

HPLC 法测定乾坤丹 (I) 中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒果苷

于 军, 刘 婕

天津市北辰区中医医院, 天津 300400

摘 要: 目的 建立乾坤丹 (I) 中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒果苷的 HPLC 测定方法。方法 采用 HPLC 法, Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.5%甲酸, 梯度洗脱; 检测波长 260 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃。结果 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷线性范围分别为 0.374~5.984 μg、0.526~8.402 μg。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷的平均加样回收率分别为 99.72%、100.15%, RSD 值分别为 1.37%、1.08%。结论 建立的方法简便、准确、灵敏度高、重复性好, 为建立可靠的乾坤丹 (I) 质量标准、更好地控制制剂质量提供有效借鉴。

关键词: 乾坤丹 (I); 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒果苷; 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(2020)04-0652-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.04.010

Determination of calycosin-7-O-β-D-glucoside and mangiferin in Qiankun Pills (I) by HPLC

YU Jun, LIU Jie

Tianjin Beichen District Traditional Chinese Medicine Hospital, Tianjin 300400, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for analysis of calycosin-7-O-β-D-glucoside and mangiferin in Qiankun Pills (I). **Methods** The HPLC method was performed on Phenomenex C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphate solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 260 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and temperature of column was set at 30℃. **Results** The linear ranges of calycosin-7-O-β-D-glucoside and mangiferin were 0.374—5.984 μg and 0.526—8.402 μg, respectively. The average recoveries were 99.72% and 100.15% with RSD of 1.37% and 1.08%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and reproducible, which can provide effective reference for establishing reliable quality standard and better controlling the quality of Qiankun Pills (I).

Key words: Qiankun Pills (I); calycosin-7-O-β-D-glucoside; mangiferin; HPLC

乾坤丹 (I) 是由黄芪、知母、天花粉、枸杞子等 20 味中药组成的复方制剂, 具有健脾益气、养阴固肾、生津止渴功效。方中重用黄芪, 补气升阳, 益卫固表, 辅知母等清热润燥之品, 寒热并用, 两药协同起到益气养阴之功。毛蕊异黄酮葡萄糖苷为君药黄芪中有效成分, 芒果苷为臣药知母中有效成分, 分别被《中国药典》2015 年版一部收录并作为相应药材质量的主要指标^[1]。研究表明, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷具有抗氧化^[2]、改善心肌功能^[3]、保护血管内皮细胞作用^[4]; 芒果苷具有降血糖^[5]、抗肿瘤^[6]、抑菌作用^[7]。本实验探索建立同时测定乾

坤丹 (I) 中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒果苷的 HPLC 法, 旨在为乾坤丹 (I) 质量标准的提高和完善提供依据。

1 仪器与试剂

LC-15C 型高效液相色谱仪、自动进样器、柱温箱 (日本岛津), TB-25 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius)。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、芒果苷 (批号 111607-201704, 质量分数 98.1%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈 (色谱纯), 甲酸 (色谱纯), 乙醇 (分

收稿日期: 2020-03-18

基金项目: 天津市北辰区科技发展计划项目 (2018-SHGY-28)

作者简介: 于 军, 男, 药剂科主任, 从事中药质量的质控工作和中药药事管理的教学工作。E-mail: yj668808@126.com

析纯), 甲醇(分析纯), D-101 型大孔吸附树脂柱, 水为纯净水; 乾坤丹(北辰区中医医院提供, 规格 12 g/袋, 批号 18120301、19032701、19051501)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

Phenomenex C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相为乙腈(A)-0.5%甲酸(B)^[8], 梯度洗脱: 0~15 min, 10% A; 15~45 min, 10%~30% A; 45~55 min, 30%~60% A; 检测波长 260 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30℃。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷的理论塔板数均不低 5 000, 对应的色谱峰的分度度均>2.0, 见图 1。

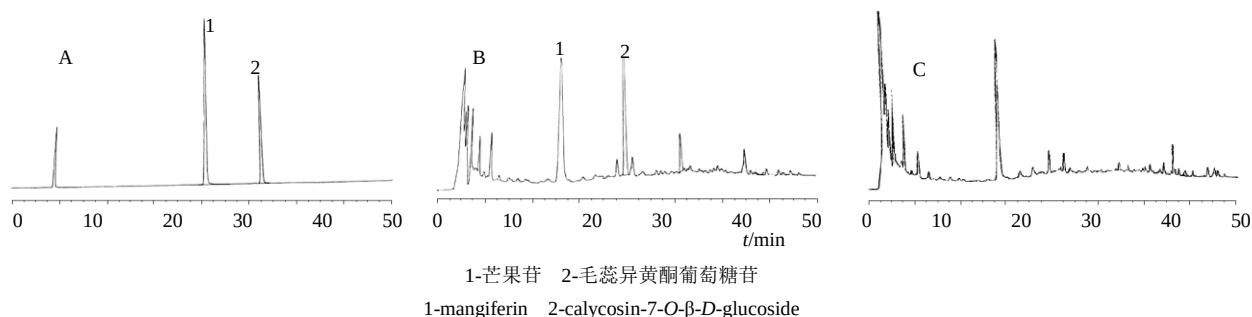


图1 混合对照品(A)、乾坤丹(I)(B)和缺黄芪、知母的阴性样品(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), Qiankun Pills (I)(B) and negative sample (C)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 配成溶液中含 299.2 μg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和 420.1 μg/mL 芒果苷的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取3袋乾坤丹(I)共36 g, 粉成细粉, 过四号筛, 精密称定, 置圆底烧瓶器中, 加15倍95%乙醇加热回流3次, 1 h/次, 回收溶剂至干, 残渣加水溶解, 放冷, 通过D-101型大孔吸附树脂柱, 先用水洗脱, 再用40%乙醇洗脱, 弃去洗脱液, 继用70%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至50 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 阴性对照样品制备

将乾坤丹处方中去掉黄芪、知母后, 以原来的成方比例, 将其他药味按照同样的制备工艺得到丸剂, 称取36 g粉碎后, 按照供试品溶液的制备方法操作, 即得。

2.5 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液, 用甲醇配制成含 18.7、37.4、74.8、149.6、299.2 μg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和 26.3、52.5、105.0、210.1、420.1 μg/mL 芒果苷的混合对照品溶液。精密吸取 20 μL 各质量浓度的对照品溶液进样, 记录色谱峰面积。以进样质量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线,

进行线性回归, 得标准曲线方程。毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $A=3 \times 10^6 X+316\ 775$ ($r=0.999\ 8$), 线性范围 0.374~5.984 μg; 芒果苷 $A=4 \times 10^6 X+902\ 085$ ($r=0.999\ 5$), 线性范围 0.526~8.402 μg。

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液 20 μL, 连续进样6次, 记录峰面积, 计算峰面积的RSD值, 结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷峰峰面积的RSD值分别为1.72%、1.31%。

2.7 稳定性试验

取批号18120301乾坤丹(I)制备供试品溶液, 分别在0、2、4、8、12、24 h进行测定, 每次进样20 μL, 记录峰面积, 结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷峰面积的RSD值分别为1.32%、1.99%, 表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

2.8 重现性试验

取批号18120301乾坤丹(I)6份, 制备供试品溶液, 进行测定, 每次20 μL, 记录峰面积, 结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷质量分数的RSD值分别为1.27%、1.51%。

2.9 回收率试验

精密称取批号19032701乾坤丹(I)样品9份, 每份约18 g, 加入89.6 μg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、291.6 μg/mL 芒果苷对照品溶液各4、5、6 mL, 制备供试品溶液, 进行测定, 记录峰面积, 计算得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒果苷的平均加样回收率分

别为 99.72%、100.15%，RSD 值分别为 1.37%、1.08%，

2.10 样品测定

取批号 18120301, 19032701, 19051501 乾坤丹 (I) 样品, 每批各平行 2 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 按标准曲线法计算样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒果苷的质量分数, 结果批号 18120301、19032701、19051501 乾坤丹 (I) 样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质量分数分别为 172.2、179.3、180.6 $\mu\text{g/g}$, 芒果苷的质量分数分别为 400.8、533.4、546.4 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

乾坤丹 (I) 用于肝肾不足、气阴两虚引起头晕、耳鸣、腰膝酸软、五心烦热、老年口腔干燥症、尿崩症、糖尿病、血糖尿糖高及尿酮症等, 经多年的临床应用, 疗效确切, 得到医师和患者的肯定。原有的制剂标准仅收载包括草酸钙针晶的显微结构, 以及瓜蒌、白芍、枸杞子、黄芪、麦冬的薄层色谱鉴别, 操作简单易行, 但尚缺乏定量依据, 有待进一步提升。

乾坤丹 (I) 君药黄芪中主要含有黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等成分, 但黄芪甲苷紫外检测显示末端吸收, 受干扰大, 《中国药典》2015 年版一部收载用 ELSD 法检测, 而毛蕊异黄酮葡萄糖苷在紫外区有较强吸收, 含量较大, 检测方法也收载于中国药典》2015 年版一部。本实验前期曾考虑 ELSD 法检测, 但由于处方用药较多, 成分复杂, 加之 ELSD 法检测的稳定性不及紫外检测, 最后确定采用紫外检测法检测有效成分。

针对供试品溶液的制备中样品前处理方法采用

了正交试验设计进行优化, 结果发现黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷在甲醇中溶解性要强于乙醇, 而芒果苷在乙醇中溶解度比甲醇要强, 综合两方面, 选择最佳的提取方式为 15 倍量 95%乙醇提取 3 次。

综上所述, 本实验采用 HPLC 法同时测定乾坤丹 (I) 中组分黄芪和知母的有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒果苷, 方法简便、准确、灵敏度高、重复性好, 为建立可靠的乾坤丹 (I) 质量标准、更好地控制制剂质量提供有效借鉴。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 302, 212.
- [2] 刘靖丽, 于海东, 梁艳妮. 中药黄芪中黄酮类化合物抗氧化活性的 DFT 研究 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(1): 36-40.
- [3] Ren M, Wang X, Du G, et al. Calycosin-7-O- β -D-glucoside attenuates ischemia-reperfusion injury in vivo via activation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016,13(1): 633-640.
- [4] 李秀丽, 宋瑞霞, 余 静. 四种黄芪黄酮类化合物单体对血管内皮细胞功能的保护作用 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2011, 37(4): 1-5.
- [5] 马洁桃, 张 岭, 来伟旗, 等. 芒果苷对 L6 细胞葡萄糖消耗的影响及其作用机制研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2012, 13(9): 662-666.
- [6] 杨云霄, 曾今诚, 李继霞, 等. 芒果苷抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(5): 110-112.
- [7] 黄春萍, 罗 群, 李 洁, 等. 芒果皮中芒果苷提取工艺优化及其抑菌性分析 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(8): 1452-1456.
- [8] 陈沛鑫, 李卫民, 高 英, 等. HPLC 测定知母-黄芪药对中芒果苷、毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 72-75.