

表 3 荆芥炭炮制正交试验设计结果

Table 3 Results of orthogonal test on HSC processing

实验号	A	B	C	D	总黄酮/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	19.09
2	1	2	2	2	18.67
3	1	3	3	3	17.31
4	2	1	2	3	20.06
5	2	2	3	1	19.32
6	2	3	1	2	18.26
7	3	1	3	2	18.69
8	3	2	1	3	17.13
9	3	3	2	1	15.31
k ₁	55.07	57.84	54.48	53.72	
k ₂	57.64	55.12	54.04	55.62	
k ₃	51.13	50.88	55.32	54.5	
R	6.51	4.24	1.28	1.90	

表 4 结果的方差分析

Table 4 Result of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	7.167 622	2	3.583 811	16.106 21	P<0.05
B	8.201 956	2	4.100 978	18.430 44	P<0.01
误差	0.890 044	4	0.222 511		

F_{0.05}(2,4)=6.94 F_{0.01}(2,4)=18.00

是外观描述等指标。故导致目前炮制工艺各地各法及质量标准差异较大的现状。因此急需通过实验,逐步统一规范。本实验通过药理筛选及含量测定相结合的方法提出了荆芥炭炮制的最佳工艺,所提供的实验方法可靠,测定结果能反映客观实际,是对实现荆芥炭炮制条件统一和规范的可贵探索,也为荆芥炭饮片的质量控制做了初步探索。

3.2 荆芥炭中总黄酮的提取方式有:冷浸、超声提取、索氏提取等,通过实验比较索氏提取法提取最完全。

3.3 重复最佳工艺,得到样品中总黄酮平均质量分数为 20.20 mg/g (n=3),可知最佳工艺选择合理。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
 [2] Yang Z L, Gao R Z, Li X S. Optimum condition of preparing Herba Schizonepetae Charcoal with orthogonal design [J]. J Chin Med Mater (中草药), 1994, 17(9): 26-27.
 [3] Shan M Q, Zhang L, Zhou C Y, et al. Quantitative analysis of flavonoid in different sections of Schizonepeta tenuifolia Briq. and from different areas [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2002, 13(3): 138-139.

高效液相色谱法-蒸发光散射检测器和二级管阵列检测器测定红车轴草提取物中鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素的含量

马 强¹, 周玉新², 雷海民³, 王长海¹

(1. 大连理工大学环境与生命学院 生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024; 2. 北京美德森医药技术开发有限公司, 北京 100029; 3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要:目的 建立以蒸发光散射检测器(ELSD)和二极管阵列检测器(DAD)测定红车轴草提取物中鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素的高效液相色谱分析方法。方法 色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水梯度洗脱;检测波长:254 nm;柱温:25 ℃;体积流量:1.0 mL/min;检测器:Agilent 1100 二极管阵列检测器, SEDEX 55 型蒸发光散射检测器。结果 鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素分别在 1.275~3.315 μg 和 0.965~2.509 μg 与峰面积线性关系良好。鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素在以 ELSD 检测时的加样回收率分别为 99.54%、100.84%, RSD 分别为 2.03%、2.15%, 在以 DAD 检测时的加样回收率分别为 101.26%、101.59%, RSD 分别为 1.84%、1.91%。结论 本方法准确、快速、重现性好

关键词:红车轴草;鹰嘴豆芽素 A;芒柄花素;高效液相色谱;蒸发光散射检测器;二极管阵列检测器

中图分类号:R286.02 文献标识码:B 文章编号:0253-2670(2005)03-0372-04

Determination of biochanin A and formononetin in *Trifolium pratense* extract by HPLC-ELSD and DAD

MA Qiang¹, ZHOU Yu-xin², LEI Hai-min³, WANG Chang-hai¹

(1. Department of Bioscience and Bioengineering, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 2. Beijing MedSun Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Beijing 100029, China; 3. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Key words: *Trifolium pratense* L.; biochanin A; formononetin; HPLC; ELSD; DAD

红车轴草 *Trifolium pratense* L. 系豆科车轴草属多年生草本植物,又名红三叶、红菽草、红荷兰翘摇、红花苜蓿、金雀菜、三叶草,原产亚洲西部,现广泛分布于世界各地,我国各地均有栽培或野生。红车轴草中主要含有鹰嘴豆芽素 A、芒柄花素等异黄酮类成分,具有抗肿瘤,治疗胃癌、肠癌、乳腺癌等功效,此外还有治疗骨质疏松、改善妇女更年期症状等用途,因而备受关注^[1]。二极管阵列检测器(DAD)是测定异黄酮类成分含量的常用检测器^[2],而蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种新型的通用型质量检测器,已经被广泛应用于医药、化工、食品等众多领域^[3~5]。本实验建立了以 ELSD 和 DAD 同时检测红车轴草提取物中鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素含量的高效液相色谱法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器); Agilent Chem Station 色谱数据工作站; 法国 SEDEX 55 型蒸发光散射检测器(ELSD); Millipore-Q 超纯水制备仪。

鹰嘴豆芽素 A 对照品购自 Sigma 公司,纯度为 98%,芒柄花素对照品购自 Acros 公司,纯度为 99%;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。红车轴草提取物由武汉联谊科技发展有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水梯度洗脱,25 min 内乙腈由 20% 增加到 80%;检测波长:254 nm;体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 °C;进样量:10 μL;ELSD 漂移管温度:40 °C;载气压力:0.20 MPa。

2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素对照品适量,加甲醇制成 0.255 mg/mL 的鹰嘴豆芽素 A 对照品溶液和 0.193 mg/mL 的芒柄花素对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取红车轴草提取物 9.65 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,超声振荡 20 min,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 标准曲线的绘制

2.4.1 DAD 检测时标准曲线的绘制:精密吸取鹰嘴豆芽素 A 对照品溶液 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL,注入液相色谱仪。以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准曲线,结果鹰嘴豆芽素 A

在 1.275~3.315 μg 与峰面积的线性关系良好。所得标准曲线方程为 $Y=7.715 \times 10^3 X+306$, $r=0.9999$ 。精密吸取芒柄花素对照品溶液 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL,注入液相色谱仪。以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准曲线,结果芒柄花素在 0.965~2.509 μg 与峰面积对数的线性关系良好。所得标准曲线方程为 $Y=6.506 \times 10^3 X+90.948$, $r=0.9999$ 。

2.4.2 ELSD 检测时标准曲线的绘制:精密吸取鹰嘴豆芽素 A 对照品溶液 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL,注入液相色谱仪。以峰面积的对数为纵坐标(Y),进样量的对数为横坐标(X),绘制标准曲线,结果鹰嘴豆芽素 A 在 1.275~3.315 μg 与峰面积对数的线性关系良好。所得标准曲线方程为 $Y=1.648 X+2.156$, $r=0.9974$ 。精密吸取芒柄花素对照品溶液 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL,注入液相色谱仪。以峰面积的对数为纵坐标(Y),进样量的对数为横坐标(X),绘制标准曲线,结果芒柄花素在 0.965~2.509 μg 与峰面积对数的线性关系良好。所得标准曲线方程为 $Y=1.595 X+2.152$, $r=0.9998$ 。

2.5 精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,测定峰面积,结果 ELSD 检测鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.17% 和 1.22%;DAD 检测鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 0.84% 和 0.96%。

2.6 重现性试验:精密称取同批样品 6 份,按供试品溶液制备项下方法平行制备,按上述色谱条件测定,结果 ELSD 检测鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素质量分数的 RSD 分别为 1.34% 和 1.42%;DAD 检测鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素质量分数的 RSD 分别为 1.13% 和 1.07%。

2.7 稳定性试验:取供试品溶液分别放置 0、1、2、4、6、8 h,各精密进样 10 μL,测定峰面积。结果 ELSD 检测鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.47% 和 1.62%;DAD 检测鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.26% 和 1.35%。

2.8 回收率试验:采用加样回收法。精密称取已知含量的红车轴草提取物(批号 1)10.23 mg 分别精密加入 0.307 mg/mL 鹰嘴豆芽素 A 对照品溶液 3.0 mL 和 0.414 mg/mL 芒柄花素对照品溶液 3.0 mL,按供试品溶液制备方法操作,并按上述色谱条

件测定,结果 ELSD 检测鹰嘴豆芽素 A 的平均回收率为 99.54%,RSD 为 2.03% (n=6);芒柄花素的平均回收率为 100.84%,RSD 为 2.15% (n=6);DAD 检测鹰嘴豆芽素 A 的平均回收率为 101.26%,RSD 为 1.84% (n=6);芒柄花素的平均回收率为 101.59%,RSD 为 1.91% (n=6)。

2.9 样品的测定:取不同批号样品,制备供试品溶液,按上述色谱条件,外标法测定样品,结果见表 1,色谱图见图 1。

表 1 红车轴草提取物中鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of biochanin A and formononetin in *T. pratense* extract (n=3)

批号	鹰嘴豆芽素 A/%		芒柄花素/%	
	HPLC-ELSD 法	HPLC-DAD 法	HPLC-ELSD 法	HPLC-DAD 法
1	8.40	9.19	11.58	12.50
2	7.99	8.73	6.88	7.02
3	8.51	9.21	12.49	12.34
4	7.61	8.76	6.61	7.19

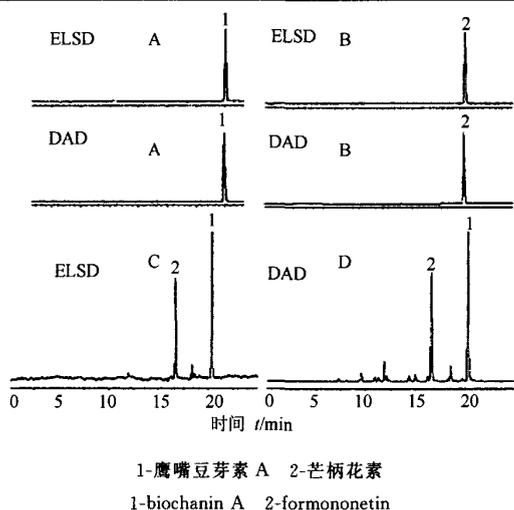


图 1 鹰嘴豆芽素 A 对照品(A)、芒柄花素对照品(B)和红车轴草提取物(C、D)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of biochanin A reference substance (A), formononetin reference substance (B), and *T. pratense* extracts (C and D)

3 讨论

3.1 ELSD 和 DAD 检测的比较:ELSD 和 DAD 作为不同类型的检测器,其适用范围不尽相同。DAD 是一种常用的紫外检测器,其检测成分应具有紫外吸收;ELSD 作为一种通用型质量检测器,可用于检测不存在紫外吸收或仅在紫外末端具有吸收的样品,在某种程度上弥补了传统的紫外检测器在这方面的不足。此外,ELSD 可以很好地支持梯度洗脱,消除流动相配比变化对基线产生的影响。应用

ELSD 和 DAD 同时检测,不仅能够获取更准确的定量结果,而且可以获得更广泛的物质信息。

3.2 ELSD 不同回归模型的比较:许多实验表明,ELSD 的响应值与被测物质量的关系曲线比较复杂^[6],本实验分别运用线性模型、对数模型、二次曲线模型和混合模型对二者的关系进行了研究,结果见表 2,可见混合模型为最优回归模型。

表 2 ELSD 不同回归模型的比较

Table 2 Comparison of various regression models of ELSD

回归模型	鹰嘴豆芽素 A		芒柄花素	
	回归方程	r	回归方程	r
线性模型	$Y = 385.621 X - 294.488$	0.994 3	$Y = 311.058 X - 181.981$	0.997 3
对数模型	$\lg Y = 1.648 \lg X + 2.156$	0.997 4	$\lg Y = 1.595 \lg X + 2.152$	0.999 8
二次曲线模型	$Y = 14.863 X^2 + 317.399 X - 223.936$	0.999 6	$Y = 49.031 X^2 + 140.726 X - 48.659$	0.999 9
混合模型	$\lg Y = -0.923 (\lg X)^2 + 2.222 \lg X + 2.087$	0.999 7	$Y = -0.052 (\lg X)^2 + 1.615 \lg X + 2.151$	0.999 9

3.3 检测波长的选择:经紫外扫描,鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素对照品在 190~600 nm 波长内,最大吸收波长分别为 260 和 248 nm。本实验选择 254 nm 作为检测波长。

3.4 流动相的选择:在上述色谱条件下,本实验分别选择了不同比例的甲醇-水、乙腈-水和多种梯度条件进行试验。结果证明,流动相选择乙腈-水进行梯度洗脱,25 min 内待分析物质成分得到了较好的分离,且满足定量要求。采用 ELSD 检测,流动相浓度的变化不会引起基线的明显漂移,因此适宜以梯度洗脱加以测定。

3.5 换算因子的确定:鹰嘴豆芽素 A 和芒柄花素的质量分数与峰面积间存在如下换算关系: $C_B = A_B/A_F \times C_F \times 0.8$ (DAD 检测), $\lg C_B = (\lg A_B) / (\lg A_F) \times \lg C_F \times 1.0$ (ELSD 检测),式中 C_B 为鹰嘴豆芽素 A 的质量分数; C_F 为芒柄花素的质量分数, A_B 为鹰嘴豆芽素 A 的峰面积, A_F 为芒柄花素的峰面积。

References:

- [1] Zeng H Y, Zhou P H, Hou T Z. Advances in studies on chemical constituents of *Trifolium pratense* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(2): 189-190.
- [2] Li W K, John F. Simultaneous determination of terpene lactones and flavonoid aglycones in *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 30 (1): 67-75.
- [3] Li W K, John F. Determination of 24(R)-pseudoginsenoside F11 in North American ginseng using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 25(2): 257-265.
- [4] Bonnie A, Krishna K, Mitchell A. Rapid determination of

artemisinin and related analogues using high-performance liquid chromatography and an evaporative light scattering detector [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 730(1): 71-80.

[5] Bunger H, Pison U. Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light scattering detection [J]. *J Chromatogr B*,

1995, 672(1): 25-31.

[6] Toussaint B, Duchateau A, Albert A, *et al.* Determination of enantiomers of 3-tert-butylamino-1, 2-propanediol by high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 890(2): 239-249.

HPLC 法测定三九胃泰颗粒中九里香酮的含量

颜 杰¹, 裴建梅²

(1. 深圳三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518029; 2. 广东中南药业有限公司, 广东 深圳 518020)

三九胃泰颗粒主要用于上腹隐痛、饱胀、反酸、恶心、呕吐、纳减、心口嘈杂等胃病。“三九”的名字就起源于其中的两味主药：三叉苦、九里香。处方中的九里香具有理气止痛、温中助阳的作用^[1]。现代药理研究证明九里香具有抗菌、消炎、解痉、局麻及增强免疫等功能^[2]。但三九胃泰颗粒标准中没有含量测定项，亦没有九里香的鉴别，因此有必要建立方法对其进行控制。本实验以九里香中的九里香酮为指标，采用 HPLC 法进行测定，方法准确可靠、简便迅速，效果较好。

1 仪器与试药

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪、二极管阵列检测器；九里香酮对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 200101)；三九胃泰颗粒(规格: 20 g/袋, 三九医药股份有限公司)；甲醇(色谱纯, 中国医学科学院天津协和医学科技公司)；水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择: 三维图谱上查看九里香酮对照品的紫外吸收, 在 210、242、266、337 nm 有最大吸收。本实验选择受流动相紫外吸收干扰小、吸收峰不尖锐的 337 nm 作为检测波长。

2.2 色谱条件: 色谱柱: ODS 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相: 甲醇-水(55 : 45)；体积流量: 1.0 mL/min；检测波长: 337 nm；柱温: 30 ℃；进样量: 20 μL。色谱图见图 1。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的九里香酮对照品约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 振荡溶解, 再加甲醇至刻度, 摇匀, 备用。

2.4 供试品溶液的制备: 精密称取三九胃泰颗粒

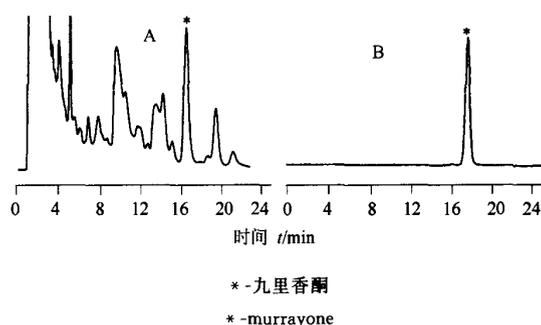


图 1 三九胃泰颗粒(A)和九里香酮对照品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of Sanjiu Weitai Granule (A) and murrayone reference substance (B)

10 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 100 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 加甲醇补足损失质量, 滤过。精取续滤液 50 mL 置蒸发皿中, 水浴蒸至近干, 残渣用甲醇溶解, 移入 10 mL 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.5 工作曲线的制备: 精密量取九里香酮对照品储备液 0.5、1、2、3、5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 依前述色谱条件进行测定。以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归, 得回归方程: $Y = 1\,166\,624 X + 95\,781$, $r = 0.999\,7$ 。结果表明九里香酮在 0.1~1.0 μg 与峰面积线性良好。

2.6 精密度的试验: 取批号为 0406112 的样品制备供试品溶液, 依前述色谱条件连续进样 5 次, 测定九里香酮峰面积, 计算得其 RSD 为 0.12%。

2.7 重现性试验: 取批号为 0406112 的样品, 平行取样 5 份, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 计算得样品中九里香酮的平均质量分数为 0.048 3 mg/g,

收稿日期: 2004-08-13

作者简介: 颜 杰(1972-), 男, 山东曲阜人, 工程师, 硕士, 2000 年毕业于沈阳药科大学, 主要从事药品质量标准及中药现代化研究。
Tel: (0755) 83360999-3135 E-mail: jiepei@999.com.cn