

HPLC同时测定虎贞痛风胶囊中大车前苷、 虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇的含量

樊化¹, 崔蕴慧², 利弈成¹, 王治平^{3*}

(1. 暨南大学 生物医药研究院, 广州 510632; 2. 暨南大学 附属第一医院, 广州 510632;
3. 广东药学院 药科学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立同时测定虎贞痛风胶囊中大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇含量的 HPLC 方法。方法: 采用高效液相法测定, 色谱条件为 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。结果: 大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇分别在 0.099 6 ~ 1.992 ($r=0.999\ 9$), 0.123 ~ 2.46 ($r=0.999\ 9$), 0.145 ~ 2.90 ($r=0.999\ 9$), 0.025 ~ 0.50 μg ($r=0.999\ 8$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 99.27%, 99.43%, 98.83%, 98.07%。结论: 该方法快速简便, 重复性好, 专属性强, 可作为虎贞痛风胶囊的质量控制方法。

[关键词] 虎贞痛风胶囊; 大车前苷; 虎杖苷; 特女贞苷; 白藜芦醇

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0049-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220049

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.0949.003.html>

[网络出版时间] 2014-10-10 9:49

Simultaneous Determination of Plantamajoside, Polydatin, Specnuezhenide and Resveratrol in Huzhentongfeng Capsule with HPLC

FAN Hua¹, CUI Yun-hui², LI Yi-cheng¹, WANG Zhi-ping^{3*}

(1. Jinan University Institute of Biological Medicine, Guangzhou 510632, China;
2. The First Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

[收稿日期] 20140106(026)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-307); 广东省科技厅项目(2012A080204003); 广州市生物产业科技重大专项(2013000000060); 广东高校产学研结合示范基地项目(cgzhd0905)

[第一作者] 樊化, 硕士, 从事天然药物质量控制研究, Tel: 020-85220504, E-mail: fh225@163.com

[通讯作者] *王治平, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药药效物质、新剂型及质量控制研究, Tel: 020-85220908, E-mail: wzping_jshb@126.com

[2] 王承南, 夏传格. 厚朴药理作用及综合利用研究进展 [J]. 经济林研究, 2003, 21 (3): 80.

[3] 孟超, 吴丰, 马林. 厚朴类中药厚朴酚及厚朴酚含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(6): 1024.

[4] 张启荣, 丁立, 赵训明. 厚朴对兔离体胃肠平滑肌运动的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2007, 36 (6): 656.

[5] 彭博, 贺蓉, 杨滨, 等. 厚朴和凹叶厚朴对实验性胃肠动力障碍的药效作用差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2624.

[6] 余盛贤. 基于水溶性成分分析的厚朴质量评价 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2011: 6.

[7] 张春霞, 杨立新, 余星, 等. 种源、产地及采收树龄对厚朴药材质量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (19): 1695.

[8] 余盛贤, 晏仁义, 张春霞, 等. 厚朴干皮商品规格的探讨 [J]. 中药材, 2011, 34(4): 522.

[责任编辑 顾雪竹]

3. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to establish a HPLC method for simultaneous determination of the contents of plantamajoside, polydatin, specnuezhenide and resveratrol in Huzhentongfeng capsules. **Method:** HPLC was used to determine the contents. The analytical column was Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The liquid phase was composed of acetonitrile and 0.1% formic acid with gradient elution. The detection wavelength was set at 280 nm, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The mass of plantamajoside, polydatin, specnuezhenide and resveratrol with peak areas were within the concentration ranges of 0.099 6-1.992 μg (*r* = 0.999 9), 0.123-2.46 μg (*r* = 0.999 9), 0.145-2.90 μg (*r* = 0.999 9), 0.025-0.50 μg (*r* = 0.999 8), and the average recoveries were 99.27%, 99.43%, 98.83%, 98.07%, respectively. **Conclusion:** The method is rapid and simple, highly reproducible and specific so that it could be used as one of the quality control methods of Huzhentongfeng capsules.

[Key words] Huzhentongfeng capsule; plantamajoside; polydatin; specnuezhenide; resveratrol

虎贞痛风胶囊由广州暨南生物医药研究开发基地有限公司研制,目前正在进行三期临床试验。该方由虎杖、车前草、女贞子、蜂房 4 味中药组成,具有清热利湿、化痰利浊、滋补肝肾的功效,用于湿热蕴结所致的原发性急性痛风性关节炎。本实验选择的 4 种指标成分的依据主要体现在虎杖苷和白藜芦醇为方中君药虎杖的主要活性成分之一,具有抗炎镇痛、保护心血管等药理作用^[1];大车前苷是方中臣药车前草特征成分,具有抗炎利尿、解痉平喘等药理作用^[2];特女贞苷是女贞子药材中的专属性成分,具有较强的生理活性和药理作用^[3]。虎杖苷、大车前苷、特女贞苷分别是《中国药典》2010 年版一部中虎杖、车前草、女贞子含量测定的指标成分。本实验以大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇为指标成分,采用 HPLC 同时测定其含量,为该制剂建立了一种快速同时测定多成分含量的方法。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(配备在线脱气机,2487 四元泵,717 自动进样器,2487 检测器),BT25s 型分析天平(Sartorius),2510E-DTH 型超声波清洗仪(Bransonic)。

虎杖苷(批号 111575-200301,纯度 100%)、特女贞苷(批号 111926-201001,纯度 94.4%)、大车前苷(批号 111914-201102,纯度 85.9%)、白藜芦醇(批号 111535-200502,纯度 100%)对照品均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用;虎贞痛风胶囊 3 批(广东一力药业集团有限公司生产,批号 130310,130311,130312),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 30 °C,流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)洗脱梯度(0 ~ 25 min,16% ~ 30% A),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 280 nm,进样量 5 μL,外标法定量。

2.2 溶液的制备

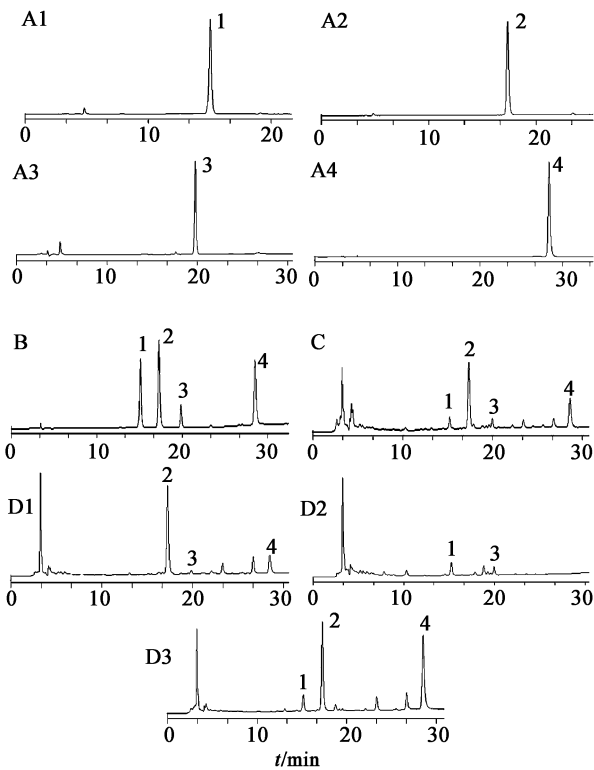
2.2.1 混合对照品溶液 取大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇对照品各适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇分别为 0.996,1.23,1.45,0.25 mg 的对照品储备溶液,精密吸取上述 4 个对照品储备溶液各 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加起始流动相定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取虎贞痛风胶囊内容物 0.4 g,精密称定,精密加入稀乙醇 25 mL,称定质量,超声处理 30 min(100 W,42 kHz),放置至室温,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,取上清液,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例分别称取除虎杖、车前草及女贞子外的其余药材,按制备工艺分别制成缺虎杖、车前草及女贞子的阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备,即得。

2.3 系统适用性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,在上述色谱条件下进行分析,理论板数按虎杖苷计算不低于 3 000。4 种成分与相邻吸收峰的分离度均大于 1.5。阴性对照无干扰。结果见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液在上述色谱条件下分别进样 1,2,5,8,10,20 μL,记录



1. 大车前苷;2. 虎杖苷;3. 特女贞苷;4. 白藜芦醇;
A1, A2, A3, A4. 对照品;B. 混合对照品;
C. 供试品;D1. 缺车前草阴性样品;
D2. 缺虎杖阴性样品;D3. 缺女贞子阴性样品

图1 虎贞痛风胶囊 HPLC

色谱峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标、对照品进样质量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,进行线性回归,绘制标准曲线,得各成分的回归方程见表1,结果表明4种成分在各自的进样量范围内线性关系良好。

表1 大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇的回归方程、相关系数和线性范围

对照品	回归方程	r	线性范围/ μg
大车前苷	$Y = 1.58 \times 10^6 X - 4.8 \times 10^4$	0.999 9	0.099 6 ~ 1.992
虎杖苷	$Y = 8.01 \times 10^6 X - 2.24 \times 10^4$	0.999 9	0.123 ~ 2.460
特女贞苷	$Y = 9.22 \times 10^5 X - 2.49 \times 10^4$	0.999 9	0.145 ~ 2.900
白藜芦醇	$Y = 9.25 \times 10^5 X - 8.71 \times 10^4$	0.999 8	0.025 ~ 0.500

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液按上述色谱条件重复进样6次,记录峰面积。大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇峰面积的RSD分别为1.18%,0.58%,0.70%,1.15%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号130310),按上述色谱条件分别在0,2,4,6,8,12,24 h进样分析,记录峰面积。大车前苷、虎杖苷、特

女贞苷、白藜芦醇峰面积的RSD分别为2.24%,1.38%,1.85%,1.62%,表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取样品(批号为130310)按2.2.2项下方法制备6份供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇含量RSD分别为1.58%,1.24%,1.19%,1.87%,表明方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的虎贞痛风胶囊样品(批号130310)6份,每份0.2 g,精密称定,准确加入与样品中含量等量的对照品溶液。按2.2.2项下方法制备,依法测定,计算回收率。结果见表2。试验表明本法有良好的准确性。

表2 虎贞痛风胶囊中大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇的加样回收率

成分	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
大车前苷	363.85	368.52	725.49	98.13	99.27	1.85
	367.08	368.52	731.55	98.90		
	369.74	368.52	739.63	100.37		
	352.83	368.52	715.77	98.49		
	373.92	368.52	751.28	102.40		
虎杖苷	360.24	368.52	718.90	97.32		
	2 432.05	2 460.00	4 915.31	100.95	99.43	2.50
	2 453.64	2 460.00	4 954.67	101.67		
	2 471.42	2 460.00	4 882.39	98.01		
	2 358.39	2 460.00	4 871.26	102.15		
特女贞苷	2 499.36	2 460.00	4 863.50	96.10		
	2 407.92	2 460.00	4 810.94	97.68		
	2 355.45	2 320.00	4 583.69	96.04	98.83	1.73
	2 376.36	2 320.00	4 671.72	98.94		
	2 393.58	2 320.00	4 706.24	99.68		
白藜芦醇	2 284.11	2 320.00	4 625.43	100.92		
	2 420.64	2 320.00	4 688.56	97.76		
	2 332.08	2 320.00	4 643.61	99.63		
	210.65	212.50	422.60	99.74	98.07	2.51
	212.52	212.50	419.47	97.39		
	214.06	212.50	417.28	95.63		
	204.27	212.50	421.53	102.24		
	216.48	212.50	421.39	96.43		
	208.56	212.50	414.71	97.01		

2.9 样品测定 取3份样品(130310,130311,130312),分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液各

2 份,同法测定,结果见表 3。

表 3 虎贞痛风胶囊中大车前苷、虎杖苷、
特女贞苷、白藜芦醇质量分数 %

批号	大车前苷	虎杖苷	特女贞苷	白藜芦醇
130310	0.17	0.95	1.23	0.11
130311	0.22	1.08	1.31	0.15
130312	0.19	1.12	1.15	0.12

3 讨论

白藜芦醇在 306 nm 及 215 nm 处有最大吸收,《中国药典》2010 年版一部中虎杖苷的检测波长为 306 nm,大车前苷为 330 nm,特女贞苷为 224 nm,综合上述条件,试验中选取 250,280,300 nm 波长检测供试品。结果供试品中虎杖苷在波长 250 nm 的分离度较差,而供试品中特女贞苷在 300 nm 无法检出。供试品中 4 种成分在 280 nm 均能有效检出,且峰形较好,故选择 280 nm 为检测波长。结果见图 2。

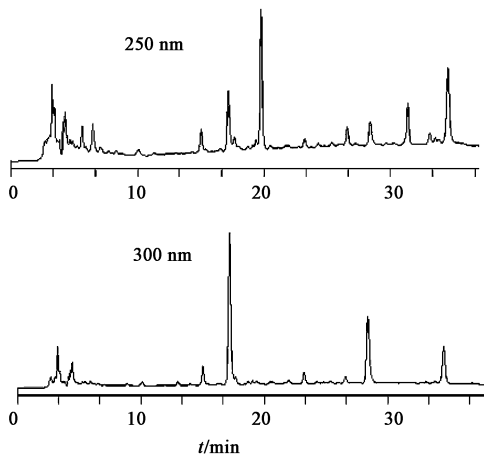


图 2 虎贞痛风胶囊供试品在 250,300 nm 波长处 HPLC

在已确定色谱柱的情况下,考察乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液 3 种流动相系统,结果乙腈-0.1% 甲酸洗脱时 4 种成分分离较佳、峰形较好。用乙腈-0.1% 甲酸溶液(16:84)等度洗脱时,白藜芦醇 70 min 才出峰,检测时间过长。而优化梯度洗脱条件,使 4 种成分 30 min 内全部出峰,且分离度较佳。

有文献报道分别测定大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇含量方法^[4-5],但同时测定上述 4 种成分的含量的方法未见报道。本实验建立的 HPLC 方法,可以在短时间内快速分离检测虎贞痛风胶囊中大车前苷、虎杖苷、特女贞苷、白藜芦醇 4 种主要成分,能有效简化该制剂测定这 4 种成分的含量的操作步骤,缩短检测时间,减少有机溶剂的使用,提高工作效率,该方法经过考察,准确、快速、重复性好,可用于虎贞痛风胶囊的质量控制。

[参考文献]

- [1] Falchetti R, Fuggetta M P, Lanzilli G, et al. Effects of resveratrol on human immune cell function[J]. Life Sci, 2001,70(1):81.
- [2] 夏玲红,金冠钦,孙黎,等. 车前草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国药师,2013,16(2):294.
- [3] 高素强,周舒君,曹纪亮,等. 中药女贞子化学成分及质量控制方法的研究进展[J]. 中南药学,2012,10(11):835.
- [4] 吴杰. 虎贞痛风胶囊质量标准研究[D]. 广州:暨南大学,2012.
- [5] 孙虔,耿放,程雪梅,等. 车前草中大车前苷的定性和定量分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2095.

[责任编辑 顾雪竹]