

HPLC 法测定养血生发胶囊中 5 种活性成分

傅 予, 刘庆焕, 王文彤

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定养血生发胶囊中阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素和大黄素 5 种活性成分的方法。方法 安捷伦 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%冰醋酸, 采用梯度洗脱; 检测波长: 310 nm; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。结果 5 种成分均达到基线分离, 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系, 其平均回收率分别为 95.68%、100.02%、100.55%、103.03%、100.07%。结论 该方法简便、灵敏、准确, 在同一色谱检测条件下实现多指标成分同时测定, 为养血生发胶囊的质量评价和控制提供新的方法。

关键词: 养血生发胶囊; 阿魏酸; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷; 羌活醇; 异欧前胡素; 大黄素; 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(2013)02-0188-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.021

Determination of five active components in Yangxue Shengfa Capsule by HPLC

FU Yu, LIU Qing-huan, WANG Wen-tong

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of ferulic acid, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-*O*- β -D-goucosid, notopterol, isoimperatorin and emodin in Yangxue Shengfa Capsules by HPLC. **Methods** The HPLC analysis was performed on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) with acetonitrile-0.1% acetate acid as mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 310 nm, and the column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C with the injection volume of 20 μ L at a flow rate of 1 mL/min. **Results** Five components were well separated and showed a good linearity. The average recoveries of them were 95.68%, 100.02%, 100.55%, 103.03%, and 100.07%. **Conclusion** The method is simple, sensitive, and accurate, which could provide a new method for the quality control of Yangxue Shengfa Capsule.

Key words: Yangxue Shengfa Capsule; ferulic acid; 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-*O*- β -D-goucosid; notopterol; isoimperatorin; emodin; HPLC

养血生发胶囊是由熟地黄、川芎、何首乌、羌活、当归、木瓜、白芍、天麻、菟丝子 9 味中药组成, 具有养血祛风、益肾填精的作用, 主要用于血虚风盛、肾精不足所致的脱发^[1]。《中国药典》2010 年版一部“养血生发胶囊”项下仅对其中何首乌所含的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷进行了测定。本实验在先期完成养血生发胶囊指纹图谱研究^[2]的基础上, 建立单波长梯度洗脱法一次进样, 同时测定养血生发胶囊中 5 种活性成分的方法。本法简便、灵敏、准确, 对养血生发胶囊的质量控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

岛津 LC—10AT 高效液相色谱仪, 包括 PDA 二极管阵列检测器、二元泵、在线脱气装置、自动进样器、CLASS-VP 工作站(日本岛津公司); AE240 型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

阿魏酸(批号 110773-200611)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号 110844-200908)、羌活醇(批号 111820-201001)、异欧前胡素(批号 110827-200407)、大黄素(批号 110756-200110)对照品均由中国药品生物制品检定所提供。

收稿日期: 2012-12-14

作者简介: 傅 予 (1982—), 女, 硕士, 研究实习员, 2009 年获得中国科学院成都生物研究所药物化学硕士学位, 研究方向为中药化学、中药分析。Tel: (022) 27236182 E-mail: fyyyyy_82@126.com

养血生发胶囊(规格:0.5 g/粒,批号 J01094、J01095、J01096)由天津宏仁堂药业有限公司提供;乙腈(色谱纯,迪马科技有限公司);其他试剂均为分析纯;纯净水(杭州娃哈哈有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

安捷伦 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%冰醋酸(B);梯度洗脱,0~9 min, 5%A; 9~39 min, 5%~15%A; 39~71 min, 15%~49%A; 71~81 min, 49%~85%A; 81~90 min, 85%~90%A; 体积流量:1 mL/min; 检测波长:310 nm; 柱温:30 ℃; 进样量:20 μL。

2.2 对照品溶液制备

精密称定阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素

5 种对照品适量,加甲醇溶解并定容至刻度,制成含各成分质量浓度分别为 23.8、110、63.4、35.6、73.6 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75%甲醇 125 mL,称定质量,加热回流提取 30 min,放冷,复称质量,用 75%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 专属性试验

按处方中药味的比例,自配不含川芎、何首乌、羌活、当归的中药,按其工艺制成空白制剂,以供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。取混合对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各 20 μL 进样测定,结果与供试品溶液色谱图比较可以发现,在待测组分的相应位置无干扰。见图 1。

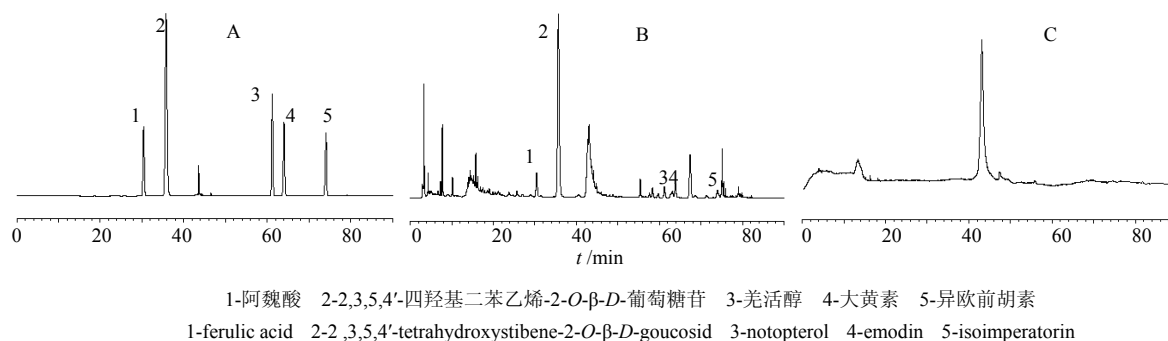


图 1 混合对照品(A)、养血生发胶囊(B)和阴性样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Yangxue Shengfa Capsule (B), and negative sample (C)

2.5 线性关系考察

精密吸取阿魏酸(60.2 μg/mL)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(251.6 μg/mL)、羌活醇(61.2 μg/mL)、异欧前胡素(30.8 μg/mL)、大黄素对照品溶液(126.0 μg/mL)各 1.5、3.0、5.0、6.0、8.0、10.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。以峰面积积分值为纵坐标,进样质量为横坐标,制定标准曲线,得回归方程及线性范围,见表 1。

2.6 精密度试验

精密量取混合对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,计算得阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素峰面积值的 RSD 值分别为 0.27%、0.31%、0.54%、

表 1 回归方程及线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges

成 分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
阿魏酸	$Y=6 \times 10^6 X+169\ 282$	0.999 6	0.181~1.204
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=3 \times 10^6 X-204\ 218$	0.999 8	0.755~5.032
羌活醇	$Y=3 \times 10^6 X-100\ 229$	0.999 2	0.184~1.224
异欧前胡素	$Y=4 \times 10^6 X-74\ 598$	0.999 5	0.092~0.616
大黄素	$Y=4 \times 10^6 X-222\ 124$	0.999 7	0.378~2.520

0.62%、0.59%。

2.7 稳定性试验

精密称取养血生发胶囊(批号 J01094)适量,

制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定峰面积, 计算质量分数, 结果样品中阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素质量分数的 RSD 值分别为 1.57%、1.85%、1.36%、1.59%、1.71%, 表明供试品溶液 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取同一批号养血生发胶囊(批号 J01094) 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素的平均质量分数分别为 0.144、1.883、0.212、0.149、0.287 mg/g, RSD 值分别为 1.80%、1.84%、1.96%、1.72%、1.90%。

2.9 回收率试验

精密称取批号 J01094 的养血生发胶囊样品 5 g, 平行 6 份, 分别精密加入 50 mL 含阿魏酸 15.2 μ g/mL、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 187.6 μ g/mL、羌活醇 24.8 μ g/mL、异欧前胡素 12.0 μ g/mL、大黄素 28.6 μ g/mL 的混合对照品溶液, 制备供试品溶液, 进行测定。结果阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素的平均回收率分别为 95.68%、100.02%、100.55%、103.03%、100.07%, RSD 值分别为 0.70%、0.34%、1.49%、1.33%、0.33%。

2.10 样品测定

分别取 3 批样品, 制备供试品溶液, 进行测定, 采用外标法计算各成分的质量分数, 结果见表 2。

表 2 养血生发胶囊中活性成分的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of active components in Yangxue Shengfa Capsule ($n=3$)

批 号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	阿魏酸	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷	羌活醇	异欧前胡素	大黄素
J01094	0.141	1.834	0.211	0.149	0.262
J01095	0.144	1.825	0.203	0.148	0.266
J01096	0.146	1.805	0.208	0.154	0.271

3 讨论

3.1 提取方式的确定

取批号 J01094 样品进行超声、加热回流提取,

提取时间均为 30 min, 结果加热回流提取的色谱峰面积比超声提取的色谱峰面积明显提高, 因此选择回流提取作为供试品溶液制备的提取方式。

3.2 提取溶剂的选择

取同一批号的养血生发胶囊(批号 J01094) 样品, 分别选取 50%、75%、90% 甲醇以及 50%、75%、95% 乙醇为提取溶剂, 比较待测化合物的峰面积, 发现 50% 甲醇提取不完全; 75% 甲醇提取完全, 峰全部分开, 峰形较好; 90% 甲醇峰形不好; 50% 乙醇提取不完全, 出峰数少; 75%、95% 乙醇提取峰形不好, 峰未分开, 基线不平。故选用 75% 甲醇作为提取溶剂。

3.3 提取时间的确定

考察了回流 20、30、60、90、120 min 5 个时间点, 发现回流 30 min 时阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素提取率最高, 随着回流时间的延长, 阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素的含量逐渐降低, 而因此确定回流时间为 30 min。

3.4 流动相的确定

由于阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、羌活醇、异欧前胡素、大黄素的极性差异较大, 在同一色谱条件下进行分析难度较大, 实验比较了多种流动相系统, 最后选择了文中的流动相及梯度。虽然有一定的漂移, 但经过与空白对照的色谱图比较和方法学验证, 证明对以上 5 个化合物的准确定量无影响, 并且出峰时间适当。

3.5 检测波长的确定

应用 DAD 对测定波长进行了考察。阿魏酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、羌活醇和异欧前胡素在 310~320 nm 有较大吸收, 大黄素在 230~254 nm 有较大吸收, 但是由于大黄素在含量范围比较稳定, 采用 310 nm 作为测定波长能够达到方法学考察的要求, 同时对 5 个化合物在同一波长下测定使方法更加简单, 增加了普遍适应性, 有利于推广普及。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 946-947.
- [2] 马丽娜, 傅 予, 张 岩, 等. 养血生发胶囊双波长融合 HPLC 特征图谱 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(19): 2326-2329.