

## HPLC 法测定芪贞慢咽宁颗粒中木蝴蝶苷 B

赵 静, 何倩灵, 姚仲青, 谭 琴  
扬子江药业集团有限公司, 江苏 南京 210049

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法测定芪贞慢咽宁颗粒中木蝴蝶苷 B。方法 采用 Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1%磷酸 (38:62), 检测波长 276 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL。结果 木蝴蝶苷 B 在 0.064 6~1.292 0 μg 与峰面积线性关系良好。木蝴蝶苷 B 平均回收率为 100.67%, RSD 值为 1.12%。结论 本法测定快速、结果准确、重复性好、专属性强, 可用于测定芪贞慢咽宁颗粒中木蝴蝶苷 B。

**关键词:** 芪贞慢咽宁颗粒; 木蝴蝶苷 B; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)09-1335-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.09.005

## Determination of oroxin B in Qizhen Manyanning Granules by HPLC

ZHAO Jing, HE Qian-ling, YAO Zhong-qing, TAN Qin  
Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd, Nanjing 210049, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method to determine oroxin B in Qizhen Manyanning Granules. **Methods** The determination was carried out on Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol - 0.1% phosphoric acid (38 : 62), and UV detection wavelength was set at 276 nm. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 30 ℃ with the injection volume of 5 μL. **Results** There was a good linear relationship between peak area and the content of oroxin B in the rang of 0.064 6 —1.292 0 μg. The average recovery of oroxin B was 100.67% with RSD 1.12%. **Conclusion** The method is rapid, accurate and reproducible for the quantification of oroxin B in Qizhen Manyanning Granules.

**Key words:** Qizhen Manyanning Granules; oroxin B; HPLC

芪贞慢咽宁颗粒是江苏省名中医研制的中药复方制剂, 处方由黄芪、制女贞子、白术(炒)、木蝴蝶等 7 味药材组成, 具有滋阴、养阴益气、生津润燥的功效, 用于气阴两虚、津亏失润而致的慢性咽炎, 临床常见咽喉肿痛、痰咳不利。木蝴蝶具有清肺利咽、疏肝和胃的功效<sup>[1]</sup>, 为方中主要组分。木蝴蝶中以黄酮及其苷类成分为主, 许多成分在黄芩中都已经发现过, 但木蝴蝶苷 B 在黄芩和其他植物中没有发现过<sup>[2]</sup>, 为木蝴蝶专属性成分<sup>[3]</sup>。近年来, 有文献报道木蝴蝶苷 B 在体内外都具有很好的抗淋巴瘤效应, 低剂量的木蝴蝶苷 B 能够有效地抑制淋巴瘤细胞生长, 显著降低淋巴瘤细胞的致瘤性, 但对细胞周期和凋亡均无明显影响, 作用机制不同于常用抗癌化疗药物的机制<sup>[4-5]</sup>。张昌壮等采用 HPLC 法测定木蝴蝶中木蝴蝶苷 A 和木蝴蝶苷 B<sup>[6]</sup>, 李慧

等<sup>[7]</sup>采用 HPLC 法测定木蝴蝶配方颗粒中木蝴蝶苷 B 和黄芩苷。《中国药典》2015 年版一部首次以木蝴蝶苷 B 作为木蝴蝶药材的测定指标, 并规定其限度<sup>[1]</sup>。因此本研究建立 HPLC 法测定芪贞慢咽宁颗粒中木蝴蝶专属性成分木蝴蝶苷 B, 并将其作为评价芪贞慢咽宁颗粒质量控制指标之一, 为制剂质量评价提供依据。

### 1 仪器与材料

Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司), Mettler Toledo XS205DU Dual Range 型分析天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司), KH-700DB 型数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司), GWA-UN2-C30 型超纯水器 (北京普析通用仪器有限公司)。

木蝴蝶苷 B 对照品 (批号 111915-201202) 由

收稿日期: 2016-07-19

作者简介: 赵 静 (1982—), 女, 硕士, 工程师, 主要从事药物质量标准研究。Tel:(025)58616112 E-mail: judy.1010@163.com

中国食品药品检定研究院提供；芪贞慢咽宁颗粒由扬子江药业集团有限公司生产，规格 10 g/袋，产品批号分别为 15090641、15091441、15091641；甲醇、磷酸均为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯试剂。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相甲醇-0.1%磷酸 (38:62)，检测波长 276 nm，体积流量 1.0 mL/min，柱温 30 °C，进样量 5 μL。理论塔板数按木蝴蝶苷 B 峰计算应不低于 2 000。

### 2.2 对照品溶液的制备

取木蝴蝶苷 B 对照品 12 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 50% 甲醇溶解，并稀释至刻度，摇匀，即得对照品储备液；精密吸取上述溶液 5 mL，置 20 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释，并定容至刻度，摇匀，即得对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取芪贞慢咽宁颗粒适量，研细，取约 1.5 g，精密称定，加 50% 甲醇 25 mL，称定质量，超声处理 (功率 100 W，频率 40 kHz) 20 min，放冷，再称定质量，用 50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

### 2.4 阴性样品溶液的制备

按处方比例称取缺木蝴蝶处方药材，按工艺方法制备缺木蝴蝶阴性样品，按供试品溶液的制备项下方法操作制备阴性样品溶液。

### 2.5 线性范围考察

分别精密吸取木蝴蝶苷 B 对照品储备液 0.5、1、2、3、5、7、10 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释，并加至刻度，摇匀，即得系列质量浓度的对照品溶液。按以上色谱条件进样测定峰面积值。以木蝴蝶苷 B 峰面积值为纵坐标，质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，进行线性回归处理，得回归方程  $Y=11.802 X-2.113$  ( $r=0.999 0$ )。结果表明木蝴蝶苷 B 在 0.064 6~1.292 0 μg 与峰面积的线性关系良好。

### 2.6 专属性试验

分别量取适量阴性样品溶液、对照品溶液和供试品溶液，按以上色谱条件测定，结果阴性样品溶液在与木蝴蝶苷 B 对照品色谱峰相同保留时间处无色谱峰，故认为无干扰，见图 1。

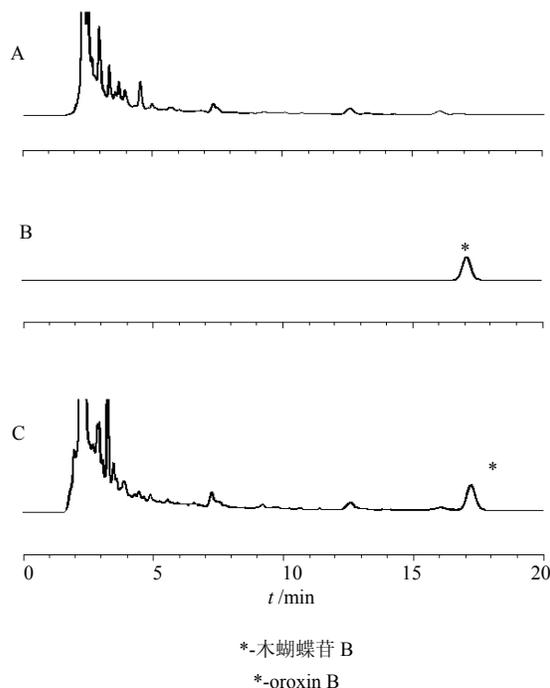


图 1 缺木蝴蝶的阴性样品 (A)、木蝴蝶苷 B 对照品 (B) 和芪贞慢咽宁颗粒 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample without *Oroxylis Semen*, oroxin B reference substance (B), and Qizhen Manyanning Granules (C)

### 2.7 精密度试验

取批号 15091441 芪贞慢咽宁颗粒样品，制备供试品溶液，连续进样 6 次，记录木蝴蝶苷 B 色谱峰面积，结果木蝴蝶苷 B 峰面积的 RSD 值为 0.27%。

### 2.8 稳定性试验

取批号 15091441 芪贞慢咽宁颗粒样品，制备供试品溶液，置室温下，分别于 0、2、4、6、8、10、12、18、24 h 进样测定峰面积。结果木蝴蝶苷 B 峰面积的 RSD 值为 0.43%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

### 2.9 重复性试验

取批号 15091441 芪贞慢咽宁颗粒 6 份，制备供试品溶液，进样测定，记录木蝴蝶苷 B 峰面积。结果样品中木蝴蝶苷 B 的平均质量分数为 1.14 mg/g，RSD 值为 0.51%。

### 2.10 回收率试验

采用加样回收率法。取批号 15091441 芪贞慢咽宁颗粒样品 0.75 g，精密称取 6 份，分别精密加入 0.2395 mg/mL 木蝴蝶苷 B 对照品储备液 4 mL，制备供试品溶液，进样测定，计算回收率。结果平均

回收率为 100.67%，RSD 值为 1.12%。

### 2.11 样品测定

对不同批次的芪贞慢咽宁颗粒进行处理，制备供试品溶液，进样测定，按外标法以峰面积计算木蝴蝶苷 B 的平均质量分数，结果见表 1。

表 1 芪贞慢咽宁颗粒中木蝴蝶苷 B 的测定结果 (n = 3)  
Table 1 Determination of oroxin B in Qizhen Manyanning Granules (n = 3)

批号	木蝴蝶苷 B/ (mg·g <sup>-1</sup> )
15090641	1.34
15091441	1.11
15091641	1.22

## 3 讨论

### 3.1 供试品溶液的制备前处理方法选择

考察 50%、80%、100% 甲醇为溶剂提取制备供试品溶液，结果显示不同体积分数甲醇制备得到的供试品溶液中木蝴蝶苷 B 峰型、分离度无明显差异，低体积分数甲醇的目标峰理论塔板数稍高，故选定 50% 甲醇为提取溶剂。

比较加热回流 30 min 和超声 30 min 以及分别超声 20、30、40 min，均测 2 份样品取平均值。结果回流 30 min 和超声 30 min 测定的蝴蝶苷 B 质量分数分别为 0.99、1.01 mg/g。超声 20、30、40 min 测定的蝴蝶苷 B 质量分数分别为 1.01、1.01、1.02 mg/g。结果表明，超声和回流处理对木蝴蝶苷 B 测定结果无明显差异，且超声不同时间对其测定结果影响不大。因此供试品溶液的制备直接超声 20 min 即可。

### 3.2 色谱条件的选择

《中国药典》2015 年版一部木蝴蝶药材中木蝴蝶苷 B 的 HPLC 测定所用流动相为甲醇 - 水 - 磷酸 (42 : 58 : 0.2) [1]。但芪贞慢咽宁颗粒为复方制剂，成分较多，采用甲醇 - 水 - 磷酸 (42 : 58 : 0.2) 不

能达到基线分离。经反复试验，当甲醇、0.1% 磷酸水溶液比例为 38 : 62 时，木蝴蝶苷 B 峰型较好，保留时间适中，分离度大于 1.5，且低体积分数的酸溶液对色谱柱有较好的保护作用。实验中考察 3 根不同品牌色谱柱对样品测定结果和分离效果的影响，分别为 Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。不同品牌色谱柱测得的木蝴蝶苷 B 平均质量分数均为 1.19 mg/g，RSD 值为 2.53%。结果显示采用 3 种品牌色谱柱所得木蝴蝶苷 B 峰位均能达到有效分离，其中采用 Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱所得木蝴蝶苷 B 峰理论塔板数较高、保留时间短，且峰形对称性好。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 64.
- [2] 殷文光, 李曼玲, 康 琛. 木蝴蝶的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1965-1969.
- [3] 李曼玲, 康 琛, 张 强, 等. 中药材木蝴蝶专属性成分木蝴蝶苷 B 的提取分离及质量标准研究 [C]. 中华中医药学会第十届中药鉴定学术会议论文集. 咸阳: 中华中医药学会, 2010: 491-507.
- [4] 傅士龙. 中草药单体木蝴蝶苷 B 介导的抗恶性淋巴瘤的新策略和机制探讨 [D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [5] Yang P, Fu S, Cao Z, *et al.* Oroxin B selectively induces tumor-suppressive ER stress and concurrently inhibits tumor-adaptive ER stress in B-lymphoma cells for effective anti-lymphoma therapy [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 288(2): 269-279.
- [6] 张昌壮, 张培旭, 姚 华, 等. HPLC 法测定木蝴蝶中木蝴蝶苷 A 和木蝴蝶苷 B 的质量分数 [J]. 吉林大学学报: 理学版, 2013, 51(2): 321-324.
- [7] 李 慧, 魏 梅, 陈向东. HPLC 法同时测定木蝴蝶配方颗粒中木蝴蝶苷 B 和黄芩苷的质量分数 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 713-716.