

RP-HPLC 波长切换法同时测定妇康片中 3 种成分的含量

魏桂林, 李泽玲, 吴珺, 郭春钰*

(赣南医学院第一附属医院药剂科, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 同时测定妇康片中芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸含量的方法。方法: 采用 Sepax C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm (0 ~ 16 min, 芍药苷)、280 nm (16.1 ~ 25 min, 延胡索乙素)、320 nm (25.1 ~ 50 min, 阿魏酸), 柱温 30 °C。结果: 芍药苷、延胡索乙素、阿魏酸分别在 0.242 ~ 2.42, 0.02 ~ 0.203, 0.045 ~ 0.448 μg ($r \geq 0.999 6$) 呈良好的线性关系, 平均回收率为 99.75%, 100.33%, 100.45%, RSD 分别为 0.61%, 1.46%, 1.73%。结论: 该 HPLC 方法简单, 灵敏度高, 可用于同时测定妇康片中芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸的含量。

[关键词] 妇康片; 芍药苷; 延胡索乙素; 阿魏酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0058-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110058

[收稿日期] 20131111(015)

[基金项目] 赣州市指导性科技计划项目(201308128)

[第一作者] 魏桂林, 主任药师, 从事中药制剂分析, Tel: 0797-8685504, E-mail: weiguilin@sina.com

[通讯作者] * 郭春钰, 副主任药师, 从事药物制剂研究, E-mail: 836177476@qq.com

酸性环境中稳定^[13]有关。

本试验经稳定性考察, 得到相关含量测定指标变化在不同阶段虽有统计学差异, 但符合质量标准有关含量变化幅度在 10% 内视为有效要求^[16]。因此, 按稳定性试验要求, 根据 MSZST 有关指标成分结果确定: MSZST 稳定性符合要求, 有效期常温下大于 24 个月、低温下大于 36 个月。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 2000: 1169.

[2] 木塔力甫·艾力阿吉. 维吾尔医妇产科学[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2005.

[3] 阿不力克木·努尔买买提阿吉, 阿不力米提·穆哈木得. 维吾尔医内科学[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2005.

[4] 吐尔洪·吾买尔, 阿尔甫·买买提尼牙孜, 艾力·肉孜, 等. 维吾尔医五官科学[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2005.

[5] 吐尔洪·吾买尔, 阿尔甫·买买提尼牙孜, 艾力·肉孜, 等. 维吾尔医外科学[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2005.

[6] 吐尔洪·吾买尔, 艾力·肉孜. 维吾尔医皮肤科学[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 2003.

[7] 张雅丽. 五倍子没食子酸的制备、抑菌作用及机理研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.

[8] 王启林, 房敏峰, 吴洋, 等. 远志炮制品的稳定性影响因素考察[J]. 中成药, 2011, 33(3): 486.

[9] 崔福德主编. 药剂学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 78.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 X B62, 附录 VII G45.

[11] 任源. 没食子化学成分及溃结安灌肠剂的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2005.

[12] 木巴拉克·伊明江, 迪力努尔·艾合买提, 曾灿丽, 等. 维药西帕依溃结安灌肠剂质量标准考察[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(17): 1397.

[13] 吴雪钗, 于波涛, 侯艾林, 等. 没食子酸稳定性研究[J]. 西南国防医药, 2006, 16(5): 484.

[14] 任源, 堵年生. HPLC 测定没食子中没食子酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1): 071.

[15] 苏冬梅, 赵彬. 不同预处理对板栗叶片中总酚含量和多酚氧化酶活性的影响[J]. 经济林研究, 2005, 22(4): 11.

[16] 刘静, 雪国莲, 颜永刚, 等. 太白洋参药材稳定性研究[J]. 现代中医药, 2012, 32(1): 60.

[责任编辑 顾雪竹]

RP-HPLC with UV Switch Determination of Three Active Components in Fukang Tablet

WEI Gui-lin, LI Ze-lin, WU Jun, GUO Chun-yu*

(Department of Pharmacy, The First Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] Objective: To establish a simultaneous determination method for paeoniflorin, tetrahydropalmatine and ferulic acid in Fukang tablet. **Method:** The determination was performed on a Sepax C₁₈ column with acetonitrile-0.1% ammoniacal water as the mobile phase. The detection wavelength were at 230 nm (0-16 min, paeoniflorin), 280 nm (16.1-25 min, tetrahydropalmatine) and 320 nm (25.1-50 min, ferulic acid), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C. **Result:** The paeoniflorin, tetrahydropalmatine and ferulic acid presented a good linearity in the concentration range of 0.242-2.42, 0.02-0.203, 0.045-0.448 μg ($r \geq 0.9996$), The average rate of recovery was 99.75%, 100.33% and 100.45% with RSD = 0.61%, 1.46%, 1.73% ($n = 6$) respectively. **Conclusion:** This method was simple, accurate and reproducible, it can be used to determine the content of paeoniflorin, tetrahydropalmatine and ferulic acid in Fukang tablet.

[Key words] Fukang tablet; paeoniflorin; tetrahydropalmatine; ferulic acid

妇康片由益母草、延胡索(醋制)、白芍、当归、人参等 11 味药材加工制成,具有补气、养血、调经的功效,用于气血两亏、体虚无力、月经不调、经期腹痛等。该制剂原为《中华人民共和国卫生部药品标准》WS3-B-2319-97 收载的成方制剂。现行标准中仅有显微鉴别和延胡索的薄层色谱鉴别项,而无含量测定项,在质量控制中尚存不足。延胡索、白芍、当归及川芎为方中主要药材,含延胡索乙素、芍药苷及阿魏酸等多重有效成分,有关单独或同时测定妇康片中 1 种^[1-2]或同时测定其中 2 种成分研究^[3]已有报道,但尚未见同时测定妇康片中芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸的研究报道,因此本文参考文献^[1-3],采用 HPLC 切换波长法^[4-7]同时测定妇康片中芍药苷、延胡索乙素与阿魏酸的含量,旨在为该制剂的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent), AB135-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒), KQ-200 VDE 型超声波仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 芍药苷(批号 110736-200935)、延胡索乙素(批号 110726-201003)、阿魏酸(批号 0773-9910)对照品购于中国食品药品检定研究院,乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯,妇康片市售(长春银诺克药

业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8] Sepax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B), 梯度洗脱见表 1, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 230 nm (0~16 min, 芍药苷)、280 nm (16.1~25 min, 延胡索乙素)、320 nm (25.1~50 min, 阿魏酸), 进样量 20 μL。

表 1 流动相梯度

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸水/%
0	16	84
12	18	82
26	20	80
40	28	72
50	100	0

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取芍药苷、延胡索乙素与阿魏酸对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,用 70% 甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 含 121.04 μg 芍药苷、10.14 μg 延胡索乙素及 22.42 μg 阿魏酸的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取妇康片 20 片,研细,取约 0.5 g,精密称定,置于 10 mL 棕色量瓶中,加 70% 甲醇约 8 mL,超声提取(功率 200 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,用 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,

微孔滤膜(0.22 μm)过滤,即得。

2.2.3 阴性样品溶液制备 按处方比例及制法分别制备不含白芍、延胡索、川芎和当归的 3 种妇康片阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性样品溶液各 20 μL,照上述色谱条件下进样分析,结果表明:供试品色谱图中,在与芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸对照品色谱相同的保留时间处有色谱峰,与其他组分基线分离,分离度均 > 2.0,理论塔板数分别为 439 561, 30 125, 30 145, 阴性对照色谱中,无干扰峰见图 1。

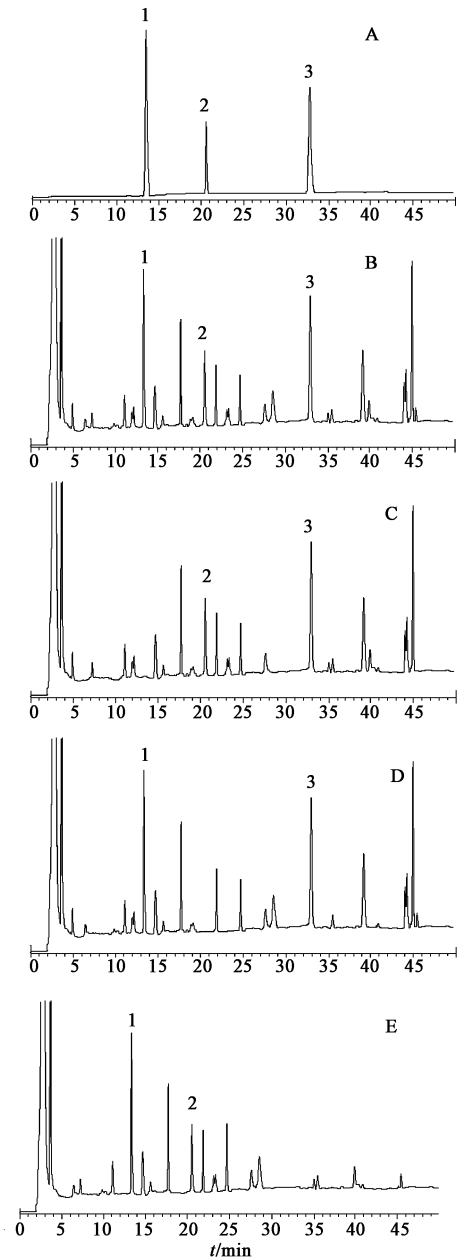
2.4 线性关系考察 分别准确吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 置 2 mL 棕色量瓶中,用 70% 甲醇定容,摇匀。按 2.1 项色谱条件进样测定,以 3 种成分的峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸的回归方程为分别为 $Y = 71\,314X - 33.69$ ($r = 0.999\,7$), $Y = 10\,131X - 18.14$ ($r = 0.999\,8$), $Y = 15\,634X - 28.71$ ($r = 0.999\,6$), 表明芍药苷在 0.242 ~ 2.42 μg、延胡索乙素在 0.02 ~ 0.203 μg、阿魏酸在 0.045 ~ 0.448 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取质量浓度为 48.41 mg·L⁻¹ 芍药苷、4.05 mg·L⁻¹ 延胡索乙素、8.90 mg·L⁻¹ 阿魏酸的混合对照品溶液 20 μL,按上述色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积,结果芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸的 RSD 分别为 0.69%, 0.82%, 1.03%, 表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批样品研细,称取约 0.5 g,共 6 份,精密称定,置 10 mL 棕色量瓶中,照供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算样品含量。结果芍药苷、延胡索乙素及阿魏酸平均含量的分别为 1.63 mg·g⁻¹, 52.26 μg·g⁻¹ 及 0.26 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.93%, 2.31%, 1.96%, 表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μL,按上述色谱条件,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h,测定芍药苷、延胡索乙素峰及阿魏酸的峰面积,计算 RSD 分别为 2.01%, 2.18%, 1.84%。结果表明供试品溶液中芍药苷、延胡索乙素与阿魏酸 12 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量(含芍药苷 1.62 mg·g⁻¹、延胡索乙素 52.18 μg·g⁻¹、阿魏酸



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 白芍阴性对照;
D. 延胡索阴性对照; E. 当归、川芎阴性对照;
1. 芍药苷; 2. 延胡索乙素; 3. 阿魏酸

图 1 妇康片 HPLC

(0.26 mg·g⁻¹) 的妇康片 20 片,研细,平行称取 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密加入含 400.92 mg·L⁻¹ 芍药苷、13.75 mg·L⁻¹ 延胡索乙素与 68.42 mg·L⁻¹ 阿魏酸混合对照品溶液 1 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试溶液,并按 2.1 项下的色谱条件进行含量测定,计算回收率。结果见表 2。

2.9 样品含量测定 取 3 批样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下的色谱条件,对样品含量测定,结果见表 3。

表 2 妇康片中 3 种成分加样回收率试验

名称	样品 含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
	芍药苷	403.14	400.92	805.09	100.26	99.75
	404.12		806.91	100.47		
	402.65		802.78	99.80		
	405.01		801.12	98.80		
	404.67		802.72	99.28		
	403.41		803.87	99.89		
延胡索乙素	12.99	13.75	26.83	100.69	100.33	1.46
	13.02		26.71	99.59		
	12.97		27.01	102.11		
	13.05		26.97	101.27		
	13.03		26.49	97.86		
	12.99		26.81	100.48		
阿魏酸	64.70	68.42	134.96	102.69	100.45	1.73
	64.86		132.12	98.31		
	64.62		132.83	99.69		
	65.00		133.92	100.73		
	64.95		134.88	102.21		
	64.74		132.54	99.09		

表 3 妇康片中 3 种成分的含量测定

名称	批号			平均	RSD
	20130203	20130205	20130211	/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	/%
芍药苷	1.62	1.61	1.64	1.623	0.94
延胡索乙素	0.052	0.051	0.051	0.051	1.12
阿魏酸	0.256	0.263	0.269	0.263	2.48

3 讨论

由于中成药成分的复杂性和多样性,目前在中成药的质量控制方面,倾向于多成分、多指标控制。妇康片原标准太过简单,在该品的质控中稍显不足。芍药苷、延胡索乙素阿魏酸是妇康片中芍药、延胡索、川芎与当归的主要有效成分,本文采取了芍药苷、延胡索乙素与阿魏酸同时检测,使得一次检测可控制方中 4 味药的质量。

文献中^[3]采用单波长测定,仅能保证芍药苷在此波长下的灵敏度最高,而其他指标成分无法达到最大紫外吸收,导致灵敏度下降。为了能真实、准确反映妇康片中芍药苷、延胡索乙素与阿魏酸的含量,本试验中分别选定 3 种成分各自的最大吸收波长

230,280,320 nm 作为检测波长,结合不同时间切换波长法^[5]测定妇康片中 3 种成分的含量。

同时测定多个成分含量,采用梯度洗脱可以节省分析时间,本实验比较使用甲醇/乙腈-水、甲醇/乙腈-磷酸溶液、乙腈-醋酸溶液等流动相系统,结果表明乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相系统梯度洗脱,3 种指标成分的峰形较好,与杂质达到基线分离,分离效果最好。

由于妇康片中阿魏酸、芍药苷见光、受热不稳定^[9-10],所以样品制备过程中采用棕色量瓶进行超声提取,参考文献报道^[1]超声提取保证水温低于 30℃。本试验结果表明 70% 甲醇的提取效果最好。

[参考文献]

- [1] 王健,范文成,叶晓红,等. HPLC 测定妇康片中阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(8):15.
- [2] 夏军龙,张鹏,李巧如,等. HPLC 法测定妇康片中延胡索乙素的含量[J]. 现代中医药, 2006, 26(4):48.
- [3] 李中娥,王春颖. HPLC 同时测定妇康片中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):143.
- [4] 郑琴,郝伟伟,杨明,等. RP-HPLC 同时测定止痛方提取物中 6 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7):1269.
- [5] 吴坚,吉灵,王丽芳,等. HPLC 波长切换法测定止痛片中芍药苷与胡椒碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(15):140.
- [6] 王琿,张振秋. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(5):116.
- [7] 李伟铭,赵月然,杨燕云,等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12):2208.
- [8] 周军,孙艳,张晶,等. HPLC 法测定血府逐瘀颗粒中芍药苷、阿魏酸、柚皮苷及甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8):1253.
- [9] 解江纯,刘志东,田慧,等. 芍药苷稳定性研究[J]. 天津中医药, 2010, 27(4):344.
- [10] 吕海涛,王艳丽,王英芹. 当归提取液中阿魏酸稳定性研究[J]. 中成药, 2008, 30(10):1555.

[责任编辑 顾雪竹]