

HPLC 法同时测定益心血脂康胶囊中 3 种成分

屠万倩¹, 张留记¹, 徐贞贞²

(1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004; 2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定益心血脂康胶囊(黄芪、三七、川芎)中 3 种成分的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 260 nm (毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素)和 321 nm (阿魏酸); 柱温 35 ℃。**结果** 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸分别在 0.084 4~0.844 0 μg ($r=0.999\ 8$)、0.052 0~0.520 0 μg ($r=0.999\ 1$)、0.043 4~0.434 0 μg ($r=0.999\ 2$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率(RSD, $n=6$) 分别为 99.96% (2.65%)、96.30% (2.31%)、98.50% (2.46%)。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于益心血脂康胶囊的质量控制。

关键词: 益心血脂康胶囊; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花素; 阿魏酸; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)02-0316-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.017

Simultaneous determination of three constituents in Yixin Xuezhikang Capsules by HPLC

TU Wan-qian¹, ZHANG Liu-ji¹, XU Zhen-zhen²

(1. Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of three constituents in Yixin Xuezhikang Capsules (*Astragali Radix*, *Notoginseng Radix et Rhizoma* and *Chuanxiong Rhizoma*).

METHODS The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Agilent C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% formic acid flowing at 1 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 260 nm for calycosin-7-*O*-β-*D*-glucoside and formononetin, and 321 nm for ferulic acid. **RESULTS** Calycosin-7-*O*-β-*D*-glucoside, formononetin and ferulic acid showed good linear relationships within the ranges of 0.084 4–1.688 0 μg ($r=0.999\ 8$), 0.052 0–0.520 0 μg ($r=0.999\ 1$) and 0.043 4–0.434 0 μg ($r=0.999\ 2$), whose average recoveries (RSDs, $n=6$) were 99.96% (2.65%), 96.30% (2.31%) and 98.50% (2.46%), respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Yixin Xuezhikang Capsules.

KEY WORDS: Yixin Xuezhikang Capsules; calycosin-7-*O*-β-*D*-glucoside; formononetin; ferulic acid; HPLC

气虚、血瘀是冠心病心绞痛的主要证候因素之一^[1], 而气虚血瘀型冠心病心绞痛是临床常见证型^[2]。益心血脂康胶囊为河南省中医药研究院附属医院制剂, 由黄芪、三七、川芎经提取制成, 具

有益气活血作用, 用于治疗该证型, 该方药味简单, 疗效显著。方中黄芪主要含有皂苷、黄酮、多糖类成分^[3-4], 其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷等异黄酮具有免疫调节、抗心肌缺

血、清除自由基、保护缺血损伤心肌细胞、抗氧化应激损伤等心血管药理活性^[5-8]；川芎主要含有阿魏酸、川芎嗪、藁本内酯类、萜类等化合物^[9-10]，其中阿魏酸对心肌缺血再灌注损伤、阿霉素诱导心肌损伤、慢性心衰等具有明显的保护作用^[11-13]。

目前，对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素和阿魏酸含有量的测定大多采用 HPLC 法^[14-15]。在益心血脂康胶囊现行质量标准中，除采用 TLC 法对黄芪、三七、川芎进行定性鉴别外，还采用 HPLC 法测定了黄芪甲苷、人参皂苷 R_g₁、Re、Rb₁ 含有量。本实验采用 HPLC 法同时测定益心血脂康胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸含有量，可为更全面科学评价其内在质量提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪，配置 2695 分离单元、2996 二极管阵列检测器、Empower II 色谱工作站软件（美国 Waters 公司）；LIBROR-160DPT 电子天平（万分之一，日本岛津公司）；AE240 电子天平（十万分之一，瑞士 Mettler-Toledo 公司）；SB-5200DT 超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

1.2 试药 毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号 05-1021）对照品购自上海中药标准化研究中心；阿魏酸（批号 110773-201010）、芒柄花素（批号 111703-201203）对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。益心血脂康胶囊（批号 20141010、20141015、20141022）由河南省中医药研究院附属医院制剂室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zobax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.2% 甲酸（B），梯度洗脱（0 ~ 10 min，15% → 25% A；10 ~ 20 min，25% → 55% A，20 ~ 21 min，55% → 15% A）；柱温 35 ℃；体积流量 1 mL/min；检测波长 260 nm（毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素）和 321 nm（阿魏酸）；进样量 10 μL。

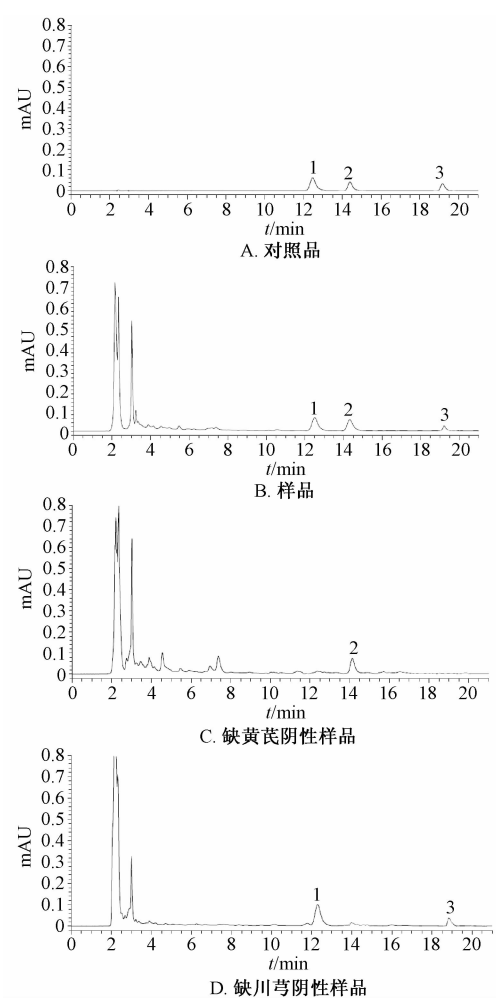
2.2 对照品溶液制备 精密称取各照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 84.4 μg、芒柄花素 52.0 μg、阿魏酸 43.4 μg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 精密称取胶囊内容物 2 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，密塞，

称定质量，超声 30 min，取出，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，取上清液，滤过，取续滤液，即得。

2.4 阴性样品溶液制备 按处方比例制备缺黄芪、川芎的阴性样品，再按“2.3”项下方法制备相应溶液。

2.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下分析，结果见图 1。由图可知，供试品在与对照品色谱相同的保留时间处有吸收峰，阴性无干扰。



1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2. 阿魏酸 3. 芒柄花素
1. calycosin-7-O-β-D-glucoside 2. ferulic acid 3. formononetin

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μL，注入色谱仪，以进样量（μg）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 3 种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of three constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 2.80 \times 10^6 X + 3.26 \times 10^4$	0.999 8	0.084 4 ~ 0.844 0
芒柄花素	$Y = 1.48 \times 10^6 X + 1.42 \times 10^4$	0.999 1	0.052 0 ~ 0.520 0
阿魏酸	$Y = 4.96 \times 10^6 X + 2.68 \times 10^4$	0.999 2	0.043 4 ~ 0.434 0

2.7 精密度试验 取“2.2”项下对照品溶液 10 μL ，重复进样 6 次，测定峰面积，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸峰面积 RSD ($n=6$) 分别为 1.29%、2.31%、1.43%，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取“2.3”项下同一供试品溶液 10 μL ，于 0、2、4、6、8、10 h 测定，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸峰面积 RSD ($n=6$) 分别为 2.48%、2.67%、2.07%，

表 2 加样回收率试验结果 ($n=6$)

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

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/% (RSD/%)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.999 3	0.582	0.410	0.985	98.29	99.96 (2.65)
	0.998 5	0.581	0.410	1.002	102.68	
	1.000 3	0.582	0.410	0.982	97.56	
	0.998 4	0.581	0.410	0.980	97.32	
	0.998 2	0.581	0.410	1.005	103.41	
	1.006 8	0.586	0.410	0.998	100.49	
芒柄花素	0.999 3	0.115	0.126	0.235	95.24	96.30 (2.31)
	0.998 5	0.115	0.126	0.236	96.03	
	1.000 3	0.115	0.126	0.242	100.79	
	0.998 4	0.115	0.126	0.235	95.24	
	0.998 2	0.115	0.126	0.235	95.24	
	1.006 8	0.116	0.126	0.236	95.24	
阿魏酸	0.999 3	0.265	0.244	0.504	97.95	98.50 (2.46)
	0.998 5	0.265	0.244	0.508	99.59	
	1.000 3	0.265	0.244	0.516	102.87	
	0.998 4	0.265	0.244	0.500	96.31	
	0.998 2	0.265	0.244	0.501	96.72	
	1.006 8	0.267	0.244	0.505	97.54	

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

表 3 含有量测定结果 ($n=3$)

Tab. 3 Results of content determination ($n=3$)

批号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	芒柄花素/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	阿魏酸/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
20141010	0.459	0.088	0.254
20141015	0.582	0.115	0.265
20141022	0.527	0.100	0.247

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择 根据毛蕊异黄酮

表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一份样品（批号 20141015），按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸含有量 RSD 分别为 1.82%、2.95%、2.57%，表明该方法重复性较好。

2.10 加样回收率试验 精密称取含有量已知的同一批样品（批号 20141015）6 份，每份 1 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入含有 82.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、25.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芒柄花素、48.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿魏酸的对照品溶液 5 mL，以及甲醇 20 mL，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项条件下测定，计算回收率，结果见表 2。

葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸的理化性质，选择甲醇作为提取溶剂，比较了不同提取方式（超声提取和回流提取）、提取时间（20、30、50 min）和溶剂用量（5、12.5、25 倍）对 3 种成分提取率的影响，发现提取方式、提取时间、溶剂用量对其均无显著影响，但回流提取时供试品溶液中的杂质峰明显高于超声提取。因此，最终确定了本实验中的供试品溶液制备方法。

3.2 流动相及测定波长选择 参考文献 [16]，选择乙腈（A）-0.2% 甲酸（B）作为流动相，并对其进行优化，最终确定为“2.1”项下洗脱程

序,此时 3 种成分峰型对称,与相邻峰分离度较好,基线稳定。另外,经全波长扫描发现,毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素在 260 nm、阿魏酸在 321 nm 波长处有强吸收,故建立了波长切换的检测方法。

3.3 结果分析 本实验建立了 HPLC 法同时测定益心血脂康胶囊中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸含有量的方法,其简便、快捷、准确、重复性好,能为该药物全面质量评价和有效性研究提供参考依据。研究表明^[17-19],在治疗冠心病心绞痛的中成药制剂中,黄芪和川芎经常以药对形式出现,而且两者主要有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和阿魏酸配伍后,表现出对内皮细胞缺氧损伤保护、改善血虚动物造血功能等药理活性^[20-21],故该方法还可用于含黄芪和川芎复方制剂中上述成分的定量控制及这一药对的深入探索。

参考文献:

[1] 衷敬柏,董绍英,王 阶,等. 2689 例冠心病心绞痛证候要素的文献统计分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 100-101.

[2] 张秋雁,邓冰湘. 冠心病心绞痛临床中医证型分布的回顾性分析[J]. 中医研究, 2005, 18(11): 23-24.

[3] 陈建真,吕圭源,叶 磊,等. 黄芪黄酮的化学成分与药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1314-1316.

[4] 张亚洲,徐 风,梁 静,等. 蒙古黄芪中异黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3243-3248.

[5] 张冬青,汪德清. 黄芪总黄酮生物学活性作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 253-256.

[6] 徐 璐,李艳明,刘婧陶,等. 黄芪总黄酮对小鼠免疫功能的影响[J]. 动物医学进展, 2013, 34(11): 36-39.

[7] 王敏杰,金 蓉,李慧芳. 黄芪总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中南药学, 2015, 13(2):

147-150.

[8] 李 健,韩 林,马玉芳,等. 黄芪 3 种成分对 Chang Liver 细胞氧化应激的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 318-323.

[9] 常新亮,马云保,张雪梅,等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(15): 1533-1536.

[10] 杨丽红,谢秀琼,万 丽,等. 川芎化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1576-1577.

[11] 杨家荣,张密霞,常亮堂,等. 川芎嗪、阿魏酸及其配伍对心肌缺血再灌注模型大鼠的保护作用及对黏附分子的影响[J]. 中草药, 2008, 39(7): 1054-1056.

[12] 吴枝娟,余 婧,王瑞幸,等. 阿魏酸预处理对阿霉素诱导 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1059-1065.

[13] 蔡珊珊,邓淑珍,王瑞耕,等. 阿魏酸对慢性心力衰竭小鼠心室胶原重构的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2012, 41(6): 684-687.

[14] 周 倩,李 莹,戴衍朋,等. RP-HPLC 法测定黄芪及玉屏风颗粒中 4 种异黄酮类成分[J]. 中成药, 2014, 36(8): 1674-1677.

[15] 赵 辉,武晓红,蒲晓辉. HPLC 法同时测定天舒胶囊中阿魏酸和天麻素[J]. 中成药, 2014, 36(1): 111-114.

[16] 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: 302.

[17] 林 飞,王 阶,郭丽丽,等. 《中华人民共和国药典》收载治疗冠心病心绞痛中成药配伍规律分析[J]. 中医杂志, 2013, 54(18): 1596-1599.

[18] 龙 钢,王宗仁. 益气活血法治疗冠心病心绞痛研究近况[J]. 中国中医急救, 2009, 18(2): 271-272.

[19] 刘庆林. 川芎药对的临床应用解析[J]. 中医医学刊, 2004, 22(9): 1730-1731.

[20] 杨丽红,谢秀琼,周 鹏,等. 川芎、黄芪有效成分配伍对缺血脑微血管内皮细胞的影响[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1326-1332.

[21] 宁 炼,陈长勋,金若敏,等. 当归补血汤促进造血功能的成分及其作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 50-53.