

· 研究报告 ·

用 HPLC 法同时测定养血安神糖浆中 4 种成分的含量

陆萍, 倪东杰, 郑巍, 郭良君, 王翔 (陆军第七十二集团军医院, 浙江湖州 313000)

[摘要] 目的 建立同时测定养血安神糖浆中槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量的方法。方法 采用 HPLC 法。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)。流动相: 0.1% 醋酸(A)-甲醇(B)梯度洗脱, 0~15 min, 95%~90%A; 15~35 min, 90%~70%A; 35~55 min, 70%~60%A; 55~85 min, 60%~50%A; 85~95 min, 10%A。流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 256 nm 和 320 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ l。结果 槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷分别在 10~300、5.0~150.0、5.0~150.0、20.0~600.0 μ g/ml 范围呈良好的线性关系($r \geq 0.9989$); 加样回收率分别为(96.75 $\pm$ 1.41)%、(99.61 $\pm$ 1.01)%、(97.18 $\pm$ 1.96)% 和(99.12 $\pm$ 0.97)%($n=6$)。结论 该方法简单、准确、稳定, 可同时测定养血安神糖浆中 4 种成分的含量。

[关键词] 养血安神糖浆; 槲皮苷; 木犀草苷; 芦丁; 2,3,5,4'-四羟基-二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)03-0270-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202006072

One step assay of the four plant ingredients in Yangxue Anshen syrup by HPLC method

LU Ping, NI Dongjie, ZHENG Wei, GUO Liangjun, WANG Xiang (Department of Pharmacy, 72nd Group Army Hospital of PLA, Huzhou 313000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for simultaneous determination of quercitrin, luteoloside, rutin and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside in Yangxue Anshen syrup. **Methods** Waters symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) was used with 0.1% acetic acid (A) and methanol (B) as the mobile phase. Gradient elution was performed at a flow rate of 1.0 ml/min, 0-15 min, 95%-90%A; 15-35 min, 90%-70%A; 35-55 min, 70%-60%A; 55-85 min, 60%-50%A; 85-95 min, 10%A. The detection wavelengths were 256 nm and 320 nm. Column temperature was 30 $^{\circ}$ C and the injection volume was 10 μ l. **Results** Quercitrin, luteoloside, rutin and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside showed good linear relationship within the range of 10-300, 5.0-150.0, 5.0-150.0, 20.0-600.0 μ g/ml($r \geq 0.9989$), respectively. The average recovery was (96.75 $\pm$ 1.41)%, (99.61 $\pm$ 1.01)%, (97.18 $\pm$ 1.96)% and(99.12 $\pm$ 0.97)%($n=6$), respectively. **Conclusion** The established method is simple, accurate and stable, which can be used for the simultaneous determination of 4 components in Yangxue Anshen syrup.

[Key words] Yangxue Anshen syrup; quercitrin; luteoloside; rutin; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside; HPLC

养血安神糖浆为陆军第七十二集团军医院(以下简称本院)自制制剂(批准文号:南制字(2016)B504019),由首乌藤、鸡血藤、熟地黄、合欢皮、墨旱莲、仙鹤草和生地制成,具有滋阴养血、宁心安神功效,临床用于精神倦怠、失眠健忘、肾虚腰酸、头晕乏力。首乌藤为方中君药,为蓼科植物何首乌的干燥根茎,具养血安神、祛风通络之功效,主含 2,3,5,4'-四羟基-二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷^[1]。处方中墨旱莲、仙鹤草、合欢皮中均含槲皮苷;墨旱莲、仙鹤草、熟地黄、生地中均含木犀草苷;墨旱莲、仙鹤草中均含芦丁^[2-4]。槲皮苷、木犀草苷和芦

丁均属于黄酮类化合物,具有免疫调节和抗氧化功能^[5-6]。因此,将槲皮苷、木犀草苷和芦丁作为黄酮类成分的指标性成分进行整体质量控制。养血安神糖浆现行《卫生部颁药品标准中药成方制剂》^[7]标准只有检查项,未收载含量测定方法,不利于质量控制。因此,笔者以安神作用突出的槲皮苷和葡萄糖苷,以及木犀草苷和芦丁为测定指标,建立同时测定 4 组分含量的 HPLC 法,填补了制剂无含量测定方法的空白,并为提高质量标准及工艺改进提供一定的研究基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2489 双波紫外可见光检测器, Empower 3 工作站 [沃特世

[作者简介] 陆萍, 本科, 主管药师, 研究方向: 质量标准研究, Tel: (0572)3269832, Email: luping86@126.com

[通信作者] 王翔, 硕士, 主管药师, 研究方向: 制剂开发, Tel: (0572)3269832, Email: wanggg0214@foxmail.com

科技(上海)有限公司]; 756PC 紫外可见光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); KQ2200DE 型数控超声波清洗器(上海精若科学仪器有限公司); Sartorius BS 124S 型电子天平(德国赛多利斯); 80-2 台式低速离心机(上海医疗器械有限公司手术器械厂)。

1.2 试药

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品(批号: 110844-201109)、槲皮苷对照品(批号: 111538-201606)、木犀草苷对照品(批号: 111801-201003)和芦丁对照品(批号: 100080-200707)均购自中国食品药品检定研究院, 供含量测定用。养血安神糖浆(本院制剂室自制, 规格: 250 ml/瓶, 批号: 191008、191211、200309、200422、200519); 100% 甲醇为色谱纯(德国默克股份两合公司), 分析纯 95% 乙醇, 水为重蒸去离子水, 其他试剂均为分析纯。

2 含量测定

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液

①对照品储备液: 精密称取槲皮苷、木犀草苷、芦丁对照品各 10.0 mg, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品 20.0 mg, 分别置 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成槲皮苷、木犀草苷、芦丁 1 mg/ml 的对照品储备液, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 2 mg/ml 的对照品储备液。②对照品稀释液: 分别精密量取槲皮苷、木犀草苷、芦丁、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品储备液各 2 ml, 加甲醇稀释至 10 ml, 制成含槲皮苷、木犀草苷、芦丁对照品稀释液各 0.2 mg/ml, 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品稀释液 0.4 mg/ml。③混合对照溶液: 分别精密量取 4 组分对照品稀释液各 1 ml 置 5 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 微孔滤膜(0.45 μ m)过滤, 取续滤液即得。

2.1.2 供试品溶液

精密量取养血安神糖浆 10 ml, 加甲醇稀释至 50 ml, 超声(100 W, 40 kHz)15 min, 离心 10 min(转速: 4 000 r/min, 离心半径 12 cm), 取上清液微孔滤膜(0.45 μ m)过滤, 即得^[8]。

2.2 色谱条件^[9-10]

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)。流动相: 0.1% 醋酸(A)-甲醇(B), 按如下条件梯度洗脱: 0~15 min, 95%~90%A;

15~35 min, 90%~70%A; 35~55 min, 70%~60%A; 55~85 min, 60%~50%A; 85~95 min, 10%A。每一针结束后以初始比例平衡 20 min; 流速 1.0 ml/min, 检测波长: 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和芦丁为 320 nm, 槲皮苷和木犀草苷均为 256 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ l。在上述条件下, 芦丁、槲皮苷、木犀草苷和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷分离度均大于 1.5; 理论塔板数均不低于 3 000, 见图 1。

2.3 线性关系考察

精密吸取槲皮苷对照品储备液 0.2、0.6、1.5、3.0 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 配制成 20、60、150、300 μ g/ml 对照品溶液。再对上述 20 μ g/ml 对照品溶液进行对半稀释, 获得 10 μ g/ml 对照品溶液。最终获得 10~300 μ g/ml 浓度梯度的槲皮苷对照品溶液。分别精密吸取木犀草苷和芦

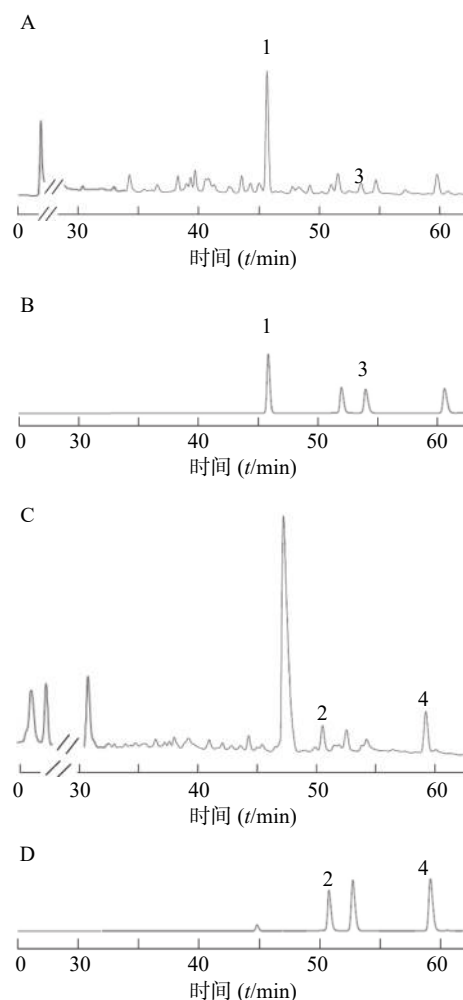


图 1 养血安神糖浆供试品和对照品的 HPLC 图

A. 供试品 (320 nm); B. 对照品 (320 nm); C. 供试品 (256 nm);
D. 对照品 (256 nm)
1. 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷;
2. 木犀草苷; 3. 芦丁; 4. 槲皮苷。

丁对照品储备液 0.1、0.5、1.5 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 配制成 10、50、150 $\mu\text{g/ml}$ 对照品溶液, 再依次对上述对照品溶液进行对半稀释, 获得 5、25、75 $\mu\text{g/ml}$ 对照品溶液。最终分别获得 5 ~ 150 $\mu\text{g/ml}$ 浓度梯度的木犀草苷和芦丁对照品溶液。精密吸取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品储备液 0.2、1.5、3.0 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 配制成 40、300、600 $\mu\text{g/ml}$ 对照品溶液。再对上述对照品溶液进行对半稀释, 获得 20、150、300 $\mu\text{g/ml}$ 对照品溶液。最终获得 20 ~ 600 $\mu\text{g/ml}$ 浓度梯度的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品溶液。精密吸取上述溶液各 10 μl , 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 以峰面积值 (Y) 为纵坐标, 对照品浓度 (X , $\mu\text{g/ml}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 经直线回归得线性方程, 结果见表 1。结果表明, 4 组分在一定浓度范围内呈良好线性关系, 该法满足定量检测要求。

表 1 4 组分线性关系考察结果

组分	方程	r	浓度范围 ($\mu\text{g/ml}$)
槲皮苷	$Y=1.83 \times 10^3 X + 162.82$	0.9993	10 ~ 300
木犀草苷	$Y=2.35 \times 10^3 X - 189.43$	0.9989	5 ~ 150
芦丁	$Y=1.72 \times 10^3 X + 53.71$	0.9992	5 ~ 150
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷	$Y=4.55 \times 10^3 X + 1902.31$	0.9997	20 ~ 600

2.4 精密度试验

精密量取混合对照品溶液 2 ml, 加甲醇稀释至 10 ml, 摇匀, 按“2.2”项下色谱条件重复进样 5 次, 记录峰面积。结果表明, 4 种组分峰面积 $\text{RSD} < 3\%$ ($n=5$), 表明精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批 (批号: 200309) 样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备, 按“2.2”项下方法测定 4 种组分含量, 结果槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量值分别为: 106.34、43.66、24.68 和 427.12 $\mu\text{g/ml}$, 4 种组分含量 RSD 分别 1.2%、1.5%、1.6%、1.7% ($n=6$), 表明重现性较好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号: 200309), 每隔 4 h 按“2.2”项下方法, 分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 测定 4 种组分的峰面积值。结果槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的平均峰面积分别为 196142、96161、37893、1923385, RSD 分别为 0.8%、0.9%、1.2%、1.0% ($n=7$),

供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

精密量取已知含量的养血安神糖浆 (批号: 200309, 槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的平均含量为: 106.34、43.66、24.68 和 427.12 $\mu\text{g/ml}$) 1 ml, 平行量取 6 份, 分别精密加入“2.1.1”项下槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品稀释液各 0.5、0.2、0.1、1.0 ml, 按“2.1.2”项下方法制备, 进样前用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 按“2.2”项下方法测定, 每组测 6 次, 结果平均加样回收率分别为 (96.75 $\pm$ 1.41)%、(99.61 $\pm$ 1.01)%、(97.18 $\pm$ 1.96)%、(99.12 $\pm$ 0.97)%, $n=6$, 表明方法准确度良好。

2.8 样品含量测定

按上述方法测定 4 批养血安神糖浆含量, 每批平行测定 3 次, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本实验所测的 4 组分极性差异较大, 选择流动相时, 先后考察 0.1% 醋酸-甲醇、0.1% 醋酸-乙腈、0.1% 磷酸盐-甲醇和 0.1% 磷酸盐-乙腈溶液系统梯度洗脱, 结果发现, 以 0.1% 醋酸-甲醇作为流动相时, 体系的基线平稳, 峰型及分离度均显著优于其他体系, 4 组分色谱峰分离完全。

3.2 芦丁检测波长的选择

根据槲皮苷、木犀草苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷在双波长 256 nm、320 nm 下测得的色谱峰显示, 分离度、色谱峰正态分布及峰面积都具有一致性, 因此, 根据色谱峰特征选择波长毫无争议。但是, 在 256 nm 波长下, 芦丁测得的峰面积是 320 nm 波长下峰面积的 2 倍, 而 320 nm 波长下的峰分离度为 3.4, 256 nm 波长下的峰分离度为 1.8。从供试品图谱观察, 在 320 nm 下峰形对称性较好。综上因素考量, 本实验将芦丁的检测波长定为 320 nm。

3.3 提取条件优化^[11]

同时考察了以 50% 甲醇、100% 甲醇、50% 乙醇、95% 乙醇超声提取供试品, 综合比较各组分的含量, 最终选择 100% 甲醇超声提取的方法处理供试品。

综上所述, 本实验建立了以高效液相双波长法同时测定槲皮苷、木犀草苷、芦丁和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 4 组分含量的方法,

表2 养血安神糖浆含量测定结果 ($\mu\text{g/ml}$, $n=3$, $\bar{x} \pm s$)

批号	槲皮苷	RSD(%)	木犀草苷	RSD(%)	芦丁	RSD(%)	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷	RSD(%)
191008	96.90	1.71	43.19	2.29	23.19	2.73	430.01	1.12
	94.67		44.07		22.98		422.76	
	97.88		45.21		24.18		421.03	
191211	107.13	2.84	40.86	1.44	23.52	2.77	427.65	0.69
	102.34		41.34		22.26		422.11	
	101.76		42.05		23.57		423.16	
200422	104.16	2.29	41.93	2.66	24.53	2.06	425.06	0.96
	99.82		40.18		23.84		428.17	
	100.55		42.22		23.57		433.26	
200519	101.33	1.36	40.54	1.92	20.19	2.54	422.18	0.79
	98.64		41.62		21.91		425.86	
	99.71		42.10		20.85		419.13	

操作简单, 结果准确, 可用于养血安神糖浆的质量控制, 亦为下一步对养血安神糖浆的工艺改进研究打下了基础。

【参考文献】

- [1] 刘珍, 陈萍, 杨连芳. 安眠补脑糖浆中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9): 10-11.
- [2] 蔚冬红, 乔善义, 赵毅民. 中药合欢皮研究概况[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 619-624.
- [3] 李雯, 庞旭, 韩立峰, 等. 中药墨旱莲化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3498-3505.
- [4] 刘位杰, 梁敬钰, 孙建博, 等. 仙鹤草化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2016, 28(2): 1-7.
- [5] 管仁伟, 曲永胜, 顾正位, 等. 木犀草苷的药理作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(1): 1-3.
- [6] 黄河胜, 马传庚. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 589-592.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 卫生部颁药品标准中药成方制剂[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- [8] 姜姗, 冯丽君, 孔慧, 等. 养阴清肺糖浆指纹图谱研究[J]. 中草药, 2013, 44(8): 989-994.
- [9] 陆萍, 倪东杰, 郑巍, 等. 高效液相色谱法测定紫草油中4种植物成分的含量[J]. 中国药师, 2019, 22(3): 561-563.
- [10] 黑龙江天行健医药科技发展有限公司, 哈尔滨华雨制药集团有限公司. 肺结核丸的制备工艺及检测方法[P]. 201410040775. 1. 2015-07-29.
- [11] 范金钊, 丁晓芳, 白林, 等. HPLC法测定心肾安颗粒中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量[J]. 中国药物应用与监测, 2017, 14(4): 209-211.

〔收稿日期〕 2020-06-18 〔修回日期〕 2020-10-21

〔本文编辑〕 李睿旻