

# HPLC法同时测定滋阴温阳活血颗粒中两种指标性成分的研究

文小燕<sup>1</sup>, 谭梅英<sup>2</sup>, 容丽英<sup>1</sup>, 陈伟英<sup>1</sup>

(1. 广东省肇庆市第二人民医院, 广东 肇庆, 526060;

2. 广东省第二中医院/广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州, 510095)

**[摘要]** 目的: 建立滋阴温阳活血颗粒中两种指标性成分(腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷)的同时测定方法。方法: 采用HPLC法, 选用phenomex Kinetex C<sub>18</sub>色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm), 0.1%磷酸-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速1.0ml/min, 柱温30℃, 进样量10μl, 检测波长254nm; 以腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷为指标性成分, 共测定10批滋阴温阳活血颗粒。结果: 10批颗粒中, 腺苷的含量在2.706~4.132mg/g范围内, 山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷的含量在3.692~4.948mg/g范围内。结论: 本研究所建立方法快速、准确、高效, 能够对滋阴温阳活血颗粒的质量进行科学评价。

**[关键词]** 滋阴温阳活血颗粒; 腺苷; 山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.06.064

## Simultaneous determination of two index components in Ziyin Wenyang Huoxue granules by high-performance liquid chromatography

WEN Xiaoyan<sup>1</sup>, TAN Meiyang<sup>2</sup>, RONG Liying<sup>1</sup>, CHEN Weiyang<sup>1</sup>

(1. Zhaoqing Second People's Hospital, Zhaoqing 526060, Guangdong, China;

2. Guangdong Second Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital & Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, Guangdong, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the method for simultaneous determination of two index components (adenosine and kaempferol-3-O-β-D-glucoside) in Ziyin Wenyang Huoxue granules. Methods: High-performance liquid chromatography was performed on a phenomex Kinetex C<sub>18</sub> column (4.6mm×250mm, 5μm) with a mobile phase of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile for gradient elution, at a flow rate of 1.0mL/min, a column temperature of 30℃, a sample size of 10μl, and a detection wavelength of 254nm. A total of 10 batches of Ziyin Wenyang Huoxue granules were measured with adenosine and kaempferol-3-O-β-D-glucoside as the index components. Results: In the 10 batches of Ziyin Wenyang Huoxue granules, the content of adenosine ranged from 2.706 to 4.132mg/g, and the content of kaempferol-3-O-β-D-glucoside ranged from 3.692 to 4.948mg/g. Conclusion: The method established in this study is quick, accurate, and efficient and can be used for scientific evaluation of the quality of Ziyin Wenyang Huoxue granule.

**[Key words]** Ziyin Wenyang Huoxue granule; adenosine; kaempferol-3-O-β-D-glucoside; content determination

滋阴温阳活血颗粒由熟地黄、山药、山茱萸、女贞子、覆盆子等多味药物组方而成, 是治疗卵巢早衰的有效方剂。相较该方传统制备方法(膏方), 复方颗粒具有携带方便、患者顺应性强等特点。目前, 滋阴温阳活血颗粒仍处于试验研究阶段, 尚未建立相关质量标准。因此, 有必要进行相关研究, 建立基于多指标成分同时测定的全方制剂质量标准。

### 1 仪器和试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, 配备PDA检测器, 自动进样器(美国Agilent公司); QS330 超声清洗仪(中国), Mettler-Toledo 精密分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 试剂 腺苷对照品(批号110419-20110415)和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷对照品(批号090831-

基金项目: 广东省肇庆市科技创新计划项目(编号: 201804031120)

第一作者: 文小燕, 女, 副主任中药师, 研究方向: 中药质量标准和临床应用

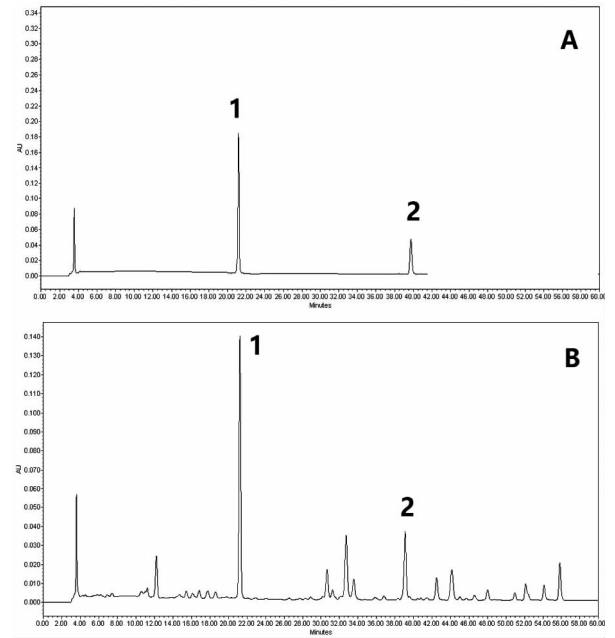
20090805)均购自中国食品药品检定研究院(中国);色谱分析用乙腈、磷酸购自 Merck(德国);制备滋阴温阳活血颗粒所用药材购自广东省康美药业股份有限公司(中国);供试品制备用乙醇购自广州市化学试剂厂;色谱分析和提取所用纯净水购自 Watsons(中国)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷对照品适量,精密称定,置于同一 10ml 量瓶中,加乙醇定容至刻度,即得两种化合物浓度均为 1mg/ml 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取滋阴温阳活血颗粒约 1.0g,精密称定,置于 50ml 锥形瓶中,加乙醇 25ml,静置 10min 后,精密称定重量,超声 20min,加乙醇补足减失重量;滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 HPLC 测定方法 取对照品和供试品溶液,使用 phenomex Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6mm×250mm,5μm),0.1% 磷酸(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,程序为:0~10min,5%~20% B;10~30min,20%~45% B;30~50min,45%~100% B;50~55min,100%~100% B;55~60min,100%~10% B;流速 1.0ml/min,柱温 30℃,进样量 10μl,检测波长 254nm。所得对照品和供试品色谱图见图 1。



A—对照品 B—供试品  
1—腺苷;2—山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷  
图 1 滋阴温阳活血颗粒对照品和供试品溶液色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取供试品溶液适量,分别置于 6 个 10ml 量瓶中,加乙醇稀释并定容至刻度,即得两种化合物对照品含量均为 5、10、50、100、200、500μg/ml 的对照品溶液。吸取上述溶液,以“2.3”项下 HPLC 条件进行测定,记

录峰面积,以浓度为横坐标 x,峰面积为纵坐标 y,代入 excel 软件进行线性回归,得腺苷的回归方程为  $y = 2132.6x + 7093.4$  ( $r^2 = 0.9995$ ),山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷的回归方程为  $y = 1625.5x + 6804.5$  ( $r^2 = 0.9995$ ),表明方法线性良好,能够在 5~500μg/ml 浓度范围内对上述两种成分进行准确测定。

2.4.2 精密度考察 取供试品溶液,按“2.3”项下方法进行 HPLC 分析,连续进样 6 次,记录腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷峰面积,计算二者的 RSD。结果显示,腺苷峰面积的 RSD 为 0.37%,山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷峰面积的 RSD 为 1.14%,表明方法精密度良好。

2.4.3 加样回收率试验 取滋阴温阳活血颗粒约 0.5g,精密称定,按表 1、表 2 所述浓度精密加入对照品溶液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3”项下方法进行 HPLC 分析,记录腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷峰面积,计算二者的含量、回收率和 RSD。结果显示,腺苷的平均回收率为 100.80%,RSD 为 3.52%(见表 1);山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷的平均回收率 101.14%,RSD 为 2.70%(见表 2);表明方法准确度良好。

表 1 腺苷回收率测定结果

|     | 含有量<br>(mg/g) | 加入量<br>(mg/g) | 测得量<br>(mg/g) | 回收率<br>(%) | 平均<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----|---------------|---------------|---------------|------------|-----------|------------|
| L-1 | 2.066         | 1.033         | 3.109         | 101.00     |           |            |
| L-2 | 2.066         | 1.033         | 3.063         | 96.53      |           |            |
| L-3 | 2.066         | 1.033         | 3.080         | 98.18      |           |            |
| M-1 | 2.066         | 2.066         | 4.233         | 104.87     |           |            |
| M-2 | 2.066         | 2.066         | 4.190         | 102.83     | 100.80    | 3.52       |
| M-3 | 2.066         | 2.066         | 4.085         | 97.70      |           |            |
| H-1 | 2.066         | 3.099         | 5.309         | 104.64     |           |            |
| H-2 | 2.066         | 3.099         | 5.308         | 104.61     |           |            |
| H-3 | 2.066         | 3.099         | 5.067         | 96.83      |           |            |

表 2 山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷回收率测定结果

|     | 含有量<br>(mg/g) | 加入量<br>(mg/g) | 测得量<br>(mg/g) | 回收率<br>(%) | 平均<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----|---------------|---------------|---------------|------------|-----------|------------|
| L-1 | 2.066         | 1.033         | 3.122         | 102.20     |           |            |
| L-2 | 2.066         | 1.033         | 3.084         | 98.53      |           |            |
| L-3 | 2.066         | 1.033         | 3.050         | 95.22      |           |            |
| M-1 | 2.066         | 2.066         | 4.172         | 101.93     |           |            |
| M-2 | 2.066         | 2.066         | 4.173         | 101.96     | 101.14    | 2.70       |
| M-3 | 2.066         | 2.066         | 4.189         | 102.78     |           |            |
| H-1 | 2.066         | 3.099         | 5.305         | 104.51     |           |            |
| H-2 | 2.066         | 3.099         | 5.191         | 100.84     |           |            |
| H-3 | 2.066         | 3.099         | 5.235         | 102.27     |           |            |

2.4.4 稳定性试验 取供试品溶液,置于自动进样器中,分别于 0、2、4、6、12、24h 按“2.3”项下方法进 HPLC 分析,记录腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷峰面积,计算二者的含量和 RSD。结果显示腺苷含量的 RSD 为 0.49%,山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷含量的 RSD 为 0.78%,表明本

研究所制备的供试品溶液在 24h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取滋阴温阳活血颗粒,按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3”项下方法进 HPLC 分析,记录腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷峰面积,计算二者的含量和 RSD。结果显示腺苷含量的 RSD 为 0.37%,山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷含量的 RSD 为 1.08%,表明方法重复性良好。

2.5 多批次滋阴温阳活血颗粒指标性成分的含量测定 取 10 批滋阴温阳活血颗粒,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法进 HPLC 分析,记录腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷峰面积,计算二者的含量。结果显示,10 批颗粒中,腺苷的含量在 2.706~4.132mg/g 范围内,山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷的含量在 3.692~4.948mg/g 范围内。(见表 3)

3 讨 论

滋阴温阳活血颗粒各药味中含有多种核苷、糖苷、黄酮、有机酸等成分,上述成分具有益精固肾、滋阴活血、调理补气等功效。由于该颗粒的制备方法为水提物浸膏制粒,供试品中水溶性成分数量及含量较大。腺苷和山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷均为方中主要药味(熟地黄、山药、山茱萸等)起相关功效的成分<sup>[1-3]</sup>,同时,在相应药材中含量适宜,因此,将这两种成分选为滋阴温阳活血颗粒含量测定指标性成分较为科学、合理。

表 3 10 批供试品含量测定结果 (mg/g)

| 批号       | 山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷 | 腺苷    |
|----------|------------------|-------|
| 20170301 | 4.119            | 4.093 |
| 20170401 | 4.922            | 3.221 |
| 20170402 | 3.797            | 3.237 |
| 20170501 | 4.394            | 2.706 |
| 20170701 | 3.802            | 2.934 |
| 20170801 | 4.729            | 2.818 |
| 20170802 | 4.948            | 4.132 |
| 20170803 | 3.692            | 2.943 |
| 20170901 | 4.133            | 2.858 |
| 20171101 | 4.814            | 3.114 |

本研究对滋阴温阳活血颗粒中两种指标性成分进行了同时测定研究,建立了相关含量测定标准。所采用方法快速、高效、准确,能够科学评价滋阴温阳活血颗粒的质量。

参考文献

[1] 李乃谦. 熟地黄活性成分药理作用的研究进展[J]. 中国处方药,2015,15(1):14-15.  
[2] 李志强,曹文富. 山药及其主要活性成分药理作用研究进展[J]. 中国老年学杂志,2013,33(1):1975-1976.  
[3] 杨明明,袁晓旭,赵桂琴,等. 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展[J]. 承德医学院学报,2016,33(5):398-400.

(收稿日期:2018-10-16)

葛根:清凉通经 生津止泻

葛根为豆科植物野葛的干燥根,习称野葛。秋、冬二季采挖,趁鲜切成厚片或小块;干燥。葛根的茎、叶、花、果、根均可入药。《本草纲目》中这样记载:“葛,性甘、辛、平、无毒。主治:消渴、身大热、呕吐、诸痹,起阴气,解诸毒。”

头痛发热 葛根甘辛性凉,轻扬升散,对于风热感冒引起的头痛发热,风寒感冒引起的邪郁发热,伴见轻度恶寒、头痛无汗、目疼鼻干、口微渴、苔薄黄等病症的患者,有一定的疗效;对于患筋脉失养所致的项背强痛等病症的患者,有缓解外邪郁阻的功效。

热病消渴 葛根甘凉,于清热之中有生津止渴之功,对于热病津伤口渴、阴津不足导致的消渴症、内热消渴、口渴多饮、体瘦乏力等病症,可配伍不同中药,有很好的功效。

麻疹不透 葛根味辛性凉,有透发麻疹之功,对于麻疹初期,表邪外束、疹出不畅、乍冷乍热者,配伍不同中药有对应的功效。

热痢泄泻 葛根味辛升发,归入脾经,有止泻痢之效,对于表证未解,身热、下利臭秽、肛门有灼热感、湿热泻痢、热重于湿、脾虚泄泻等病症的患者,配伍不同中药有对应的治疗效果。

中风胸痹头痛 葛根味辛能行,有通经活络之功。对于中风偏瘫、胸痹心痛、眩晕头痛、血压偏高、颈项强痛者,配伍不同中药有对应的功效。

酒毒伤中 葛根味甘能解酒毒,对于酒毒伤中、恶心呕吐、脘腹痞满者,配伍不同中药有对应的功效。

高血糖、高血压、高血脂 葛根通过减少动脉粥样硬化的发生率而产生降压作用;改善地塞米松造成的大鼠胰岛素抵抗等有一定的治疗效果。

心脑血管疾病 葛根通过扩张脑血管、增加脑血流量、改善心肌缺血等作用,达到治疗心脑血管疾病的目的。(http://paper.cntcm.com.cn/html/content/2019-06/12/content\_616423.htm)