[质 量]

HPLC 法同时测定桑芪首乌片中 7 种成分

李争艳[1]， 袁小淋[1]， 魏丹霞[1]， 李月亭[2]， 余晓玲[1*]
(1. 昆明市中医医院，云南 昆明 650051；2. 云南中医学院，云南 昆明 650200)

摘要：目的 建立 HPLC 法同时测定桑芪首乌片（桑寄生、黄芪、制何首乌等）中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、氧化芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Diamonsil C_{18}色谱柱（250 mm ×4. 6 mm，5 μm）；流动相乙腈-0. 02% 磷酸，梯度洗脱；体积流量 0. 9 mL/min，检测波长 230、254 nm；柱温 25 ℃。**结果** 7 种成分在各自范围内均呈良好的线性关系（r≥0. 999 2），平均加样回收率 97. 13% ~ 100. 03% ，RSD 0. 69% ~1. 47% 。**结论** 该方法快速、灵敏、准确、专属性好，可用于桑芪首乌片的质量控制。

关键词：桑芪首乌片；化学成分；HPLC
中图分类号：R927. 2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)04-0737-04
doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2017. 04. 015

Simultaneous determination of seven constituents in Sangqishouwu Tablets by HPLC

LI Zheng-yan[1], YUAN Xiao-lin[1], WEI Dan-xia[1], LI Yue-ting[2], YU Xiao-ling[1*]
(*1. Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650051, China*; *2. Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200, China*)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of calycosin-7-glucoside, ononin, calycosin, formononetin, oxypaeoniflorin, alibiflorin and benzoylpaeoniflorin in Sangqishouwu Tablets (*Talxilli Herba*, *Astragali Radix*, *Polygoni multiflori Radix Praeparata*, *etc.*). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic Diamonsil C_{18} colmn (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile- 0. 02% phosphoric acid flowing at 0. 9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 230 nm and 254 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges (r ≥ 0. 999 2), whose average recoveries were 97. 13% – 100. 03% with the RSDs of 0. 69% – 1. 47% . **CONCLUSION** This sensitive, accurate and specific method can be used for the rapid quality control of Sangqishouwu Tablets.

KEY WORDS: Sangqishouwu Tablets; chemical constituents; HPLC

桑芪首乌片为昆明市中医医院的院内制剂，由黄芪、生白芍、桑寄生、制何首乌、炒杜仲、当归、川芎、紫丹参、天麻、钩藤、黄柏、火麻仁、夜交藤、秫米、炒谷麦芽、三七须根组成，方中生白芍、桑寄生、制首乌、杜仲养阴，补肝肾；当归、紫丹参、川芎行其滞，养营血；黄柏、钩藤、天麻清热除烦、平肝潜阳、熄风；阳生阴长，阴血的滋润有赖于阳气的温熙，故用黄芪益气以配阳助阴；火麻仁润肠通便泻浊，夜交藤、秫米养心宁心安神，炒谷麦芽顾护脾胃。该药物具有平肝潜阳、化痰熄风、活血通络、清热泻火的功效，主要用于高血压、中风等疾病的治疗，方中生白芍的主要成分是单萜类化合物白芍总苷，包括芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷、芍药花苷、芍药苷等，

收稿日期：2016-08-28
基金项目：云南省计划联盟项目（2012CG031）
作者简介：李争艳（1985—），女，硕士，中药师，从事新制剂开发与应用研究工作。Tel：13808728501
* **通信作者：**余晓玲（1971—），女，主任中药师，硕士生导师，从事医院药学研究工作。Tel：15398501651，E-mail：yuxiaolingkunming@ 163. com

具有平肝、保肝的药理作用[1]；黄芪的主要成分为黄酮、皂苷、多糖、氨基酸、微量元素等，其中黄酮主要有毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素等，可双相调节血压，具有利尿降压、降低肺动脉压及右心前负荷、扩张周围阻力血管、降低动脉压的作用[2]，能增强机体免疫功能，起到保肝、降压作用[3]。同时，芍药和黄芪提取物一定比例时混合时，对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的肝保护活性较显著[4]。

目前，有关标准未对方中任何药味进行定量测定，难以确保其质量稳定和疗效一致。本实验采用 HPLC 法，对其中主要药物生白芍和黄芪所含成分（毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、氧化芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷）含有量同时进行测定，可为有效控制桑芪首乌片质量提供较有力的依据，并确保临床用药的安全有效。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；AT-330 型柱温箱（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）；Sartorius BS210 型电子天平（德国 Sartorius 公司）；KQ3200DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药 毛蕊异黄酮苷（111920-201505，含有量 97.1%）、芒柄花素（111703-201504）对照品购自中国食品药品检定研究院；芒柄花苷对照品（486-62-4，含有量 98.0%）购自上海樊克生物科技有限公司；毛蕊异黄酮对照品（20575-57-9，含有量 98.0%）购自上海纯优生物科技有限公司；氧化芍药苷（39011-91-1，含有量 98.0%）、芍药内酯苷（39011-90-0，含有量 97.0%）、苯甲酰芍药苷（38642-49-8，含有量 98%）对照品购自成都普菲德生物技术有限公司。桑芪首乌片（0.4 g/片）来自昆明市中医医院，批号 141010、141015、141021。乙腈为色谱纯；其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；以乙腈（A）-0.02% 磷酸（B）为流动相，梯度洗脱[5-8]（0 ~ 11 min，20.0% A；11 ~ 25 min，20.0% →28.0% A；25 ~ 44 min，28.0% →45.0% A；44 ~ 50 min，45.0% →20.0% A）；254 nm[9] 波长下检测毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素，230 nm[10-11] 波长下检测氧化芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷；体积流量 0.9 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制成分别含毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、氧化芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷为 0.772、0.628、0.492、0.914、0.696、1.718、0.504 mg/mL 的对照品贮备液。吸取 2.5、2.5、2.5、5.0、2.5、5.0、2.5 mL，置于同一 100 mL 量瓶中，甲醇稀释并制成 0.019 3、0.015 7、0.012 3、0.045 7、0.017 4、0.085 9、0.012 6 mg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取桑芪首乌片适量，研细，精密称取约 2.0 g，置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇适量，超声提取 30 min，放冷，甲醇定容至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.4 阴性样品溶液制备 按桑芪首乌片的处方和工艺，分别制备不含黄芪、生白芍的阴性样品，再按“2.3”项下方法制成相应阴性样品溶液。

2.5 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下检测，色谱图见图 1，可知阴性无干扰。

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL，置于 20 mL量瓶中，甲醇稀释定容至刻度，摇匀，即得到系列质量浓度对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

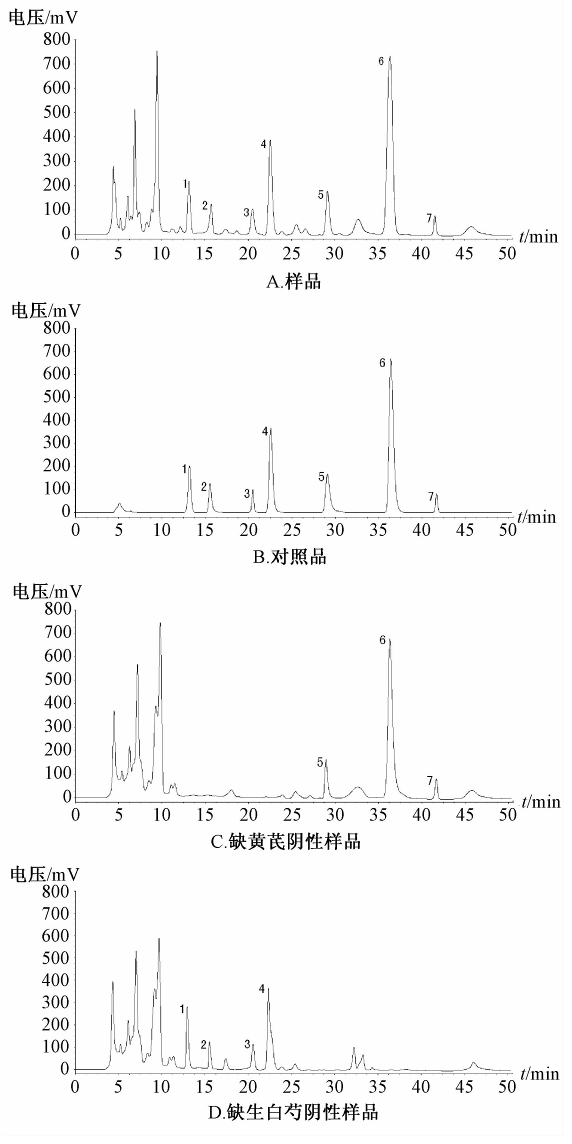
表 1 7 种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of seven constituents

成分	回归方程	线性范围/(μg·mL^{-1})	r
毛蕊异黄酮苷	$Y = 1.402\ 1 \times 10^6 X + 357.9$	3.86 ~ 77.20	0.999 7
芒柄花苷	$Y = 9.571\ 6 \times 10^5 X + 195.8$	3.14 ~ 62.80	0.999 9
毛蕊异黄酮	$Y = 8.095\ 4 \times 10^5 X - 169.1$	2.46 ~ 49.20	0.999 2
芒柄花素	$Y = 1.529\ 3 \times 10^6 X + 248.8$	4.57 ~ 91.40	0.999 8
氧化芍药苷	$Y = 1.357\ 8 \times 10^6 X - 472.0$	3.48 ~ 69.60	0.999 6
芍药内酯苷	$Y = 1.891\ 7 \times 10^6 X - 360.8$	8.59 ~ 171.80	0.999 9
苯甲酰芍药苷	$Y = 7.135\ 2 \times 10^5 X + 281.3$	2.52 ~ 50.40	0.999 4

2.7 精密度试验 取上述对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，连续进样 6 次，测得毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷峰面积 RSD 分别为 0.90%、1.05%、1.08%、0.79%、1.01%、0.73%、1.03%，表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取桑芪首乌片 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件



1. 毛蕊异黄酮苷 2. 芒柄花苷 3. 毛蕊异黄酮 4. 芒柄花素 5. 氧化芍药苷 6. 芍药内酯苷 7. 苯甲酰芍药苷

1. calycosin-7-glucoside 2. ononin 3. calycosin 4. formononetin 5. oxypaeoniflorin 6. alibiflorin 7. benzoylpaeoniflorin

图 1 7 种成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of seven constituents

下测定，测得毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷含有量 RSD 分别为 1.32%、1.54%、1.76%、1.19%、1.66%、1.16% 和 1.74%，表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液，于 0、2、4、6、8、12 h 在“2.1”项色谱条件下测定，测得毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷峰面积 RSD 分别为 0.98%、1.03%、1.18%、0.76%、1.14%、0.63%、1.17%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收率试验 取同一批号样品 6 份，研细，精密称取约 1.0 g，置于 50 mL 量瓶中，精密加入混合对照品溶液和甲醇各 25 mL，超声 30 min，放冷，甲醇定容至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，在“2.1”项色谱条件下测定，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果（$n=6$）

Tab. 2 Results of recovery tests（$n=6$）

成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%（RSD/%）
毛蕊异黄酮苷	1.000 6	0.521 3	0.482 5	1.000 6	99.34	97.51
	1.005 3	0.523 8	0.482 5	0.998 3	98.34	(1.34)
	0.999 1	0.520 5	0.482 5	0.985 1	96.29	
	1.001 9	0.522 0	0.482 5	0.988 0	96.58	
	0.989 5	0.515 5	0.482 5	0.989 7	98.28	
	1.002 8	0.522 5	0.482 5	0.986 9	96.25	
芒柄花苷	1.000 6	0.387 2	0.392 5	0.779 3	99.90	99.80
	1.005 3	0.389 1	0.392 5	0.784 4	100.71	(0.87)
	0.999 1	0.386 7	0.392 5	0.778 2	99.75	
	1.001 9	0.387 7	0.392 5	0.779 5	99.82	
	0.989 5	0.382 9	0.392 5	0.777 0	100.41	
	1.002 8	0.388 1	0.392 5	0.773 5	98.19	
毛蕊异黄酮	1.000 6	0.293 2	0.307 5	0.596 2	98.54	98.24
	1.005 3	0.294 6	0.307 5	0.600 8	99.58	(1.47)
	0.999 1	0.292 7	0.307 5	0.600 3	100.03	
	1.001 9	0.293 6	0.307 5	0.590 4	96.52	
	0.989 5	0.289 9	0.307 5	0.591 6	98.11	
	1.002 8	0.293 8	0.307 5	0.591 1	96.68	
芒柄花素	1.000 6	1.184 7	1.142 5	2.315 3	98.96	98.71
	1.005 3	1.190 3	1.142 5	2.309 1	97.93	(0.72)
	0.999 1	1.182 9	1.142 5	2.300 5	97.82	
	1.001 9	1.186 2	1.142 5	2.316 7	98.95	
	0.989 5	1.171 6	1.142 5	2.301 9	98.93	
	1.002 8	1.187 3	1.142 5	2.326 3	99.69	
氧化芍药苷	1.000 6	0.467 3	0.435 0	0.902 5	100.05	100.03
	1.005 3	0.469 5	0.435 0	0.906 1	100.37	(0.69)
	0.999 1	0.466 6	0.435 0	0.896 4	98.80	
	1.001 9	0.467 9	0.435 0	0.902 8	99.98	
	0.989 5	0.462 1	0.435 0	0.901 0	100.90	
	1.002 8	0.468 3	0.435 0	0.903 6	100.07	
芍药内酯苷	1.000 6	2.163 3	2.147 5	4.250 7	97.20	97.13
	1.005 3	2.173 5	2.147 5	4.235 3	96.01	(1.32)
	0.999 1	2.160 1	2.147 5	4.249 6	97.30	
	1.001 9	2.166 1	2.147 5	4.235 1	96.34	
	0.989 5	2.139 3	2.147 5	4.209 0	96.38	
	1.002 8	2.168 1	2.147 5	4.305 5	99.53	
苯甲酰芍药苷	1.000 6	0.302 2	0.315 0	0.613 9	98.95	98.32
	1.005 3	0.303 6	0.315 0	0.606 7	96.22	(1.28)
	0.999 1	0.301 7	0.315 0	0.613 8	99.08	
	1.001 9	0.302 6	0.315 0	0.609 2	97.33	
	0.989 5	0.298 8	0.315 0	0.612 0	99.43	
	1.002 8	0.302 8	0.315 0	0.614 4	98.92	

2.11 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，结果见表 3。

表 3 7 种成分含有量测定结果（mg/g）

Tab. 3 Results of content determination of seven constituents（mg/g）

批号	毛蕊异黄酮苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	氧化芍药苷	芍药内酯苷	苯甲酰芍药苷
141010	0.521	0.387	0.293	1.184	0.467	2.162	0.302
141015	0.511	0.365	0.291	1.199	0.479	2.183	0.315
141021	0.538	0.396	0.314	1.162	0.450	2.130	0.286
平均值	0.523	0.383	0.299	1.182	0.465	2.158	0.301

3 讨论

3.1 含有量限度确定 根据本实验测定各成分平均含有量的 80%，暂定每 1 g 样品含黄芪以毛蕊异黄酮苷计不得低于 0.40 mg，以芒柄花苷计不得低于 0.30 mg，以毛蕊异黄酮计不得低于 0.25 mg，以芒柄花素计不得低于 0.95 mg；含生白芍以氧化芍药苷计不得低于 0.35 mg，以芍药内酯苷计不得低于 1.7 mg，以苯甲酰芍药苷计不得低于 0.25 mg。

3.2 流动相选择 本实验考察了甲醇-水和乙腈-水，发现各成分分离效果均不理想。再考察了乙腈-冰醋酸和乙腈-0.02% 磷酸，发现前者洗脱时基线噪音大，漂移现象严重，而后者洗脱时可明显消除基线噪音和漂移现象，而且各色谱峰分离度良好，故最终确定流动相为乙腈-0.02% 磷酸。

3.3 检测波长选择 李小兵等[9]对毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素在 230、280、254 nm 波长下得到的图谱进行比较，优选出杂质峰干扰少、色谱峰峰形好、灵敏度高的检测波长为 254 nm。同时，文献［6-7］报道毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的检测波长 254 nm，欧金梅等[1]测定氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷时选取吸收强、干扰少的 230 nm 作为检测波长。综合考虑，本实验最终确定 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，230 nm 作为氧化芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷的检测波长。

3.4 供试品溶液制备方法选择 本实验考察了加热回流和超声 2 种提取方式，发现两者对各成分含有量影响程度无明显差异，可能与桑芪首乌片的制备工艺有关，考虑到操作方便，故选择超声提取。然后，考察了甲醇、50% 甲醇、乙醇 3 种提取溶剂，发现甲醇提取效果最佳。再考察了 20、30、40 min 3 个提取时间，发现提取 30 min 时效果最佳。综上所述，最终确定供试品溶液最佳制备方法为甲醇超声提取 30 min。

参考文献：

［1］ 欧金梅，吴德玲，金传山，等. HPLC 法同时测定白芍总苷中 4 种单萜苷的含量［J］. 中药材，2013，36（3）：423-425.
［2］ 李淑芳. 中药黄芪药理作用研究进展［J］. 湖北中医杂志，2013，35（6）：73-75.
［3］ 郑彩云. 黄芪降压作用的实验研究［J］. 光明中医，2010，25（4）：613-615.
［4］ 金英善，陈曼丽，陶 俊，等. 芍药化学成分和药理作用研究进展［J］. 中国药理学与毒理学杂志，2013，27（4）：745-750.
［5］ 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部［S］. 北京：中国医药科技出版社，2015：105，302.
［6］ 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］，中国药学杂志，2013，48（11）：916-919.
［7］ 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.
［8］ 刘 杰，李 煌，张平平，等. UPLC-MS/MS 法同时测定白芍饮片中 10 种成分［J］. 药物分析杂志，2015，35（4）：635-643.
［9］ 李小兵，谢晓梅，周铜水. 高效液相色谱法同时测定黄芪中 4 种异黄酮的含量［J］. 安徽医药，2008，12（5）：413-414.
［10］ 李伟铭，杨燕云，赖静怡，等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片中 9 个成分的含量［J］. 药物分析杂志，2011，31（12）：2208-2212.
［11］ 刘金环，杨玉琴，丁 秦，等. HPLC 法同时测定白芍药材中芍药内酯苷和芍药苷的含量［J］. 药物分析杂志，2012，32（7）：1249-1252.