

HPLC同时测定调经活血片中芍药苷、 阿魏酸、金丝桃苷的含量

谢媛^{1,2*}, 涂瑶生², 施之琪², 周蓉^{1,2}

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广州 510095)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 同时测定调经活血片中芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷的含量。方法: 采用 Eclipse-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸 (14:86), 流速 1.00 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测器 DAD, 检测波长 230 nm (芍药苷), 316 nm (阿魏酸), 360 nm (金丝桃苷)。结果: 芍药苷在 160.0 ~ 1280.0 μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.999 6$), 平均回收率为 98.38%, RSD 1.51%; 阿魏酸在 67.5 ~ 540.0 μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.999 3$), 平均回收率为 98.33%, RSD 1.21%; 金丝桃苷在 17.2 ~ 137.6 μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.999 8$), 平均回收率 98.71%, RSD 1.27%。结论: 该方法简便、灵敏、准确、重复性好, 可用于调经活血片的质量控制。

[关键词] 调经活血片; 芍药苷; 阿魏酸; 金丝桃苷; 高效液相色谱;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170084

Silmultaneous Determination of Paeniflorin, Ferulic Acid and Hyperoside in Tiaojing Huoxue Pills by HPLC

XIE Yuan^{1,2*}, TU Yao-sheng², SHI Zhi-qi², ZHOU Rong^{1,2}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangdong Province Engineering and Technology Research Institute of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** The study was aimed to determine the contents of paeniflorin, ferulic acid and hyperoside in Tiaojing Huoxue pills by HPLC. **Method:** The chromatographic column was Eclipse-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (14:86) as mobile phase. The flow rate was fixed at 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained 25 °C and the detector was DAD. The detection wavelengths were set at 230 nm, 316 nm for paeniflorin, ferulic acid and hyperoside, respectively, the detection wavelength of hyperoside was set at 360nm. **Result:** There is good linear relationship within the range of 160.0-1280.0 μg for paeniflorin, 67.5-540.0 μg for ferulic acid, and 17.2-137.6 μg for hyperoside. The average recoveries of paeniflorin, ferulic acid and hyperoside were 98.38% (RSD of 1.51%), 98.33% (RSD of 1.21%) and 98.71% (RSD of 1.27%) respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible. It can be used for the quality control of Tiaojing Huoxue pills.

[Key words] Tiaojing Huoxue pills; paeniflorin; ferulic acid; hyperoside; HPLC

调经活血片由菟丝子、当归、川芎、赤芍、熟地黄、香附等 15 味药组成, 收载于卫生部药品标准《中药成方制剂》(部颁标准编号 WS3-B-0614-91)。具有舒肝解郁、调经活血功效, 常用于治疗月经不

调、行经腹痛等证。原质量标准中仅有显微和薄层鉴别, 无含量测定。目前对于调经活血片的含量测定文献报道较少, 仅有对芍药苷^[1-2]或者木香烃内酯、去氢木香内酯^[3]的含量测定, 成分指标单一, 不

能够很好地控制产品质量。为保证临床用药安全有效,本文以高效液相色谱法同时测定调经活血片中君药菟丝子的主要有效成分金丝桃苷,臣药当归、川芎的有效成分阿魏酸,赤芍的有效成分芍药苷,以期更好地控制其产品质量。

1 材料

1200系列高效液相色谱仪(美国Agilent,含二元梯度泵、自动进样器、DAD检测器等),XS205DU型分析天平(瑞士-梅特勒),KA2500DE型数控超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司)。芍药苷(批号110736-201136)、阿魏酸(批号110773-200911)、金丝桃苷(批号111521-201205)对照品,均购自中国食品药品检定研究院,乙腈(色谱纯,德国Merck),水为超纯水,其他试剂均为分析纯;调经活血片(湖南金沙药业有限责任公司,批号130602,130901,131002,规格0.5g/片)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Elipse-C₁₈色谱柱(4.6mm×150mm,5μm),流动相乙腈-0.1%磷酸(14:86),检测波长230nm(芍药苷),316nm(阿魏酸),360nm(金丝桃苷),柱温25℃,流速1.0mL·min⁻¹。

2.2 溶液的制备

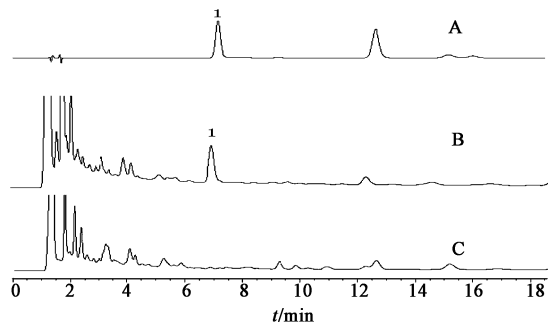
2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷对照品适量,精密称定,加甲醇稀释制成含芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷分别为160.0,67.5,17.2mg·L⁻¹的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取调经活血片10片,小心除去糖衣,研细,取约1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50mL,称定质量,超声(功率240W,频率90kHz)30min,取出放冷,称重,用甲醇补足减失的质量。摇匀,滤过,精密取续滤液10mL,水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容至5mL量瓶,摇匀,即得。进样前过0.45μm微孔滤膜。

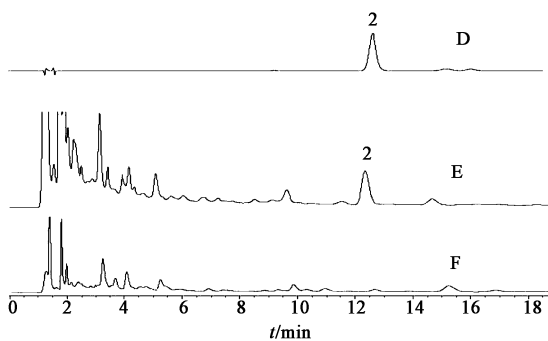
2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例分别制备不含赤芍、不含当归和川芎、不含菟丝子的3份阴性对照样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按2.1项下色谱条件分别进样分析,每次进样10μL。结果供试品溶液色谱图中,在与芍药苷(230nm)、阿魏酸(316nm)和金丝桃苷(360nm)对照品色谱相同的保留时间处有色谱峰,与其他组分能达到基线分离,分离度>1.5;阴性对照色谱中,在与芍药苷、阿魏酸和金丝桃苷对照品色谱峰相应的位置上无干扰峰,说明供试品溶液的其

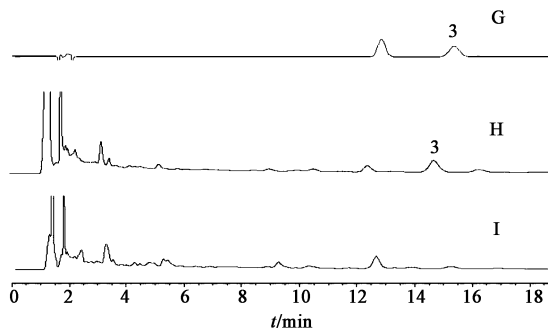
他成分对测定结果无影响,见图1~3。



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 缺芍药阴性对照;1. 芍药苷
图1 调经活血片中芍药苷 HPLC(230 nm)



D. 混合对照品;E. 供试品;
F. 缺当归、川芎阴性对照;2. 阿魏酸
图2 调经活血片中阿魏酸 HPLC(316 nm)



G. 混合对照品;H. 供试品;
I. 缺菟丝子阴性对照;3. 金丝桃苷
图3 调经活血片中金丝桃苷 HPLC(360 nm)

2.4 线性关系的考察 依次精密吸取2.2.1项下的混合对照品1.0,2.0,4.0,6.0,8.0mL置10mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述2.1项色谱条件测定,分别进样10μL。以测得的芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,分别绘制标准曲,结果见表1。

2.5 精密度试验 分别精密吸取混合对照品溶液各10μL,重复进样6次,每次进样10μL,测定峰面积,RSD分别为1.2%,1.3%,1.2%,表明精密度良好。

表 1 线性关系考察

对照品	线性方程	r	线性范围/ μg
芍药苷	$Y = 0.3755X + 0.6733$	0.9998	160.0 ~ 1280.0
阿魏酸	$Y = 1.6363X - 2.4722$	0.9997	67.5 ~ 540.0
金丝桃苷	$Y = 0.6722X - 1.4960$	0.9998	17.2 ~ 137.6

2.6 重复性试验 取同一批号样品 6 份,每份 1 g,按 2.2.2 项下方法处理得供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件测定每份样品中芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷的含量。结果芍药苷平均质量分数分别为 0.685 8 mg/片,RSD 1.2%;阿魏酸平均质量分数为 0.187 6 mg/片,RSD 0.8%;金丝桃苷平均质量分数为 0.138 1

mg/片,RSD 1.1%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一样品溶液分别在 0,4,8,12,6,24 h 进样测定,芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 1.2%,1.5%,1.6%,表明稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的样品粉末 6 份(批号 130602),每份 1.0 g,精密称定,准确加入相同量的混合对照品溶液适量,照 2.2.2 项下方法操作,在 2.1 项下色谱条件进样分析,计算芍药苷的平均回收率为 98.38%,RSD 1.51%;阿魏酸的平均回收率为 98.33%,RSD 1.21%;金丝桃苷的平均回收率为 98.71%,RSD 1.27%,结果见表 2。

表 2 调经活血片中 3 种成分的加样回收率

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芍药苷	1.000 2	1.371 9	1.097 5	2.436 6	97.01	98.38	1.51
	1.001 4	1.373 5	1.097 5	2.442 0	97.36		
	0.999 7	1.371 2	1.370 0	2.719 8	98.44		
	0.988 7	1.356 1	1.370 0	2.724 3	99.87		
	0.999 6	1.371 1	1.646 0	3.024 7	100.46		
	1.000 4	1.372 1	1.646 0	2.970 5	97.11		
阿魏酸	1.000 2	0.375 2	0.300 2	0.673 5	99.36	98.33	1.21
	1.001 4	0.375 6	0.300 2	0.669 3	97.83		
	0.999 7	0.375 0	0.375 5	0.751 0	100.14		
	0.988 7	0.370 9	0.375 5	0.739 6	98.18		
	0.999 6	0.374 9	0.450 1	0.812 3	97.17		
	1.000 4	0.375 3	0.450 1	0.813 2	97.28		
金丝桃苷	1.000 2	0.276 3	0.221 0	0.494 8	98.89	98.71	1.27
	1.001 4	0.276 6	0.221 0	0.498 2	100.27		
	0.999 7	0.276 1	0.276 0	0.544 0	97.06		
	0.988 7	0.273 1	0.276 0	0.546 8	99.18		
	0.999 6	0.276 1	0.331 4	0.598 7	97.34		
	1.000 4	0.276 3	0.331 4	0.606 0	99.50		

2.9 样品含量测定 取 3 批调经活血片,精密称定,按 2.2.2 项下供试品制备方法和 2.1 项下色谱条件,对 3 个不同批号的调经活血片中的芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷进行含量测定,每个批号各测 3 次,计算芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷的含量平均值,结果见表 3。

表 3 调经活血片样品中 3 种成分含量测定(n=3) mg/片

批号	芍药苷	阿魏酸	金丝桃苷
130602	0.685 8	0.187 6	0.138 1
130901	0.677 1	0.167 7	0.142 2
131002	0.673 3	0.183 7	0.133 6

3 讨论

3.1 测定波长的选择 待测 3 种成分最大吸收波长均不相同,根据《中国药典》规定芍药苷的最大吸收波长为 230 nm,阿魏酸的最大吸收波长为 316 nm,金丝桃苷的最大吸收波长在 360 nm。试验时发现,在 230 ~ 290 nm 波长处芍药苷、阿魏酸、金丝桃苷都有吸收,但是样品分离程度较差;在 300 nm 以上芍药苷没有吸收,虽然阿魏酸,金丝桃苷在 316,360 nm 处都有吸收,但是样品的分离度仍无法达到要求;所以 3 种成分难以在同一波长测定,参照文献[4-5]综合考虑,分别选择 3 种组分各自的最大吸收

波长作为检测波长,采用DAD检测器一次进样即可同时测定3种成分,提高效率。

3.2 色谱柱的选择 曾使用Agilent Eclipse-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)等色谱柱,阿魏酸拖尾现象比较明显,使样品分离度无法达到要求。而采用Eclipse-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Extend-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)短色谱柱后,阿魏酸没有出现拖尾现象,且样品的各分离度达到要求,故确定采用Eclipse-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。

3.3 流动相的选择 通过查阅相关文献^[6-9],对不同的流动相系统甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾,乙腈-水,乙腈-0.1%磷酸,乙腈-0.1%冰乙酸,甲醇-0.05%磷酸溶液等进行比较,结果发现当用甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾,乙腈-水为流动相时,芍药苷分离程度好,但是另外两种待测组分分离程度较差;当乙腈-0.1%冰乙酸溶液为流动相时,在230 nm波长下对基线干扰较大;而甲醇-0.05%磷酸溶液为流动相分析时间太长,因此,选择乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相;对流动相比比例经过不断改进摸索条件,确定乙腈-0.1%磷酸比例(14:86)为最佳流动相;分离度>1.5,芍药苷理论塔板数>3 000,阿魏酸>5 000,金丝桃苷>5 000符合要求。

3.4 提取溶剂和方法的选择 本试验分别用甲醇、乙醇、70%甲醇、70%乙醇作为提取溶剂,结果发现待测成分经甲醇提取后,所测得含量最高,因此以甲醇作为提取溶剂。同时考察了超声提取30 min,加热回流1 h对样品含量的影响,结果发现2种方法所提取成分的含量基本接近,鉴于超声提取快捷,故选用超声处理方式;再对超声时间30,40,50,60 min进行考察,结果发现不同超声时间对测定结果无显著影响,故选择超声30 min处理;阿魏酸不稳定,见光、加热均易分解^[11]所以配置对照品时宜采用棕色量瓶,而样品超声溶解时水浴温度也宜在30℃以下,并注意有关操作应尽量在避光条件下进行。

调经活血片为妇科临床治疗痛经的经典中成

药,现已有学者对其质量标准进行研究,但采用单一指标不足以代表整体中成药的质量水平。因此,制定多成分、多指标的测定标准,可从多方面控制中成药制剂的产品质量。本实验采用HPLC法同时测定调经活血片中君药、臣药中3种指标性成分含量,经方法学考察和加样回收率试验,证明该方法准确度高、分离度好、专属性强,可作为活血调经活血片的质量控制,为临床安全有效用药提供保障。

[参考文献]

- [1] 王玉鹏,赵丽华,王杰松.高效液相色谱法测定调经活血片中芍药苷的含量[J].武警医院,2008,19(7):617.
- [2] 罗泉珍,周松.高效液相法测定调经活血片中芍药苷的含量[J].今日药学,2008,18(18):33.
- [3] 陈正收,周应军,胡达,等.高效液相色谱法测定调经活血片中木香炔内酯和去氢木香内酯的含量[J].中南药学,2007,12(5):525.
- [4] 马志英,师永清,罗兴平.RP-HPLC双波长法测定清热解毒软胶囊中栀子苷和黄芩苷的含量[J].中国药房,2012,23(8):748.
- [5] 黄勤挽,王瑾,苏娟.双波长HPLC法同时测定杜仲雄花中3种成分的含量[J].中国药房,2011,22(27):2565.
- [6] 贺晓艳,宋秋月,郑丹,等.HPLC法测定当归芍药散中芍药苷、白芍苷、阿魏酸、洋川芎内酯的含量[J].亚太传统医药,2011,7(7):36.
- [7] 杨丽.HPLC法测定千金止带丸中芍药苷的含量[J].中国药事,2007(6):422.
- [8] 孟令丹,陈晓辉,姚燕.RP-HPLC法同时测定四物合剂中芍药苷和阿魏酸的含量[J].药物分析杂志,2006,26(10):1398.
- [9] 林慧彬,林健群,路宁,等.菟丝子及南方菟丝子的质量控制研究[J].中药材,2007,30(11):1446.
- [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]