

HPLC 法测定贞芪扶正胶囊中两种异黄酮类成分的含量

王永伏 杜晓娜

衡水市中医医院 河北衡水 053000

【摘要】目的 探讨 HPLC 法测定贞芪扶正胶囊中两种异黄酮类成分含量的效果。方法 选择 HPLC 法；流动相（甲醇-水）；色谱柱（Kromasil ODS-1 柱）；梯度洗脱，流速设置为 1.0 ml min^{-1} ，测定波长 254 nm 。结果 经测定，毛蕊异黄酮与芒柄花素的线性范围都较为良好，且毛蕊异黄酮的回收率，明显高于芒柄花素，所以说其含量要高于芒柄花素。结论 选择 HPLC 法，对贞芪扶正胶囊中的两种异黄酮类成分含量进行测定，具有简单、快速、准确等优势，能够为的后续贞芪扶正胶囊的质量控制提供更多的数据参考。

【关键词】HPLC 法；贞芪扶正胶囊；异黄酮类成分

贞芪扶正胶囊是一种中药制剂，主要由女贞子和黄芪等药材制成。它的主要功效是滋补气阴，益气养阴，适用于长期虚损，气阴不足的人群。女贞子是一种常见的中药材，具有扶正固本，养肝肾，明目乌发的作用。现代药理研究表明^[1]，女贞子具有护肝、调节免疫、抗氧化和抗老化、降血糖、降血脂、抗肿瘤和抗炎等多种功效。贞芪扶正胶囊已被列入国家药典（17 卷）^[2]，其中对黄芪的质量进行了控制，但由于中药的复杂性，无法仅对某一种药材进行定性和定量评价。因此，需要结合中国药典和相关研究，采用高效液相色谱分析技术，确定了贞芪扶正胶囊中异黄酮类成分的含量，从而为其质量控制奠定了基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器：Water600E 型 HPLC 系统，包括联机脱气器、四路泵、2996 型双管阵列探测器、入式取样器、温箱以及米林姆 32 层析处理工作站。

1.2 试剂：上海建信化学提供的正丁醇，山东禹王禹城化工厂提供的甲醇（HPLC 纯），兰州医学院第一医院提供的超纯水，上海中医学院提供的毛蕊异黄酮，兰州制药提供的贞芪扶正胶囊。

2 方法与结果

2.1 色谱条件：使用 Kromasil ODS-1 柱（ $5\mu\text{ m}$ 、 $4.6\times 250\text{ mm}$ ）和 Kromasil ODS-1 柱（ $5\mu\text{ m}$ 、 $4.6\times 250\text{ mm}$ ），甲醇-水作为梯度洗脱流动相，进样量为 $10\mu\text{ L}$ ，检测波长为 254 nm ，流速为 1.0 ml/min ，柱温为 25° C 。流动相组成结果见表 1：

表 1 流动相组成（甲醇-水）

Time (min)	Water (%)	Methanol (%)
0	39	61
9	51	51
28	58	42
49	61	39

2.2 加样回收率试验：精确称取毛蕊异黄酮 1.88 mg ，将其用甲醇超

声波溶解于 2 ml 小瓶中。取 0.1 ml 毫升备用溶液，并将其溶解成 1 ml 。精密取出 $50\mu\text{ l}$ 于 2 ml 小瓶子中，用甲醇溶至刻度，得到标准液。精确称量芒柄花 1.86 mg ，按照相同的工艺制备。取样量分别为 $2, 4, 6, 8, 10, 12\mu\text{ l}$ ，通过峰面积对取样量进行回归分析。得到两种物质的回归公式及相关系数如下：

$$Y=2.30\text{ e}+005\text{ X}-1.86\text{ e}+005, r=0.999534$$

$$Y=2.42\text{ e}+005\text{ X}-1.93\text{ e}+005, r=0.999840$$

线性范围分别为： $4.700\times 10^{-3}\sim 2.820\times 10^{-2}\mu\text{ g}$ ， $4.650\times 10^{-3}\sim 2.790\times 10^{-2}\sim 2.650\times 10^{-3}\sim 2.790\times 10^{-2}\mu\text{ g}$ 。在进行加样回收率试验时，需要取出储备溶液中的标准对照品，并对 1 号试样进行定量添加，并进行反复测量以确定回收率。结果如表 2：

表 2 加样回收率试验结果

不同成分	测得数值 ($\mu\text{ L}$)	加入值 ($\mu\text{ L}$)	回收率 (%)
毛蕊异黄酮	18.206	18.182	100.132
	18.583	18.182	102.205
	18.361	18.182	100.984
	18.665	18.182	102.656
芒柄花素	16.721	18.182	91.965
	16.481	18.182	90.645
	16.606	18.182	91.332

2.3 样品溶液的制备：将 20000 g （5 粒）精确称取贞芪扶正胶囊，使用甲醇进行 3 次超声波浸提（每次 30 分钟）。除去甲醇后，将提取物溶于 30 ml 毫升蒸馏水，并进行 4 次提取，使用饱和正丁醇（分别为 $40, 30, 20$ 和 20 ml ）。这样可以使正丁醇合并，并分离出正丁醇组分。随后，在减压条件下进行干燥。将残余物用 10 ml 毫升甲醇定溶，并通过 $0.45\mu\text{ m}$ 微孔滤膜过滤。最后，经过 2.1 步骤，测定续滤液的含量。具体含量计算结果见表 3：

表3 贞芪扶正胶囊中两种黄酮类成分的含量

成分	1 (2003703)	2 (20030202)	3 (20030605)
毛蕊异黄酮	4.182 ± 0.234	2.691 ± 0.118	3.864 ± 0.036
芒柄花素	1.994 ± 0.107	2.691 ± 0.1152	0.707 ± 0.041

3 讨论

贞芪扶正胶囊中的两种异黄酮类成分在药理学上具有多种作用, 其中的异黄酮类化合物具有较强的抗氧化能力, 可以清除自由基, 减轻氧化应激对机体的损害, 保护细胞免受氧化损伤, 维护身体健康。异黄酮类成分能够抑制炎症反应的发生和发展, 减轻炎症引起的疼痛和不适, 对于炎症性疾病的治疗具有一定的效果。研究表明^[9], 某些异黄酮类成分具有抑制肿瘤细胞生长和扩散的作用, 对于预防和治疗某些肿瘤具有一定的潜力。此外, 异黄酮类化合物能够延缓细胞的老化过程, 减少皮肤的皱纹和色斑, 保持皮肤的年轻和健康。需要注意的是, 具体的作用效果可能会受到多种因素的影响, 如剂量、用药时间、个体差异等。

研究发现, 贞芪扶正胶囊中的两种异黄酮类成分可能与其他成分相互作用, 具体的药理作用还需要进一步的研究和验证。现阶段, 在此药物成分的测定中有多种方法, 如比色法、高效液相色谱法 (HPLC) 和薄层色谱法 (TLC) 等。其中比色法是一种简便的分析方法, 可以通过与特定试剂反应产生颜色, 然后利用比色计或分光光度计测定颜色的强度来确定异黄酮类成分的含量。TLC 是一种常用的色谱分离技术, 可以用于分离和鉴定贞芪扶正胶囊中的异黄酮类成分。通过在薄层板上涂抹样品, 然后将其与特定的移动相进行分离, 最后使用显色剂或紫外灯观察和测定异黄酮类成分的含量^[4]。HPLC 是一种常用的分析方法, 可以用于测定贞芪扶正胶囊中异黄酮类成分的含量。该方法通过将样品中的异黄酮类成分与特定的溶剂进行提取和分离, 然后使用高效液相色谱仪进行定量分析。具体的测定方法可以根据实际需要和实验条件进行选择和优化。在进行测定前, 需要准备好贞芪扶正胶囊的样品, 进行适当的提取和前处理, 然后按照所选择的方法进行测定。同时, 为了确保测定结果的准确性和可靠性, 建议在实验中设置对照品和质量控制措施。最后, 还需要对测定结果进行统计分析和数据处理, 以得出贞芪扶正胶囊中异黄酮类成分的含量。

现有资料证实, HPLC 法 (高效液相色谱法) 在测定贞芪扶正胶囊中两种异黄酮类成分时起到了重要的作用。HPLC 法可以对贞芪扶正胶囊中的两种异黄酮类成分进行定量分析, 准确测定它们的含量, 通过合适的色谱柱、流动相组成和检测波长的选择, 可以获得准确的峰定量和定量结果。这对于质量控制和质量评估非常重要, 有助于确保产品的稳定性和一致性^[5]。贞芪扶正胶囊中的异黄酮类成分被认为是其主要活性成分, 具有一定的药理作用。HPLC 法可以对这些成分进行定性分析, 确保产品

中的成分符合标准, 有助于评估产品的质量和疗效。此方法还能够检测贞芪扶正胶囊中两种异黄酮类成分的含量, 对于监测产品的质量稳定性和一致性, 以及控制生产过程中的质量变化具有重要意义。此外, 贞芪扶正胶囊中的两种异黄酮类成分可能来自不同的植物或来源, HPLC 法可以通过对比标准品的保留时间和峰形进行鉴别, 确认成分的溯源和纯度。在 HPLC 法的基础上, 可以了解两种异黄酮类成分进行分析和研究, 了解其分布规律、代谢途径和药效等方面的信息, 为进一步的药物研发提供依据。

本次研究结果证实, 通过对表 2 进行对比分析, 可以发现贞芪扶正胶囊中的异黄酮浓度高于芒柄花苷。同时, 也可以看到在 1 号药材中, 异黄酮和芒柄花苷的含量最高。从表 2 的数据可以得知, 由于芒柄花素的含量非常少, 这导致在综合分析数据时出现了很大的偏差。此外, 与毛蕊异黄酮相比, 芒柄花苷的相对标准偏差 (RSD) 更大。本研究首次建立了一种简便、准确、快速且重复性好的 HPLC 分析方法, 为贞芪扶正胶囊的质量标准奠定了基础^[6]。这主要是因为 HPLC 法 (高效液相色谱法), 能够对复杂的样品进行定性和定量分析。在贞芪扶正胶囊中测定两种异黄酮类成分时, 采用 HPLC 法具有高分辨率、高灵敏度、快速性以及精确性和重复性。此外, HPLC 法可以通过调整不同的色谱条件和检测波长, 适应不同样品的分析要求, 提供更多的分析选择。

由此可见, 将 HPLC 法应用到贞芪扶正胶囊中两种异黄酮类成分测定中, 不仅可以准确测出含量, 还具有可靠、准确和高效等特点。再加上, HPLC 法可以同时分析多种组分, 适用于贞芪扶正胶囊中两种异黄酮类成分的含量测定, 能够节省时间和成本, 并提高工作效率, 为质量控制和药物研发提供重要的数据支持。

参考文献:

- [1] 朱智芸, 赵毅, 车彦云, 王自梁. HPLC 法测定不同产地、不同干燥法葛根中主要异黄酮类成分的含量[J]. 云南民族大学学报 (自然科学版), 2022, 31 (2): 157-161.
- [2] 周礼仕, 潘小燕, 邱雯曦, 王毓杰, 邹利, 李聪颖, 卢明莉. HPLC 法测定葛根与粉葛中 6 个异黄酮类成分的含量[J]. 中药材, 2021, 44 (10): 2374-2378.
- [3] 许霞. 苗药芪胶升白胶囊化学成分分析及质量标准研究[D]. 北京中医药大学, 2021, 9 (3): 382-385.
- [4] 邓昕, 周淑娟, 王丽, 杨晓霞, 杨莹. 贞芪扶正胶囊联合常规西医对艾滋病患者疗效及对其 T 细胞免疫的影响[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48 (12): 1453-1456.
- [5] 高赛. 贞芪扶正胶囊全过程质量控制研究[D]. 贵州师范大学, 2020, 22 (13): 28-30.