

RP-HPLC 法测定田七痛经胶囊中阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A

张静娇, 康 凯, 赵月然, 高 珊, 胡景莲

大连市药品检验所, 辽宁 大连 116000

摘 要: 目的 建立高效液相色谱法测定田七痛经胶囊中阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 的方法。方法 选用 Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱, Thermo SCIENTIFIC Synchronis C₁₈ 色谱柱; 检测波长为 321、280 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35℃。结果 阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 的质量浓度与峰面积分别在 1.12~112.30、1.33~132.60、0.96~95.50 μg/mL 呈良好的线性关系; 回归方程分别为 $Y=46\,335\,540\,X+44\,186.71$ ($r=0.998$), $Y=14\,514\,060\,X+8\,715.27$ ($r=0.999$), $Y=22\,031\,250\,X+16\,472.10$ ($r=0.999$)。结论 该方法准确, 简便, 灵敏, 可作为田七痛经胶囊质量控制的方法。

关键词: 田七痛经胶囊; 阿魏酸; 藁本内酯; 欧当归内酯 A

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)09-1657-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.017

Determination of ferulic acid, ligustilide, levistolide A in Tianqi Tongjing Capsule by RP-HPLC

ZHANG Jingjiao, KANG Kai, ZHAO Yueran, GAO Shan, HU Jinglian

Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116000, China

Abstract: **Objective** Establishing a RP-HPLC method for the determination of the contents of Ferulic acid, Ligustilide and Levistolide A in tianqi tongjing capsule. **Methods** Thermo Acclaim C₁₈ column, Thermo SCIENTIFIC Synchronis C₁₈ column was used. The detection wavelength was set at 321 nm, 280 nm. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was maintained at 35℃. **Results** Ferulic acid was linear in the range from 1.12 to 112.30 μg/mL and the regression equation was $Y=46\,335\,540\,X+44\,186.71$ ($r=0.998$). Ligustilide was linear in the range from 1.33 to 132.60 μg/mL and the regression equation was $Y=14\,514\,060\,X+8\,715.27$ ($r=0.999$). Levistolide A was linear in the range from 0.96 to 95.50 μg/mL and the regression equation was $Y=22\,031\,250\,X+16\,472.10$ ($r=0.999$). **Conclusion** The method is accurate, simple and feasible, and can be used as an ideal method for the quality control of tianqi tongjing capsule.

Key words: Tianqi Tongjing Capsule; ferulic acid; ligustilide; levistolide A

田七痛经胶囊具有通调气血、止痛调经的作用, 用于经期腹痛及因寒所致的月经失调^[1]。现代药理学研究结果表明, 阿魏酸、藁本内酯和欧当归内酯 A 为起活性作用的有效成分, 在高效液相色谱中易检测^[2]。田七痛经胶囊现行有效的质量标准有: 卫生部《药品标准》中药成方制剂第十册(1995年); 国家食品药品监督管理局标准(试行) YBZ01402005; 国家食品药品监督管理局标准 YBZ13502009; 国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS[3]-B-1908-95-2; 国家食品药品监督管理局

总局国家药品标准 WS[3]-B-1908-95-5。上述标准均未对阿魏酸、藁本内酯和欧当归内酯 A 的含量进行限定, 故本文采用 RP-HPLC 分别测定田七痛经胶囊中阿魏酸、藁本内酯和欧当归内酯 A 的含量, 为本品的标准提高工作提供依据。阿魏酸、藁本内酯和欧当归内酯 A 主要来自田七痛经胶囊中的川芎药材, 可以通过其含量评价田七痛经胶囊中川芎的质量情况。

1 材料

高效液相色谱系统, Empower 工作站 (Waters

收稿日期: 2018-02-20

基金项目: 国家评价性抽验项目

第一作者: 张静娇(1984—), 女, 蒙古族, 主管中药师, 硕士, 从事中药检验、标准起草与复核、探索性研究等工作。Tel: (0411)84255292 E-mail: 13664228268@163.com

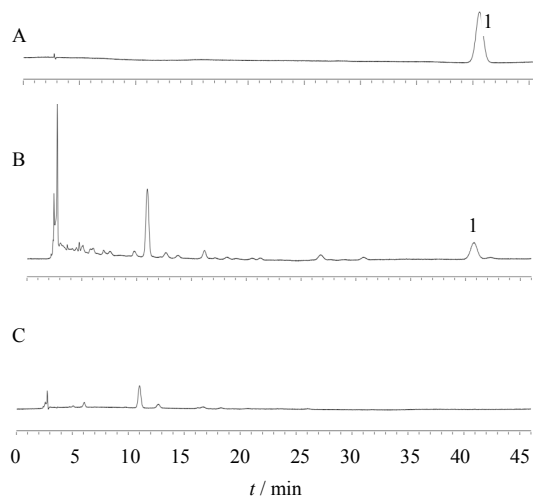
e2695-2998 型号 Waters 公司生产); Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Thermo SCIENTIFIC Synchronis C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 甲醇为色谱纯 (99.9%; Lot No 016953; Mreda Technology INC 公司生产), 水为超纯水 (Merck Millipore 公司 Milli-Q 型超纯水机提供)。阿魏酸 (110773-201614)、藁本内酯 (111737-201507) 及配制阴性样品的对照药材均购自中国药品生物制品检定研究院; 欧当归内酯 A (AP605L) 购自天津一方科技有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

阿魏酸的测定采用 Thermo Acclaim C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-1%乙酸 (20:80) 为流动相进行洗脱; 检测波长 321 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35℃; 进样量 10 μL。上述色谱条件下, 所有批次样品中阿魏酸分离度均良好, 见图 1。

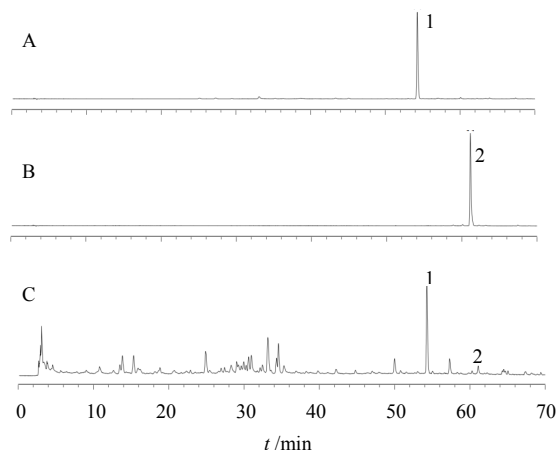
藁本内酯、欧当归内酯 A 的测定采用 Thermo SCIENTIFIC Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 (A) -1%乙酸 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 0~40 min (A 10%~50%), 40~70 min (A 50%~100%); 检测波长 280 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35℃; 进样量 10 μL^[3]。考察多种洗脱条件^[4-6], 上述色谱条件下, 所有批次样品中各组分分离度均良好, 见图 2。



A-阿魏酸对照品溶液; B-供试品溶液; C-缺川芎阴性样品; 1-阿魏酸
A-Ferulic Acid; B-Sample; C-Sample absence of *Ligusticum chuanxiong* Hort; 1-Ferulic Acid

图1 阿魏酸色谱图

Fig. 1 Ferulic Acid chromatograms



A-藁本内酯对照品溶液; B-欧当归内酯 A 对照品溶液; C-供试品溶液; D-缺川芎阴性样品; 1-藁本内酯; 2-欧当归内酯 A
A-Ligustilide; B-Levistolide A; C-Sample; D-Sample absence of *Ligusticum chuanxiong* Hort; 1-Ligustilide; 2-Levistolide A

图2 藁本内酯、欧当归内酯 A 色谱图

Fig. 2 Ligustilide, Levistolide A chromatograms

2.2 对照品溶液的制备

精密称取阿魏酸对照品 11.34 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。精密称取藁本内酯对照品 13.26 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 精密量取上述溶液 3 mL, 甲醇 3 mL, 混匀, 作为藁本内酯对照品溶液。精密称取欧当归内酯 A 对照品 9.55 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 精密量取上述溶液 0.5 mL, 甲醇 5.5 mL, 混匀, 作为欧当归内酯 A 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取田七痛经胶囊约 3.0 g, 精密称定, 精密加入 70%甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 用 70%甲醇补足减失质量, 摇匀, 过滤, 作为供试品溶液。

2.4 阴性溶液的制备

除去川芎对照药材, 按标准中“处方”及“制法”项下制备阴性样品, 取阴性样品约 3 g, 按“2.3”项下配制阴性溶液。经 DAD 色谱峰纯度及 UV 色谱确定, 阴性样品中含有少量 (小于 5%) 来自其它药材的藁本内酯, 不影响本实验结果。

2.5 线性关系考察

将上述对照品溶液分别稀释至不同质量浓度, 分别进样 10 μL, 以质量浓度对色谱峰面积进行最小二乘法线性回归, 分别绘制各对照品的标准曲线。

阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 的回归方程分别为 $Y=46\,335\,540X+44\,186.71$ ($r=0.998$), $Y=14\,514\,060X+8\,715.27$ ($r=0.999$), $Y=22\,031\,250X+16\,472.10$ ($r=0.999$); 线性范围分别为 1.12~112.30、1.33~132.60、0.96~95.50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 精密度考察

取同一供试品溶液连续进样 6 次,测得阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.8%、1.1%。表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性考察

取同一供试品溶液,分别于 0、6、12、24 h 进样测定。测得阿魏酸峰、藁本内酯、欧当归内酯 A 面积的 RSD 分别为 0.7%、0.9%、1.3%。结果表明供试品溶液中阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性考察

取同一批供试品,平行制备 6 份供试品溶液,测定,记录各组色谱峰面积。结果阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.0%、1.6%。表明该法重复性良好。

2.9 加样回收率实验

精密称定已知含量的田七痛经胶囊细粉 6 份,每份 1.5 g,分别精密加入与此供试品浓度相当的对照品溶液,按“2.3”项下操作制备供试液,进样 10 μL ,记录各色谱峰峰面积,计算阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 的平均回收率分别为 100.8%、102.2%、101.1%,RSD 分别为 2.0%、1.8%、1.9%。

2.10 检测限与定量限

取 2.3 项下供试品溶液,逐步稀释样品,按信噪比为 3 和 10 分别计算检测限和定量限。阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 的检测限分别为 0.03、0.09、0.18 $\mu\text{g/mL}$,定量限分别为 0.10、0.30、0.59 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.11 样品测定

取所收集的 21 个厂家共 103 批田七痛经胶囊,按“2.1”项下的方法进行测定,以外标法计算样品中 3 个成分的含量。结果见表 1。

2.12 结果分析

采用 SPSS22.0 版本软件对数据进行分析,结合 Z 值法与探索性研究法剔除数据中的极端值,对剩余的 94 批次数据进行正态性检验,符合正态分布。对数据进行相关性分析,阿魏酸与藁本内酯的

pearson 相关系数为 0.807,阿魏酸与欧当归内酯 A 的 pearson 相关系数为 0.610。经相关性分析,本实验中阿魏酸与藁本内酯含量强相关、阿魏酸与欧当归内酯 A 含量中强相关,用阿魏酸、藁本内酯、欧当归内酯 A 的含量共同评估田七痛经胶囊中川芎的质量情况是合理的。

《中国药典》2015 年版一部^[7]规定川芎药材的阿魏酸含量,按干燥品计算,含阿魏酸($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$)不得少于 0.10%。以川芎含水量最大值 12%,原料药入药转移率最低限度 90%计算,根据田七痛经胶囊生产工艺计算得出,阿魏酸的合格限度为 47.5 $\mu\text{g/粒}$ 。94 批正态分布的样品阿魏酸的含量均值为 66.3 $\mu\text{g/粒}$,计算出平均值与合格限度的折算因子为 0.717。阿魏酸与藁本内酯、欧当归内酯 A 有强、中强相关性,藁本内酯的含量均值 314.0 $\mu\text{g/粒}$,欧当归内酯 A 的含量均值 18.1 $\mu\text{g/粒}$,所以根据折算因子 0.717,计算得出藁本内酯的合格限度为 225.1 $\mu\text{g/粒}$ 、欧当归内酯 A 的合格限度为 13.0 $\mu\text{g/粒}$ 。

不同厂家质量情况见表 1。结合设立的合格限度、各厂家含量均值、不合格比例等数据,将 21 个厂家生产的田七痛经胶囊中的川芎质量分为差、中、好 3 档。其中质量差的为厂家 1、2、12、14、20,占调研 21 个厂家的 23.8%;质量中等的有厂家 11、13、16,占调研 21 个厂家的 14.3%;其余为质量好的厂家,占 61.9%。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本实验采用多种流动相系统进行分析,试图同时测得 3 种成分的含量,但是阿魏酸的分离效果均不理想,所以最后选定两种方法测定 3 种成分的含量,方法准确,可靠。

3.2 检测波长的选择

经 DAD 检测器进行全波长扫描,阿魏酸在 321 nm,藁本内酯和欧当归内酯 A 在 280 nm 两种成分同时测定吸收强度最大,最终被选定为测定波长。

3.3 川芎质量不合格原因分析

本品工艺简单,为药材粉碎直接入药,所以生产工艺不是影响川芎质量的主要原因。经查阅文献资料,川芎的质量与采收期^[8]和产地^[2]密切相关。建议厂家关注川芎的采收期及产地对川芎药材质量的影响,可适当节约成本,并提高药品质量。

表 1 田七痛经胶囊中川芎质量情况分析

Table 1 The quality of LigusticumchuanxiongHort in Tianqi Tongjing Capsule

厂家	检验批数	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{粒}^{-1}$)			不合格率/%			3 种成分均	3 种成分均
		阿魏酸	藁本内酯	欧当归内酯 A	阿魏酸	藁本内酯	欧当归内酯 A	不合格率/%	合格率/%
厂家 1	1	23.8	82.8	4.8	100	100	100	100	0
厂家 2	1	0.0	120.3	27.0	100	100	0	0	0
厂家 12	13	35.5	174.1	11.8	92	77	8	38	0
厂家 14	2	43.8	203.1	13.2	50	50	1	50	50
厂家 20	3	32.0	90.3	14.7	100	100	1	33	0
厂家 11	5	50.7	168.3	16.8	0	100	0	0	0
厂家 13	5	50.1	311.9	14.8	60	0	60	0	0
厂家 16	4	50.4	231.6	11.4	25	50	75	25	25
厂家 3	2	64.0	296.0	38.8	0	50	0	0	50
厂家 4	7	74.1	263.5	21.9	0	29	0	0	71
厂家 5	3	86.8	366.9	25.2	0	0	0	0	100
厂家 6	8	76.2	388.9	22.4	0	0	0	0	100
厂家 7	2	71.4	270.8	16.0	0	0	0	0	100
厂家 8	3	91.7	384.4	19.2	0	0	0	0	100
厂家 9	1	66.5	397.2	18.5	0	0	0	0	100
厂家 10	9	88.6	406.2	19.7	0	11	0	0	89
厂家 15	2	69.7	291.2	29.7	0	0	0	0	100
厂家 17	14	70.6	437.4	14.7	14	0	36	0	64
厂家 18	8	99.0	451.9	27.8	0	0	0	0	100
厂家 19	3	77.0	413.3	36.0	0	0	0	0	100
厂家 21	7	85.4	495.4	28.7	0	0	0	0	100

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局标准 YBZ13502009 [S]. 2009.
- [2] 王 虎, 李文兵, 胡昌江, 等. 不同产地川芎主要有效成分含量比较 [J]. 中国药业, 2015, 24(21): 37-39.
- [3] 刘小丽, 石 丽, 李 华. 川芎药材 HPLC 指纹图谱及阿魏酸测定研究 [J]. 中成药, 2011, 33(8): 1289-1292.
- [4] 王文燕, 赵 强, 张铁军, 等. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980-1983.
- [5] 刘 洋, 石任兵, 刘 斌, 等. 川芎药材化学成分 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(5): 335-337.
- [6] 田 璐, 闫海霞, 傅欣彤, 等. 一测多评法同时测定川芎、当归饮片中多种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 848-854.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 刘金亮, 范巧佳, 郑顺林, 等. HPLC 测定不同采收期川芎药材中 5 种药效成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1650-1655.