

· 论著 ·

高效液相色谱法测定乌金胶囊中毛蕊异黄酮的含量

王 慧, 李 洋, 吕 昉, 凌水花, 黄玉凤, 张国庆(第二军医大学东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定乌金胶囊中毛蕊异黄酮含量。方法 色谱柱为 ZORBA Bonus-RP (4.6 mm×260 mm, 5 μm) 分析柱, 流动相乙腈-水(含 0.1% 甲酸) 梯度洗脱, 柱温 25 °C, 检测波长为 260 nm, 流速 1.0 ml/min, 进样量 10 μl。结果 毛蕊异黄酮在 7.4~117.6 μg/ml ($r=1.000$) 浓度范围内呈良好线性关系, 其回归方程为 $Y=34.002 X-3.4512$, 回收率为 95.24% (RSD=2.10%)。6 批乌金胶囊中异黄酮含量在 9.26~23.14 μg/g 之间。结论 该方法简便、快速、准确, 可用于乌金胶囊的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 毛蕊异黄酮; 含量测定; 乌金胶囊

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)01-0053-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.01.013

Determination of calycosin contents in Wujin capsule by HPLC

WANG Hui, LI Yang, LÜ Fang, LING Shuihua, HUANG Yufeng, ZHANG Guoqing (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To explore method for determination of calycosin contents in Wujin capsule by HPLC. **Methods** The sample was studied on ZORBA Bonus-RP (4.6 mm×260 mm, 5 μm) column, the mobile phase consisted of acetonitrile and H₂O-0.1% HCOOH (gradient elution), the temperature of column was 25 °C, the UV detection wavelength was set at 260 nm, flow speed was 1.0 ml/min and injection volume was 10 μl. **Results** The calycosin calibration curve was at the range of 7.4-117.6 μg/ml ($r=1.000$), with their regression function being $Y=34.002 X-3.4512$. The recovery of calycosin was 95.24% (RSD=2.10%). 6 batches of Wujin capsule calycosin contents were 9.26-23.14 μg/g. **Conclusion** HPLC was an accuracy and simple method for determining the content of calycosin in Wujin capsule.

[Key words] HPLC; calycosin; determination; Wujin capsule

乌金胶囊是第二军医大学附属东方肝胆外科医院自制制剂, 处方由乌骨藤、郁金、黄芪、延胡索、山楂五味中药组成, 具有清热解毒、活血化瘀、益气止痛之功效, 临床用于痈肿疮毒、痰湿积聚、血瘀气滞、胸肋胀痛诸症及肝癌的辅助治疗。其中黄芪作为乌金胶囊的臣药, 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、敛疮生肌之功效^[1], 国内外文献报道, 黄酮类和三萜皂苷类化合物为黄芪的主要活性成分^[2], 在抗肿瘤、抗炎抗菌等方面均有较好的药理作用^[3], 还有研究证明, 黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素对人乳腺癌 MCF-7 细胞具有明显的抑制作用^[4], 同时毛蕊异黄酮还具有植物雌激素作用, 能显著改善内皮细胞功能障碍^[5]。乌金胶囊作为复方制剂, 成分复杂, 对其中毛蕊异黄酮等有效成分进行含量测定时干扰较大, 笔者采用大孔树脂

对样品进行除杂和富集, 应用高效液相色谱法对黄芪中毛蕊异黄酮成分进行含量测定, 为乌金胶囊质量控制的建立提供了科学、可靠的依据。

1 仪器和试剂

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站, D-101 大孔吸附树脂(上海骏惠化工有限公司), SK2200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司), METTLER AE240 型电子天平, 电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)。乌金胶囊由第二军医大学东方肝胆外科医院制剂室生产, 0.5 g/粒; 毛蕊异黄酮对照品(纯度>98%, 上海诗丹德生物技术公司); 乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯, 无水乙醇为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBA Bonus-RP (4.6 mm×260 mm, 5 μm); 流速: 1.0 ml/min; 柱

[作者简介] 王 慧, 硕士, 主管药师. E-mail: wang_ehbh@126.com

[通讯作者] 张国庆. E-mail: guoqing_zhang91@126.com

温: 25 ℃; 检测波长: 260 nm; 进样量 10 μl; 流动相: 二元梯度洗脱, 乙腈(A), 水(B)(含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱条件如下: 0~10 min, 25%~45% A; 10~20 min, 45%~60% A。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取毛蕊异黄酮对照品 5.88 mg 置 10 ml 的量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀得浓度为 0.588 mg/ml 储备液, 置 4 ℃ 冰箱保存。

2.2.2 供试品溶液 取 10 粒胶囊内容物混匀, 精密称取 3.00 g 于锥形瓶, 加 60 ml 甲醇, 超声提取 30 min, 过滤, 滤液通过水浴加热浓缩至近干(60 ℃), 浸膏加 5 ml 水分散, 溶解后上 D-101 大孔

吸附树脂柱富集黄酮类成分, 树脂柱用 50 ml 水洗脱后, 继用 70% 乙醇 120 ml 洗脱, 收集洗脱液并回收溶剂至近干, 提取物加 3 ml 甲醇溶解, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液 以相同处方比例, 按乌金胶囊制备工艺制备不含黄芪的阴性样品。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性 按 2.1 项下条件, 以对照品溶液、制剂样品及阴性样品溶液分别进样, 见图 1, 毛蕊异黄酮保留时间 13.9 min, 制剂中其他成分对待测峰无干扰, 分离度大于 1.5, 理论塔板数大于 5 000, 对称因子均在 0.95~1.05 之间。

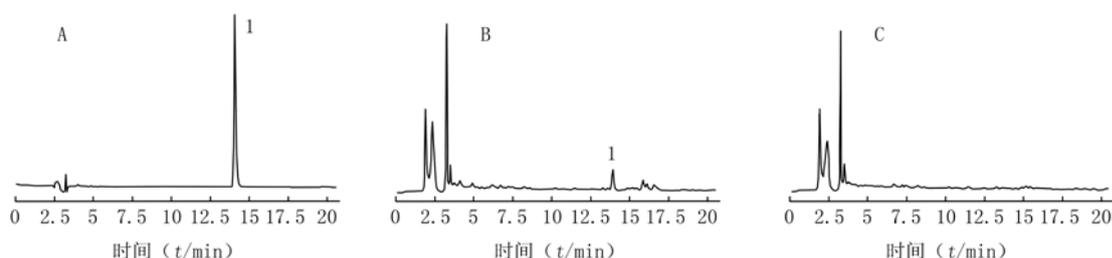


图 1 对照品(A)、供试品(B)和阴性样品(C) HPLC 色谱图

1. 毛蕊异黄酮

2.3.2 检测限及定量限 精密量取毛蕊异黄酮对照品溶液适量, 以信噪比 3 : 1 计, 检测限为 0.254 μg/ml; 以信噪比 10 : 1 计, 定量限为 0.634 μg/ml。

2.3.3 标准曲线及线性 配制毛蕊异黄酮对照品浓度为 7.4、14.7、29.4、58.8、117.6 μg/ml, 以浓度为横坐标(X), 色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程, 毛蕊异黄酮线性回归方程为 $Y = 34.002X - 3.4512$, $r = 1.000$, 在 7.4~117.6 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3.4 精密度 取毛蕊异黄酮对照品浓度为 29.4 μg/ml 溶液在上述色谱条件下重复进样 6 次。结果毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 为 0.21%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性 取乌金胶囊(批号: 20130401), 按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 色谱条件进样, 毛蕊异黄酮的平均含量为 9.20 μg/g, RSD 为 2.50%。结果表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性 取乌金胶囊(批号: 20130401), 按“2.2.2”项下方法制备供试品样品, 分别在 0、4、8、14、24 h 时间间隔, 测定毛蕊异黄酮峰面积, RSD < 2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 加样回收率 取乌金胶囊(批号 20130401) 6 份, 精密称定, 每份 3.00 g, 加入浓度为 0.588 mg/ml 毛蕊异黄酮对照品 0.1 ml, 按“2.2.2”项下方法处理

样品, 按 2.1 色谱条件进样, 计算回收率, 毛蕊异黄酮回收率 95.24%, RSD 为 2.10%。

2.4 样品测定 取不同批次乌金胶囊, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 色谱条件测定峰面积, 根据标准曲线计算 6 批乌金胶囊中毛蕊异黄酮含量, 结果见表 1。

表 1 6 批乌金胶囊中毛蕊异黄酮含量测定结果(n=3)

编号	批号	毛蕊异黄酮含量(μg·g ⁻¹)
1	20111001	9.49
2	20111101	9.64
3	20120801	14.67
4	20130101	12.71
5	20130401	9.26
6	20130501	23.14

3 讨论

3.1 检测对象的选择 2010 年版《中国药典》规定黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定方法^[1], 笔者初始对黄芪中几个黄酮类和皂苷类化合物均进行含量测定, 实验过程中发现毛蕊异黄酮葡萄糖苷等的含量相对较低, 基本达到检测限, 因此最终确定毛蕊异黄酮为检测对象来对乌金胶囊进行质量控制。

(下转第 57 页)

3 讨论

3.1 超声利于醋酸地塞米松溶出 克拉维丁搽剂是以白及溶胶为分散介质的一种制剂,各种药物均以粉末状分散于白及溶胶中,制备供试液时为了充分保证涂剂中醋酸地塞米松的检出,取样后先加入适量甲醇在超声仪上超声约5 min,随后分次加入甲醇超声洗涤烧杯,以使醋酸地塞米松能够从样品中充分提取、溶解。

3.2 析出多糖减小黏附性 克拉维丁搽剂由多种成分组成,其中的白及溶胶具有一定的黏性^[8],多糖是水溶性物质,不溶于甲醇,加入甲醇经超声醋酸地塞米松溶解后,多糖被析出沉淀,用微孔滤膜抽取上清液过滤时则可拦截漂移的沉淀物,减小对色谱柱的黏附性。

3.3 优选流动相缩短保留时间 试验时曾参考文献方法^[5-7]分别以乙腈-水(40:60)、甲醇-水(66:34)为流动相检测,在40 min的相同保留时间内,前者检出率只有86.4%,后者检出率为96.7%,两者在后续进样时在醋酸地塞米松出峰前均有一较大的杂质峰出现,影响分离效果。后来配制甲醇-水-冰醋酸(80:20:0.5)做流动相,使用该流动相检测时平均回收率达到99.3%,峰型对称,无拖尾现象,样

品分离度良好,说明该流动相对样品中醋酸地塞米松洗脱效果好,并能较好地克服样品中因少许多糖的存在保留时间过长的现象。该方法用于克拉维丁搽剂中醋酸地塞米松的含量测定,操作便利、专属性强,结果重现性好。

【参考文献】

- [1] 常明泉,余学英,王正军,等.维地西林涂剂的制备与质量控制[J].儿科药科学杂志,2012,18(11):40-42.
- [2] 韩秀梅.HPLC法测定复合维生素B片中维生素B₁、B₂、B₆的含量[J].中国药事,2012,26(8):891-894.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:316.
- [4] 湖北省食品药品监督管理局.湖北省医疗机构制剂质量汇编(上册)[Z].2009:295-296.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:1120-1121.
- [6] 陈红,朱蓉.复方地塞米松夫西地酸乳膏含量测定[J].中国抗生素杂志,2012,37(12):924-924.
- [7] 黄波,姜武民,吉祥波.复方醋酸地塞米松乳膏含量测定方法的改进[J].实用药物与临床,2011,14(4):311-312.
- [8] 陈芳,常明泉,杜士明,等.不同浓度蒽酮-硫酸试液对白及溶胶含量的影响[J].中国药师,2012,15(11):1604-1605.

[收稿日期] 2014-01-24 [修回日期] 2014-05-23
[本文编辑] 顾文华

(上接第54页)

3.2 大孔吸附树脂条件的优化 乌金胶囊由乌骨藤、郁金、黄芪、延胡索、山楂五味中药组成,成分复杂,杂质干扰较大,D-101大孔吸附树脂是一种聚苯乙烯型非极性树脂,在黄酮的纯化方面已有较多报道。文献表明,其对黄酮类化合物的吸附性能和解吸性能都较好^[6]。故本实验选取该树脂对乌金胶囊中毛蕊异黄酮成分进行富集,分别用30%、50%、70%、95%的乙醇解吸,结果70%的乙醇可以将毛蕊异黄酮完全洗脱下来,因此选取70%的乙醇作为洗脱液。D-101大孔吸附树脂技术具有重复性高、杂质干扰小、有效成分富集明显等优点,可以作为分离、纯化黄酮类化合物的一种有效方法。

3.3 提取溶剂和流动相的选择 笔者以毛蕊异黄酮的含量为指标来选择提取溶剂,采用超声法分别对甲醇、乙醇进行考察,结果表明甲醇的提取效率较高;笔者又分别考察了乙腈-水系统、甲醇-水系统,结果表明,液相条件为乙腈-水(含0.1%甲酸)梯度洗脱,检测波长为260 nm时,系统基线稳定,分离效果良好,图谱各峰峰形较好,灵敏度高。

3.4 样品测定结果 目前对一年半内6批乌金胶

囊中毛蕊异黄酮含量进行测定,结果发现不同批次间含量有一定的差异,可能与黄芪药材采收时间有关联,有必要进行长期的追踪考察,为进一步完善乌金胶囊的质量标准提供依据。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:283-284.
- [2] 贺云彪,黄兰芳,胡伟,等.高效液相色谱测定黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量[J].光谱实验室,2010,27(4):1541-1545.
- [3] 林青,李媛,谭晓梅,等.LC-MS/MS同时测定大鼠血浆中黄芪成分芒柄花素、毛蕊异黄酮和异鼠李素的浓度及其药动学研究[J].中药材,2013,36(4):589-593.
- [4] Chen J, Zhao XG, Ye Y, et al. Estrogen receptor beta-mediated proliferative inhibition and apoptosis in human breast cancer by calycosin and formononetin[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(6):1790-1797.
- [5] Xu YH, Xiong JF, Wang SS, et al. Calycosin entered HUVECs and ameliorated AGEs-promoted cell apoptosis via the Bcl-2 pathway[J]. J Nat Med, 2014, 68(1):163-172.
- [6] 谢娟平. D101大孔树脂纯化犁头草黄酮的研究[J].陕西农业科学, 2010, 56(5):61-63.

[收稿日期] 2014-01-27 [修回日期] 2014-04-11
[本文编辑] 顾文华