

## HPLC 法测定益坤宁酊中梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮

辛振杰<sup>1</sup>, 李庆国<sup>2\*</sup>

1. 罗定市中医院 药学部, 广东 罗定 527200
2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 建立 HPLC 波长切换法测定益坤宁酊中梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮的方法。方法 采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相 A: 乙腈 - 甲醇 (1 : 3), 流动相 B: 0.2%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长 210 nm (梓醇)、330 nm (麦角甾苷、马替诺皂苷) 和 230 nm (氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、 $\alpha$ -香附酮); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ L。结果 梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮在 2.66~66.50、1.59~39.75、0.76~19.00、1.38~34.50、7.02~175.50、9.91~247.75、1.19~29.75  $\mu$ g/mL 线性关系良好。平均加样回收率分别为 97.97%、98.31%、96.99%、97.78%、99.28%、100.03%、97.43%, RSD 值分别为 1.42%、0.92%、1.30%、1.13%、1.08%、0.65%、1.27%。结论 本法操作便捷、数据准确、灵敏度高, 重复性好, 可为益坤宁酊的质量控制提供参考。

**关键词:** 益坤宁酊; 梓醇; 麦角甾苷; 马替诺皂苷; 氧化芍药苷; 芍药内酯苷; 芍药苷;  $\alpha$ -香附酮; 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)08 - 1875 - 04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.08.004

## Determination of catalpol, acteoside, martiniside, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin and $\alpha$ -cyperone in Yikunning Tincture by HPLC

XIN Zhen-jie<sup>1</sup>, LI Qing-guo<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Luoding Hospital of Traditional Chinese Medicine, Luoding 527200, China
2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To develop an HPLC with wavelength switching method for determination of catalpol, acteoside, martiniside, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin and  $\alpha$ -cyperone in Yikunning Tincture. **Methods** The separation was performed on Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m). The mobile phase consisted of mobile phase A acetonitrile - methanol (1 : 3) and mobile phase B 0.2% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 210 nm (catalpol), 330 nm (acteoside and martiniside), and 230 nm (oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, and  $\alpha$ -cyperone). The flow rate was 0.8 mL/min, temperature of column was set at 25  $^{\circ}$ C, and volume of injection was 10  $\mu$ L. **Results** The linear ranges of catalpol, acteoside, martiniside, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, and  $\alpha$ -cyperone were 2.66 — 66.50, 1.59 — 39.75, 0.76 — 19.00, 1.38 — 34.50, 7.02 — 175.50, 9.91 — 247.75, and 1.19 — 29.75  $\mu$ g/mL, respectively. The average recoveries were 97.97%, 98.31%, 96.99%, 97.78%, 99.28%, 100.03%, and 97.43% with RSD 1.42%, 0.92%, 1.30%, 1.13%, 1.08%, 0.65%, and 1.27%, respectively. **Conclusion** The method is convenient, accurate, sensitive, and reproducible, which can provide reference for quality control of Yikunning Tincture.

**Key words:** Yikunning Tincture; catalpol; acteoside; martiniside; oxypaeoniflorin; albiflorin; paeoniflorin;  $\alpha$ -cyperone; HPLC

益坤宁酊收载于《卫生部部颁药品标准》中药成方制剂第 13 册<sup>[1]</sup>, 由熟地黄、白芍、香附、当归、桂皮等 10 味中药加工而成, 具有补气养血、调经止

痛的功效, 临床上主要用于妇女血虚气滞、月经不调、经前经后腹痛腰痛、妇女更年期综合症等。现行质量标准仅对该制剂性状、鉴别、乙醇量等项目

收稿日期: 2018-03-20

基金项目: 广东省中医药强省项目 (20142167)

作者简介: 辛振杰 (1971—), 男, 副主任中药师, 主要从事中药制剂质量研究工作。

\*通信作者 李庆国 (1976—), 男, 副教授, 博士, 主要从事药物质量控制、制剂新技术等研究工作。E-mail: guangdonglqg@126.com

进行了控制,未对方中任何成分进行定量测定研究,孟正<sup>[2]</sup>、张先文等<sup>[3]</sup>仅仅对该品种其他剂型中所含芍药苷进行了测定。复方制剂益坤宁酊由 10 味中药组成,所含成分复杂,单一成分难以全面地控制产品质量。方中熟地黄具有补血滋阴、益精填髓的功效,环烯醚萜苷类和苯乙醇苷类为其主要活性成分,其中梓醇为地黄中环烯醚萜苷类的代表成分,麦角甾苷、马替诺皂苷、吉奥诺苷 B<sub>1</sub> 为地黄中苯乙醇苷类的代表成分<sup>[4]</sup>。白芍具有养血调经、敛阴止痛等功效,芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷等单萜类化合物为其主要活性成分<sup>[5]</sup>。香附具有调经止痛、理气宽中的功效, $\alpha$ -香附酮、广藿香烯、香附烯酮等为其主要活性成分<sup>[6]</sup>。因此本实验采用 HPLC 波长切换法同时测定益坤宁酊中梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮 7 种成分,为进一步完善益坤宁酊的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试药

Waters E2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);赛多利斯十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。

益坤宁酊(规格 100 mL/瓶,批号 LR10010、LR10016、MR10015)购自广州白云山星群(药业)股份有限公司;麦角甾苷(批号 111530-201512,质量分数 96.7%)、芍药苷(110736-201741,质量分数 95.7%) 和  $\alpha$ -香附酮(批号 110748-201714,质量分数 99.4%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院;梓醇(批号 2415-24-9,质量分数 98.0%) 和芍药内酯苷(批号 39011-90-0,质量分数 98.0%) 对照品均购自上海纯优生物科技有限公司;氧化芍药苷对照品(批号 39011-91-1,质量分数 98.0%) 购自上海宝曼生物科技有限公司;马替诺皂苷对照品(批号 67884-12-2,质量分数 98.0%) 购自成都克洛玛生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮对照品各适量,分别用甲醇制成质量浓度分别为 0.532、0.318、0.152、0.276、1.404、

1.982、0.238 mg/mL 的各对照品储备液。再分别精密量取各对照品储备液 2.5 mL,置同一 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮质量浓度分别为 26.6、15.9、7.6、13.8、70.2、99.1、11.9  $\mu$ g/mL 的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密量取益坤宁酊样品 5.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

**2.1.3 阴性样品溶液的制备** 按照益坤宁酊质量标准项下的处方组成和制法,分别制备缺熟地黄、白芍、香附的阴性样品,按照供试品溶液的制备项下方法操作,分别制备缺熟地黄、白芍、香附的阴性样品溶液。

### 2.2 色谱条件与系统适应性

Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相 A:乙腈-甲醇(1:3),流动相 B:0.2%磷酸溶液,梯度洗脱(0~18 min, 16.0% A; 18~24 min, 16.0% $\rightarrow$ 38.0% A; 24~35 min, 38.0% $\rightarrow$ 55.0% A; 35~39 min, 55.0% $\rightarrow$ 72.0% A; 39~45 min, 72.0% $\rightarrow$ 16.0% A);检测波长 210 nm(0~18 min, 检测梓醇)<sup>[4,7-8]</sup>、330 nm(18~24 min, 检测麦角甾苷和马替诺皂苷)<sup>[4,8-9]</sup>、230 nm(24~45 min, 检测氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮)<sup>[5,10-11]</sup>;体积流量 0.8 mL/min;柱温 25  $^{\circ}$ C;进样量 10  $\mu$ L。

### 2.3 专属性试验

分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各适量,依法进样测定。结果表明阴性样品对梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮的测定无干扰,所测各成分均能达到有效分离,分离度均大于 1.5,理论塔板数按照所测各色谱峰计均大于 3 500,色谱图见图 1。

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品储备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分置于 6 个 20 mL 量瓶中,用甲醇定容制成 25 倍浓度差的混合对照溶液,依法进样,测定梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮的峰面积。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,结果见表 1。

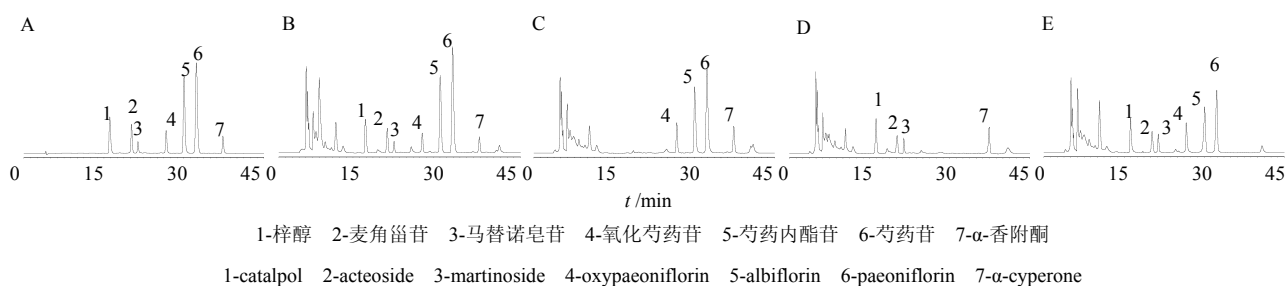


图1 混合对照品(A)、益坤宁酊(B)、缺熟地黄阴性样品(C)、缺白芍阴性样品(D)和缺香附阴性样品(E)的HPLC图谱  
Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substances(A), Yikunning Tincture (B), negative sample without *Rehmanniae Radix Praeparata* (C), negative sample without *Paeoniae Radix Alba* (D), and negative sample without *Cyperi Rhizome* (E)

表1 线性方程、相关系数和线性范围

Table 1 Linear equation, correlation coefficient, and linear range

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
梓醇	$Y=7.3241 \times 10^5 X-441.3$	0.999 7	2.66~66.50
麦角甾苷	$Y=1.0352 \times 10^6 X+286.5$	0.999 5	1.59~39.75
马替诺皂苷	$Y=6.3419 \times 10^5 X+390.0$	0.999 9	0.76~19.00
氧化芍药苷	$Y=9.8351 \times 10^5 X-408.7$	0.999 9	1.38~34.50
芍药内酯苷	$Y=1.3057 \times 10^6 X+255.6$	0.999 6	7.02~175.50
芍药苷	$Y=1.1428 \times 10^6 X-376.1$	0.999 3	9.91~247.75
$\alpha$ -香附酮	$Y=5.9735 \times 10^5 X+218.2$	0.999 8	1.19~29.75

### 2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液适量,依法连续6次进样测定,记录梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮的峰面积,结果梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮峰面积的RSD值分别为1.03%、0.79%、1.41%、1.25%、0.88%、0.67%、1.34%。

### 2.6 重复性试验

取益坤宁酊(批号LR10010)样品6份,制备供试品溶液,进样测定梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮的峰面积,计算所测各成分质量浓度,结果梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮质量浓度的RSD值分别为1.44%、0.53%、1.81%、0.61%、1.07%、0.89%、1.72%。

### 2.7 稳定性试验

取批号LR10010益坤宁酊样品,制备供试品溶液,分别在0、2、4、6、8、12h依法进样测定梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮的峰面积,结果益坤宁酊供试品溶液室温下12h内稳定,梓醇、麦角甾苷、

马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮峰面积的RSD值分别为0.98%、1.02%、1.53%、1.27%、0.90%、0.71%、1.45%。

### 2.8 回收率试验

精密量取批号LR10010益坤宁酊样品9份,每份2.5mL,分别置不同的50mL量瓶中,分成3组,分别加入各成分对照品溶液(梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮质量浓度分别为0.546、0.359、0.182、0.297、0.923、0.717、0.241mg/mL)各适量,使各组对照品加入量与供试品中待测成分之比控制在0.5:1、1:1和1.5:1,制备供试品溶液,依法进样检测,记录梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮的峰面积,结果梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和 $\alpha$ -香附酮的平均加样回收率分别为97.97%、98.31%、96.99%、97.78%、99.28%、100.03%、97.43%,RSD值分别为1.42%、0.92%、1.30%、1.13%、1.08%、0.65%、1.27%。

### 2.9 样品测定

取批号LR10010、LR10016、MR10015益坤宁酊样品各适量,制备供试品溶液,每份样品平行制

备 3 份, 依法进样测定, 记录梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -

香附酮的峰面积, 采用外标法计算所测 7 种成分的质量浓度, 结果见表 2。

表 2 益坤宁酊中梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮的测定结果 ( $n = 3$ )  
Table 2 Determination of catalpol, acteoside, martinolide, oxypaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorin, and  $\alpha$ -cyperone in Yikunning Tincture ( $n = 3$ )

批号	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )						
	梓醇	麦角甾苷	马替诺皂苷	氧化芍药苷	芍药内酯苷	芍药苷	$\alpha$ -香附酮
LR10010	0.218	0.143	0.072	0.119	0.736	1.145	0.097
LR10016	0.198	0.122	0.080	0.131	0.666	1.235	0.110
MR10015	0.247	0.149	0.063	0.102	0.841	1.089	0.082

### 3 讨论

实验中, 以所测各成分梓醇、麦角甾苷、马替诺皂苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和  $\alpha$ -香附酮色谱峰的峰形、分离度和基线噪音等为指标, 首先考察了甲醇-水<sup>[6, 12-13]</sup>、乙腈-水和乙腈-甲醇(1:3)与水流动相体系, 结果乙腈-甲醇(1:3)与水流动相体系优于甲醇-水和乙腈-水流动相体系; 以甲醇-水为流动相时, 所测成分芍药内酯苷和芍药苷达不到有效分离; 以乙腈-水为流动相时, 所测成分梓醇和麦角甾苷峰形不对称,  $\alpha$ -香附酮拖尾现象严重。在此基础上, 实验分别考察了乙腈-甲醇(1:3)与 0.1%甲酸溶液流动相体系<sup>[14]</sup>、乙腈-甲醇(1:3)与 0.1%冰醋酸溶液流动相体系<sup>[7-8]</sup>、乙腈-甲醇(1:3)与 0.2%磷酸溶液流动相体系<sup>[4-5, 7, 9-11]</sup>, 同时对流动相比例进行不断摸索, 最终确定最佳的流动相体系为乙腈-甲醇(1:3)与 0.2%磷酸溶液。

本实验所建立的方法操作便捷、数据准确、灵敏度高, 重复性好, 为益坤宁酊生产过程中的质量控制提供了科学依据, 为益坤宁酊质量标准的提升提供参考。

#### 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(中药成方制剂第十三册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 176.  
[2] 孟正, 崔平, 张明. 益坤宁胶囊的质量标准研究 [J]. 西北药学杂志, 2017, 32(6): 687-689.  
[3] 张先文, 蒋小云, 黄险峰. HPLC 法测定益坤宁颗粒中

芍药苷的含量 [J]. 安徽医药, 2006, 10(11): 838-839.  
[4] 张文萌, 张石, 付锦楠, 等. RP-HPLC 双波长法同时测定熟地黄中 4 种成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(5): 367-372.  
[5] 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.  
[6] 陈艳红, 吴秋云, 蔡佳仲, 等. 17 批不同产地香附中有效成分的含量测定 [J]. 临床医学工程, 2010, 17(11): 41-42.  
[7] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 105, 125-126, 258.  
[8] 王宏洁, 金亚红, 李鹏跃, 等. 鲜、生、熟地黄药材中 3 种活性成分含量的比较 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1923-1925.  
[9] 张留记, 周志敏, 屠万倩, 等. HPLC 同时测定地黄中 5 种苷类成分的含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(1): 87-90.  
[10] 李伟铭, 赵月然, 杨燕云, 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] 何秀菊, 张振秋, 王婧宁, 等. HPLC 波长切换法同时测定桂枝, 白芍药对提取物中 8 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11): 1899-1903.  
[12] 卢君蓉, 李文兵, 王世宇, 等. 香附醋制前后香附烯酮, 圆柚酮和  $\alpha$ -香附酮的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 24-27.  
[13] 卢君蓉, 李文兵, 傅超美, 等. 香附药材的质量控制方法的探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(5): 389-392.  
[14] 刘杰, 许文, 李煌, 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.