

## HPLC 法测定康复春口服液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷和人参皂苷 Rb<sub>1</sub>

韩明阳<sup>1</sup>, 王雪梅<sup>2</sup>, 李媛媛<sup>3</sup>, 孟宪丽<sup>4\*</sup>

1. 河南省人民医院 胃肠外科, 河南 郑州 450000
2. 河南省人民医院 中医科, 河南 郑州 450000
3. 河南省人民医院 生殖中心, 河南 郑州 450000
4. 河南省人民医院 药学部, 河南 郑州 450000

**摘要:** 目的 建立 HPLC 同时测定康复春口服液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷和人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的方法。方法 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.2% 甲酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长 254 nm (0~30 min, 检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素)、210 nm (30~36 min, 检测黄芪甲苷) 和 203 nm (36~50 min, 检测人参皂苷 Rb<sub>1</sub>); 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量为 20 μL。结果 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 分别在 3.29~82.25 μg/mL ( $r=0.999\ 1$ )、4.77~119.25 μg/mL ( $r=0.999\ 8$ )、4.16~104.00 μg/mL ( $r=0.999\ 2$ )、11.33~283.25 μg/mL ( $r=0.999\ 7$ )、7.39~184.75 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ )、2.05~51.25 μg/mL ( $r=0.999\ 5$ ) 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 97.98%、98.45%、97.38%、99.72%、98.67%、96.99%, RSD 值分别 0.91%、1.41%、0.78%、1.09%、1.22%、0.85%。结论 方法专属性强, 结果准确, 重复性好, 为更好地评价康复春口服液的质量提供参考。

**关键词:** 康复春口服液; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 黄芪甲苷; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 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(2018)01 - 0037 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.009

## Determination of calycosin7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and ginsenoside Rb<sub>1</sub> in Kangfuchun Oral Liquid by HPLC

HAN Ming-yang<sup>1</sup>, WANG Xue-mei<sup>2</sup>, LI Yuan-yuan<sup>3</sup>, MENG Xian-li<sup>4</sup>

1. Department of Gastrointestinal Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China
2. Department of Traditional Chinese Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China
3. Department of Reproductive Center, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China
4. Department of Pharmacy, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China

**Abstract: Objective** To develop an HPLC method for simultaneous determination of calycosin7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and ginsenoside Rb<sub>1</sub> in Kangfuchun Oral Liquid. **Methods** The determination was carried out on Diamonsil C<sub>18</sub> chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% formic acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 254 nm in 0 — 30 min to determine calycosin7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, ononin, calycosin, and formononetin, 210 nm in 30 — 36 min to determine astragaloside IV, and 203 nm in 36 — 50 min to determine ginsenoside Rb<sub>1</sub>. The flow rate was 0.8 mL/min, temperature of column was set at 30 °C, and volume of injection was 20 μL. **Results** The linear range of calycosin7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and ginsenoside Rb<sub>1</sub> were 3.29 — 82.25 μg/mL ( $r=0.999\ 1$ ), 4.77 — 119.25 μg/mL ( $r=0.999\ 8$ ), 4.16 — 104.00 μg/mL ( $r=0.999\ 2$ ), 11.33 — 283.25 μg/mL ( $r=0.999\ 7$ ), 7.39 — 184.75 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 2.05 — 51.25 μg/mL ( $r=0.999\ 5$ ), respectively. The average recoveries were 97.98%, 98.45%, 97.38%, 99.72%, 98.67%, and 96.99%, respectively. The corresponding

收稿日期: 2017-09-22

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (201403190)

作者简介: 韩明阳 (1980—), 男, 河南南阳人, 副主任医师, 硕士, 研究方向为胃肠外科。Tel: 15093260033 E-mail: yang07641@126.com

\*通信作者 孟宪丽 (1967—), 女, 硕士, 副主任药师, 从事药物质量控制等医院药学研究工作。Tel: 13526782721 E-mail: zhaolt3979@163.com

RSD values were 0.91%, 1.41%, 0.78%, 1.09%, 1.22%, and 0.85%, respectively. **Conclusion** The method has strong specificity, accurate results, and good reproducibility which can provide a reference for quality of Kangfuchun Oral Liquid.

**Key words:** Kangfuchun Oral Liquid; calycosin7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside; ononin; calycosin; formononetin; astragaloside IV; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; HPLC

康复春口服液是由黄芪、人参、玉竹和蜂王浆 4 味中药加工而成的中药复方制剂, 具有益气固表、养心安神、健脾和胃的功效, 临床上主要用于心脾俱虚、饮食少思、腹胀腹满、少气乏力、心慌心悸、精神倦怠、失眠等病症的治疗。康复春口服液收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第 20 册, 现行标准控制项目简单, 未对方中的任何一个成分进行定量检测研究<sup>[1]</sup>。彭善贵等<sup>[2]</sup>对康复春口服液进行了黄芪、人参定性鉴别以及黄芪甲苷定量测定; 李永华<sup>[3]</sup>对其中的黄芪甲苷进行了测定。因此本实验采用 HPLC 波长切换法对康复春口服液中黄芪指标性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷和人参的指代表性成分人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 进行了同时测定, 为更好地评价康复春口服液的质量提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters); AB135-S 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ3200V 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

康复春口服液 (规格 10 mL/支, 批号 20160805、20161102、20170101) 购自湖南省回春堂药业有限公司; 甲醇和乙腈为色谱纯, 甲酸为分析纯; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、芒柄花素 (批号 111703-201504, 质量分数 100.0%)、黄芪甲苷 (批号 110781-201616, 质量分数 97.4%)、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (批号 110704-201625, 质量分数 95.0%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 芒柄花苷 (批号 486-62-4, 质量分数 98.0%)、毛蕊异黄酮 (批号 20575-57-9, 质量分数 98.0%) 对照品均购自上海纯优生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈 (A) - 0.2% 甲酸溶液 (B),

梯度洗脱<sup>[4-5]</sup> (0~14 min, 35.0% A; 14~36 min, 35.0%→46.0% A; 36~43 min, 46.0%→55.0% A; 43~50 min, 55.0%→35.0% A); 检测波长 254 nm (0~30 min, 检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素)<sup>[6]</sup>、210 nm (30~36 min, 检测黄芪甲苷)<sup>[7-8]</sup>和 203 nm (36~50 min, 检测人参皂苷 Rb<sub>1</sub>)<sup>[8-11]</sup>; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 进样量为 20  $\mu$ L。

### 2.2 溶液的制备

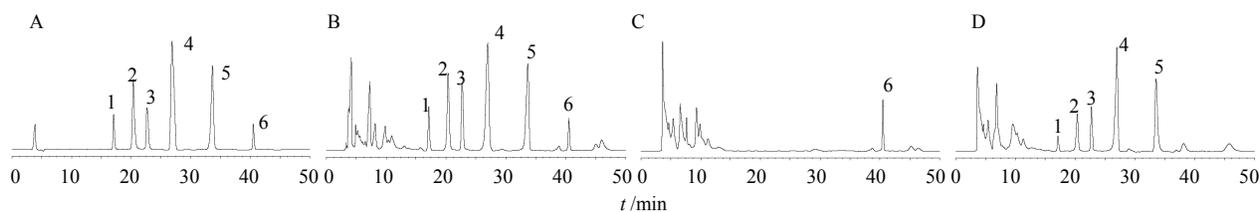
**2.2.1 供试品溶液的制备** 精密吸取康复春口服液 5.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品适量, 用甲醇制成单一质量浓度的对照品储备液 (毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.658 mg/mL、芒柄花苷 0.954 mg/mL、毛蕊异黄酮 0.832 mg/mL、芒柄花素 2.266 mg/mL、黄芪甲苷 1.478 mg/mL、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 0.410 mg/mL)。依次量取各对照品储备液 2.5、2.5、2.5、2.5、2.5、1.0 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液 (毛蕊异黄酮葡萄糖苷 32.9  $\mu$ g/mL、芒柄花苷 47.7  $\mu$ g/mL、毛蕊异黄酮 41.6  $\mu$ g/mL、芒柄花素 113.3  $\mu$ g/mL、黄芪甲苷 73.9  $\mu$ g/mL、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 8.2  $\mu$ g/mL)。

**2.2.3 阴性对照溶液的制备** 按康复春口服液的质量标准中处方和生产工艺, 分别制备缺黄芪、人参的阴性样品, 按照 2.2.1 项下法制备缺黄芪、人参的阴性供试品溶液。

### 2.3 专属性试验

分别取缺黄芪阴性供试品溶液、缺人参阴性供试品溶液、混合对照品溶液和康复春口服液供试品溶液, 依法进行测定, 记录色谱峰, 见图 1。结果显示, 阴性样品对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的测定无干扰, 所测各成分的色谱峰理论塔板数均不低于 3 500, 分离度大于 1.5。



1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2-芒柄花苷 3-毛蕊异黄酮 4-芒柄花素 5-黄芪甲苷 6-人参皂苷 Rb<sub>1</sub>  
 1-calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside 2-ononin 3-calycosin 4-formononetin 5-astragaloside IV 6-ginsenoside Rb<sub>1</sub>

图1 混合对照品(A)、康复春口服液(B)、缺黄芪阴性样品(C)和缺人参阴性样品(D)的HPLC图谱  
 Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Kangfuchun Oral Liquid (B), negative sample without *Astragalus Radix* (C), and negative sample without *Ginseng Radix et Rhizoma* (D)

### 2.4 线性关系考察

分别精密吸取各对照品储备液 2.5 mL, 置于 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得线标溶液 a。精密量取线标溶液 a 各适量, 分别用甲醇稀释 5、10、15、20、25 倍, 分别制成线标溶液 b、

c、d、e、f。依次取线标溶液 f、e、d、c、b、a 进样测定峰面积值。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 峰面积作为纵坐标, 所测各成分质量浓度作为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程, 见表 1。

表 1 各成分线性关系

Table 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=3.993\ 6\times 10^5 X-354.3$	0.999 1	3.29~82.25
芒柄花苷	$Y=5.831\ 5\times 10^5 X+211.7$	0.999 8	4.77~119.25
毛蕊异黄酮	$Y=6.012\ 9\times 10^5 X+179.3$	0.999 2	4.16~104.00
芒柄花素	$Y=3.547\ 3\times 10^5 X-402.8$	0.999 7	11.33~283.25
黄芪甲苷	$Y=4.619\ 7\times 10^5 X+155.7$	0.999 9	7.39~184.75
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	$Y=8.095\ 4\times 10^5 X+276.4$	0.999 5	2.05~51.25

### 2.5 精密度试验

取混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的峰面积, 结果所测各成分峰面积的 RSD 值分别为 1.01%、0.82%、1.18%、0.60%、0.92%、1.49%。

### 2.6 重复性试验

取批号 20160805 康复春口服液 6 份, 制备供试品溶液, 进行测定, 分别计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的质量浓度, 结果所测 6 个成分质量浓度的 RSD 值分别为 1.46%、0.93%、0.75%、1.11%、1.27%、0.96%。

### 2.7 稳定性试验

取批号 20160805 康复春口服液样品制备的同一供试品溶液, 于室温下 0、2、4、6、8、12 h 依法进样测定, 记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、

毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的峰面积值, 结果康复春口服液供试品溶液室温下 12 h 内稳定, 所测各成分峰面积的 RSD 值分别为 1.32%、0.76%、0.99%、1.13%、0.46%、0.84%。

### 2.8 回收率试验

精密吸取批号 20160805 康复春口服液 9 份, 每份 2.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入混合对照品溶液 (毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.429 mg/mL、芒柄花苷 0.671 mg/mL、毛蕊异黄酮 0.574 mg/mL、芒柄花素 1.634 mg/mL、黄芪甲苷 0.906 mg/mL、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 0.122 mg/mL) 0.5、1.0、1.5 mL, 各 3 份, 制备供试品溶液, 依法进样测定, 计算得所测 6 个成分的平均加样回收率分别为 97.98%、98.45%、97.38%、99.72%、98.67%、96.99%, RSD 值分别为 0.91%、1.41%、0.78%、1.09%、1.22%、0.85%。

### 2.9 样品测定

取批号 20160805、20161102、20170101 康复春

口服液, 制备供试品溶液, 依法进样测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、

黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的峰面积, 采用外标法计算所测各成分的质量浓度, 结果见表 2。

表 2 康复春口服液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷和人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and ginsenoside Rb<sub>1</sub> in Kangfuchun Oral Liquid (n = 3)

批号	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )					
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	黄芪甲苷	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>
20160805	0.171	0.267	0.229	0.656	0.364	0.049
20161102	0.183	0.282	0.259	0.614	0.329	0.054
20170101	0.156	0.230	0.211	0.708	0.401	0.042

### 3 讨论

#### 3.1 流动相的选择

在实验过程中首先参考《中国药典》2015 年版一部黄芪、人参药材项下检测用流动相, 初步选用乙腈 - 水流动相体系<sup>[7-11]</sup>, 结果显示所检测成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素达不到有效的分离, 且基线不平稳, 噪声大。在此实验基础上, 又分别对比考察了乙腈 - 0.1%甲酸溶液流动相体系<sup>[6]</sup>、乙腈 - 0.2%甲酸溶液流动相体系<sup>[5,8]</sup>、乙腈 - 0.2%磷酸溶液流动相体系<sup>[4]</sup>, 同时对流动相的比例进行了摸索, 最终选择乙腈 - 0.2%甲酸溶液作为流动相, 并进行梯度洗脱 (0~14 min, 35.0% A; 14~36 min, 35.0%→46.0% A; 36~43 min, 46.0%→55.0% A; 43~50 min, 55.0% → 35.0% A), 对康复春口服液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 进行同时测定。

#### 3.2 耐用性试验

取供试品溶液, 选用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Venusil MP C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行检测, 记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的峰面积, 并计算这 6 个成分峰面积的 RSD 值为 1.06%、1.13%、1.20%、0.81%、0.97%、1.47%。结果表明本方法耐用性强。

本实验建立了同时测定康复春口服液中多种成分的方法, 采用波长转换联合梯度洗脱法, 检测时间短, 准确度高, 操作简便。所测 6 个组分分离效果好, 线性关系良好, 重复性好, 耐用性强, 为康

复春口服液的质量控制提供参考。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第二十册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 310.
- [2] 彭善贵, 文永盛. 康复春口服液质量标准研究 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(24): 47-48, 50.
- [3] 李永华. HPLC-ELSD 法测定康复春口服液中黄芪甲苷的含量 [J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(15): 286-287.
- [4] 王波, 周围, 刘小花, 等. 基于超高效合相色谱对黄芪中 5 种主要黄酮类化合物的快速检测 [J]. 分析化学, 2016, 44(5): 731-739.
- [5] 蒲清荣, 黄锐, 赵剑, 等. HPLC 法测定不同主产地黄芪饮片的 4 种黄酮的含量 [J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(3): 63-65.
- [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] 宋成英, 封加福. HPLC 同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 115-117.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 302-303, 8-9.
- [9] 陈驰, 关琴笑, 朱冬宁, 等. 一测多评法测定人参中 9 种人参皂苷的含量 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 122-126.
- [10] 郭冲, 郜玉钢, 臧埔, 等. HPLC 法同时测定人参及其制剂中 16 种人参皂苷 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2009-2013.
- [11] 李乐, 张春阁, 李小沛, 等. 不同时期人参、西洋参根中单体皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub> 含量的比较 [J]. 特产研究, 2017, (2): 38-41, 46.