素的 RSD 分别为 0.9%,1.4%,1.1%,0.2%,1.4%,0.6%,1.7%,1.6%。表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取批号 140423 复方黄葵颗粒约 0.5 g,共 6 份,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,取 10 μL 注入高效液相色谱仪中,测定

峰面积值,计算含量。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、莫诺苷、马钱苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素平均质量分数分别为 0.85,1.73,1.19,3.33,0.33,2.20,0.63,0.29 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.6%,1.5%,1.0%,0.6%,1.3%,0.8%,1.6%,1.0%。表明方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件,于 0,2,4,6,8,12 h 分别进样,测定。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、莫诺苷、马钱苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素含量 RSD 分别为 1.4%,0.8%,1.0%,0.6%,1.5%,0.8%,1.5%,2.0%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.8 加样回收试验 取已知含量的复方黄葵颗粒(批号 140423)约 0.25 g,共 6 份,精密称定,分别加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷、莫诺苷、马钱苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、杨梅素、槲皮素 0.211,0.431,0.298,0.831,0.081 6,0.550,0.158,0.072 4 mg,按 2.2.2 项下方法制备供试溶液,进样 10 μL,计算 8 种成分的回收率。结果见表 2。

表 2 复方黄葵颗粒中 8 种成分的加样回收率
Table 2 Recovery tests of 8 components in Huangkui granules

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
毛蕊异黄酮	0.211	0.224	0.436	100.4	98.1	1.7
葡萄糖苷	0.211	0.224	0.429	97.3		
	0.211	0.224	0.426	96.0		
	0.211	0.224	0.432	98.7		
	0.211	0.224	0.428	96.9		
	0.211	0.224	0.433	99.1		
莫诺苷	0.431	0.396	0.816	97.2	99.0	1.2
	0.431	0.396	0.823	99.0		
	0.431	0.396	0.828	100.3		
	0.431	0.396	0.819	98.0		
	0.431	0.396	0.825	99.5		
	0.431	0.396	0.826	99.7		
马钱苷	0.298	0.309	0.608	100.3	99.7	1.3
	0.298	0.309	0.599	97.4		
	0.298	0.309	0.608	100.3		
	0.298	0.309	0.605	99.4		
	0.298	0.309	0.611	101.3		
	0.298	0.309	0.606	99.7		

续表 2						
成分	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
金丝桃苷	0.831	0.822	1.654	100.1	99.7	0.6
	0.831	0.822	1.647	99.3		
	0.831	0.822	1.643	98.8		
	0.831	0.822	1.653	100.0		
	0.831	0.822	1.658	100.6		
	0.831	0.822	1.649	99.5		
芦丁	0.081 6	0.085 0	0.166	99.3	98.7	2.5
	0.081 6	0.085 0	0.165	98.1		
	0.081 6	0.085 0	0.164	96.9		
	0.081 6	0.085 0	0.169	102.8		
	0.081 6	0.085 0	0.163	95.8		
	0.081 6	0.085 0	0.166	99.3		
异槲皮苷	0.550	0.598	1.159	101.8	100.1	1.4
	0.550	0.598	1.146	99.7		
	0.550	0.598	1.147	99.8		
	0.550	0.598	1.142	99.0		
	0.550	0.598	1.139	98.5		
	0.550	0.598	1.159	101.8		
杨梅素	0.158	0.162	0.321	100.6	99.7	1.0
	0.158	0.162	0.319	99.4		
	0.158	0.162	0.322	101.2		
	0.158	0.162	0.318	98.8		
	0.158	0.162	0.319	99.4		
	0.158	0.162	0.318	98.8		
槲皮素	0.0724	0.0680	0.140	99.4	99.9	2.7
	0.0724	0.0680	0.142	102.4		
	0.0724	0.0680	0.140	99.4		
	0.0724	0.0680	0.143	103.8		
	0.0724	0.0680	0.138	96.5		
	0.0724	0.0680	0.139	97.9		

2.3 样品含量测定 取复方黄葵颗粒 3 批样品,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,结果见表 3。

表 3 复方黄葵样品中 8 种成分含量测定								
Table 3	Results of content determination of samples							
	mg·g ⁻¹							
	毛蕊异							
批号	黄酮葡	莫诺苷	马钱苷	金丝	芦丁	异槲	杨梅素	槲皮素
	萄糖苷			桃苷		皮苷		
140525	0.93	1.76	1.19	3.21	0.35	2.23	0.63	0.26
140526	0.84	1.62	1.15	3.43	0.26	2.18	0.67	0.29
140527	0.91	1.79	1.05	3.36	0.29	2.19	0.71	0.31

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备 比较了加热回流与超声提取,发现两者无显著性差异;在提取时间上考察 10,20,30,40 min 对成分的影响,结果基本一致,为确保提取效果,选择超声 20 min;在对提取溶剂甲醇及乙醇进行考察,结果无差异,而浓度的考察中发现 70% 乙醇的转移完全,易过滤,因此,综合考虑选用 70% 乙醇作为溶剂,超声提取 20 min 作为供试品的制备方法。

3.2 流动相的选择^[5-8] 本文对乙腈-水、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液等流动相进行考察,结果发现黄酮类成分在乙腈-磷酸水溶液中的分离度较差,最终选择乙腈-0.05% 甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,且流速降为 0.8 mL·min⁻¹,结果,所测目标成分均能较好的分离,达到要求且峰形较好。

3.3 检测波长的选择 因 3 种饮片所测目标成分其最大紫外吸收相差较大,根据紫外全波长扫描的结果,最终选择 240 nm 作为黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷成分的检测波长,260 nm 作为酒萸肉环烯醚萜类成分的检测波长,360 nm 作为黄蜀葵花金丝桃苷成分的检测波长。

[参考文献]

[1] 朱砂,梁晋如,何姣,等. HPLC 法同时测定不同产地及不同采收时间山茱萸中 3 个环烯醚萜苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012,32(7):1235-1238.

[2] 陈学艳,王艳,李晶,等. 山茱萸不同炮制品中莫诺苷和马钱苷含量测定 [J]. 天津中医药, 2010,27(3):254-256.

[3] 宋成英,封加福. HPLC 同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(11):115-117.

[4] 陆林玲,钱大玮,郭建明,等. 一测多评法测定黄蜀葵花中 7 个黄酮类成分 [J]. 药物分析杂志, 2013,33(12):2082-2087.

[5] 周丹丹,赵云丽,张艳莉. RP-HPLC 法同时测定乙肝舒康胶囊中虎杖苷和二苯乙烯苷含量 [J]. 药物分析杂志, 2008,28(3):411-413.

[6] 袁丽春,刘斌,石任兵. HPLC 法测定不同市售荷叶药材中 金丝桃苷和异槲皮苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010,30(1):41-44.

[7] 李爽,贾媛,范玲,等. 芪葵颗粒定性定量方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2012,32(9):1564-1569.

[8] 周洪亮,方祝元,常星洁,等. 基于莫诺苷转化的山茱萸环烯醚萜苷提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(9):26-28.

[责任编辑 顾雪竹]