

HPLC 同时测定灯延颗粒中灯盏乙素、 原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素

张宏梅, 崔佰吉, 张秀荣*
(吉林医药学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定灯延颗粒中灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素含量的方法。方法:采用 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.3% 醋酸铵水溶液(B), 梯度洗脱(0~25 min, 15% A; 25~70 min, 15%~65% A; 70~75 min, 65%~15% A), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长分别为 280 nm(灯盏乙素、原阿片碱、延胡索乙素)、337 nm(芹菜素)。结果:灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素进样量分别在 0.90~8.99, 0.73~7.35, 0.05~0.54, 0.14~1.37 μg 线性关系良好; 平均回收率分别为 99.48%, 98.17%, 97.41%, 98.33%, RSD 分别为 0.8%, 1.2%, 1.2%, 0.5%。结论:该法适用于同时测定灯延颗粒中灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素的含量。

[关键词] 灯盏乙素; 原阿片碱; 芹菜素; 延胡索乙素; 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)24-0057-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240057

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1455.018.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 14:55

Simultaneous Determination of Scutellarin, Protopine, Apigenin and Tetrahydropalmatine in Dengyan Granules by HPLC

ZHANG Hong-mei, CUI Bai-ji, ZHANG Xiu-rong*
(Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to develop an HPLC method for the simultaneous determination of contents of scutellarin, protopine, apigenin and tetrahydropalmatine in Dengyan Granules. **Method:** The analysis was performed on a Zorbax Extend-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) in gradient elution (0-25 min, 15% A; 25-70 min, 15%-65% A; 70-75 min, 65%-25% A) by using the mobile phase of acetonitrile (A) -0.3% ammonium acetate solution (B). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 30 ℃, the detection wavelengths were set at 280 nm (for scutellarin, protopine and tetrahydropalmatine), 337 nm (for apigenin), respectively. **Result:** The calibration curves were linear within the range of 0.90-8.99 μg for scutellarin, 0.73-7.35 μg for protopine, 0.05-0.54 μg for apigenin and 0.14-1.37 μg for tetrahydropalmatine, respectively. The recoveries of scutellarin, protopine, apigenin and tetrahydropalmatine were 99.48% (RSD 0.8%), 98.17% (RSD 1.2%), 97.41% (RSD 1.2%) and 98.33% (RSD 0.5%), respectively. **Conclusion:** The method can be used for simultaneous determination of contents of scutellarin, protopine, apigenin and tetrahydropalmatine in Dengyan Granules.

[Key words] scutellarin; protopine; apigenin; tetrahydropalmatine; HPLC

[收稿日期] 20140509(005)

[基金项目] 吉林省科技厅发展计划重点项目(20120947)

[第一作者] 张宏梅, 讲师, 硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:0432-64560528, E-mail:33134016@qq.com

[通讯作者] * 张秀荣, 教授, 硕士导师, 从事中药新剂型与制剂研究, Tel:0432-64560316, E-mail:yxzxr@163.com

灯延颗粒是由灯盏花、延胡索、黄芪组成的中药复方制剂,主治冠心病、心绞痛。其中灯盏花具有散寒化瘀、活络止痛的功效,为方中君药;延胡索在方中主要起到活血散瘀,行气止痛的功效;黄芪补气,辅助君药化瘀活络。本制剂是在原有“延灯滴丸”的基础上经过优化形成的颗粒制剂^[1]。方中黄芪主要成分为紫外末端吸收,所以其质量控制多以 HPLC-ELSD 的方法加以控制,而灯盏花、延胡索的含量测定的文献报道比较多^[2-5],文献多采用甲醇(乙腈)辅助不同浓度的磷酸、甲酸、醋酸进行洗脱系统的选择,本实验中以甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.3% 磷酸水溶液和乙腈-0.3% 醋酸铵水溶液等为流动相,采用等度洗脱,各组分均不能完全分离。本研究采用 HPLC 同时测定灯延颗粒中灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素含量,为其质量标准提供了科学依据。

1 材料

LC-20A 系列高效液相色谱仪(DAD 检测器,日本岛津),CAP225D 型电子分析天平(德国 Sartorius),Synergy185 超纯水制备仪(MILLIPORE)。

延胡索乙素(批号 110726-200610)、灯盏乙素(批号 110842-200605)对照品均购自中国食品药品检定研究院,芹菜素(批号 110428)、原阿片碱(批号 120329)对照品购自上海惠诚科技有限公司。

灯延颗粒(批号 130401,130402,130403)为本实验室自制(提取物粉末-乳糖-微晶纤维素-糊精 = 1:0.4:0.5:0.4,70% 乙醇湿法制粒,60 °C 干燥 30 min)。乙腈(色谱纯,Fisher),乙酸铵(分析纯,西陇化工股份有限公司,批号 1110111),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 30 °C,流动相乙腈(A)-0.3% 醋酸铵水溶液(B),采用梯度洗脱(0 ~ 25 min,15% A;25 ~ 70 min,15% ~ 65% A;70 ~ 75 min,65% ~ 25% A),流速 0.8 mL · min⁻¹,检测波长分别为 280 nm(灯盏乙素、原阿片碱、延胡索乙素),337 nm(芹菜素)。

2.2 溶液的制备

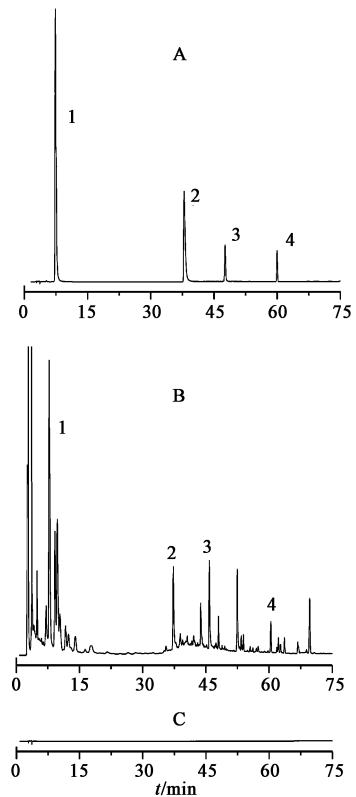
2.2.1 对照品混合溶液 分别精密称取灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素的对照品适量,加甲醇制成含灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素为 0.899,0.735,0.054,0.137 g · L⁻¹ 的混合对照品储备液。精密量取上述对照品储备液各 5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,即得混合

对照品溶液(灯盏乙素 0.450 g · L⁻¹、原阿片碱 0.367 g · L⁻¹、芹菜素 0.027 g · L⁻¹和延胡索乙素 0.068 g · L⁻¹)。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,置研钵中研细,取粉末约 1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇 10 mL,精密称定质量,超声(功率 500 W,频率 40 kHz)提取 20 min,放冷至室温,甲醇补足减失质量,混匀,静置 10 min,取上清液,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按灯延颗粒制备工艺,制备不含灯延颗粒提取物的阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样 10 μL 进行分析,记录色谱图,见图 1,2。结果表明,各对照品色谱峰分离良好,供试品各成分的色谱峰与相邻的色谱峰分离度符合要求,且在相应的位置上,辅料对其含量测定没有影响,表明本方法专属性良好。



1. 灯盏乙素;2. 原阿片碱;3. 芹菜素;4. 延胡索乙素

图 1 混合对照品(A)、灯延颗粒样品(B)、阴性样品(C)在 280 nm 处的 HPLC

2.4 精密度试验 取混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续自动进样 10 μL 共 6 次,记录色谱

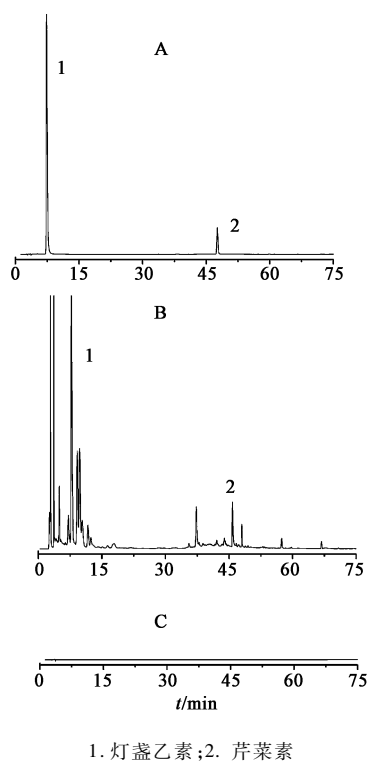


图2 混合对照品(A)、灯盏颗粒样品(B)、阴性样品(C)在337 nm处的HPLC

1. 灯盏乙素;2. 芹菜素

图,结果灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素峰面积的RSD分别为0.7%、0.8%、0.7%、0.6%。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液1.0、2.5、5、7.5、10 mL置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,按2.1项下色谱条件,分别吸取上述溶液10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。分别以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,进行线性回归,结果灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素进样量分别在0.90~8.99、0.73~7.35、0.05~0.54、0.14~1.37 μg 线性关系良好,回归方程分别为 $Y = 6.1 \times 10^6 X - 4.2 \times 10^6$ ($r = 0.9990$), $Y = 1.3 \times 10^6 X + 1.0 \times 10^5$ ($r = 0.9991$), $Y = 3.5 \times 10^6 X - 2.3 \times 10^3$ ($r = 0.9997$), $Y = 1.2 \times 10^6 X - 6.2 \times 10^4$ ($r = 0.9995$)。

2.6 重复性试验 按2.2.2项下方法,取同一批(批号130401)灯盏颗粒供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件,分别进样10 μL 进行分析,记录色谱图,计算各组分平均含量,结果灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素平均质量分数分别为6.20、3.25、0.52、0.97 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为0.8%、1.1%、1.6%、1.2%。

2.7 稳定性试验 取制备好的供试品溶液,室温下放置,按2.1项下色谱条件,分别于制备后0、2、4、

6、8、10、12 h进样10 μL 进行分析,记录色谱图,结果灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素峰面积的RSD分别为0.8%、1.3%、0.7%、0.8%,表明供试品溶液各组分在12 h内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取同一批号(批号130401)已知含量样品6份,每份约0.75 g,分别加入适量对照品灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件,分别进样10 μL ,测定峰面积,计算回收率,结果灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素平均回收率分别为99.48%、98.17%、97.41%、98.33%,RSD分别为0.8%、1.2%、1.2%、0.5%。结果见表1。

表1 灯盏颗粒中4个成分的加样回收率试验

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收 率/%	RSD /%
灯盏乙素	4.66	4.47	9.10	99.48	0.8
原阿片碱	2.44	2.68	5.07	98.17	1.2
芹菜素	0.38	0.44	0.81	97.46	1.2
延胡索乙素	0.74	0.76	1.49	98.31	0.5

注:取样量均为0.750 1 mg。

2.9 样品含量测定 取3个批号的灯盏颗粒样品,每个批号3份,按2.2.2项下方法分别制备各供试品溶液,按2.1项下色谱条件,分别进样10 μL ,记录峰面积,分别计算灯盏乙素、原阿片碱、芹菜素和延胡索乙素的含量,结果见表2。

表2 3批灯盏颗粒中4种成分含量测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	灯盏乙素 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	原阿片碱 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	芹菜素 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	延胡索乙素 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
130401	6.21	3.21	0.48	1.02
130402	6.18	3.23	0.46	0.94
130403	6.23	3.16	0.48	0.98

3 讨论

3.1 检测波长的选择 为保证各指标成分的测定有较高灵敏度,根据二极管阵列检测器上得到的紫外吸收光谱图辅助成分定性和选择各被测组分的检测波长,灯盏乙素在280 nm和335 nm均有较大的吸收,均可作为其含量测定的检测波长;原阿片碱、延胡索乙素在280 nm处有最大吸收;芹菜素在337 nm处有最大吸收,综合实际情况选择检测波长分别为280 nm(灯盏乙素、原阿片碱、延胡索乙素)、337 nm(芹菜素)。

HPLC 测定 3 种葛根素注射液中葛根素含量

李昌勤¹, 李丹¹, 王培卿¹, 张丹¹, 康文艺¹, 程力^{2*}

(1. 河南大学 中药研究所, 河南 开封 475004; 2. 贵阳中医学院 第二附属医院, 贵阳 550003)

[摘要] 目的:应用高效液相色谱法同时测定葛根素注射液、葛根素葡萄糖注射液和葛根素氯化钠注射液中葛根素的含量。方法:采用 Merk, Purospher STAR RP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1% 冰乙酸水溶液(25:75), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 29 ℃, 检测波长 250 nm, 进样量 10 μL。结果:对照品葛根素在 0.192~1.152 μg 呈良好曲线关系, 线性回归方程 $Y = 468\ 374X + 3\ 105.25$ ($r = 0.999\ 8$), 平均加样回收率为 99.81%, RSD 0.42%。结论:3 种注射液中的葛根素均可在选定的条件下得到较好的分离, 线性关系良好。该方法简单快速、合理可行, 可为葛根素注射液的质量控制提供科学依据。

[关键词] 高效液相色谱法; 葛根素注射液; 葛根素葡萄糖注射液; 葛根素氯化钠注射液; 葛根素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240060

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1500.021.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 15:00

Determination for Content of Puerarin in Three Kinds of Puerarin Injections by HPLC Method

LI Chang-qin¹, LI Dan¹, WANG Pei-qing¹, ZHANG Dan¹, KANG Wen-yi¹, CHENG Li^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. The Second Affiliated Hospital, Guiyang Traditional Medical College, Guiyang 550003, China)

[收稿日期] 20131218(005)

[基金项目] 河南省科技厅重点攻关项目(122102310272); 河南大学研究生教育综合改革项目(Y141108)

[第一作者] 李昌勤, 教授, 从事中药学研究, Tel:0371-23880680, E-mail:lcq@henu.edu.cn

[通讯作者] *程力, 副教授, 硕士, 从事中西医结合妇产科研究, Tel:13984111000, E-mail:839074675@qq.com

3.2 流动相的选择 采用梯度洗脱, 以甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.3% 磷酸水溶液为流动相时, 色谱峰分离效果较差, 选择乙腈-0.3% 乙酸铵水溶液为流动相, 各组分分离好, 基线较稳定, 故经过优化, 选定其为本研究所用梯度洗脱系统。

3.3 提取条件的选择 考察了回流提取法和超声提取法, 结果超声提取 20 min 与回流提取 40 min 的提取效率没有明显的差异, 由于超声提取操作简单、易行, 因此选择超声波提取法作为本研究的提取方法; 试验过程中比较了超声提取 20, 30, 40 min, 结果提取 20, 30, 40 min 各被测成分的提取量没有明显差异, 因此选择提取时间 20 min。

[参考文献]

- [1] 张秀荣, 崔佰吉, 郝乘仪, 等. 均匀设计优化延灯滴丸的制备工艺[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(2):112.
- [2] 李晓波, 汪瑞波, 沈勇, 等. HPLC 测定灯盏花不同部位绿原酸、灯盏乙素、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2237.
- [3] 聂朝霞. 反相高效液相色谱法测定灯盏细辛中灯盏乙素含量[J]. 中国药业, 2013, 22(23):15.
- [4] 任琦, 谢媛媛, 祖双, 等. 灯盏细辛中多酚类成分定性、定量的分析[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7):1176.
- [5] 朱应刚, 李晓英, 孙洪胜. 不同比例配伍的延胡索-川楝子药对中延胡索乙素的含量测定[J]. 中国药房, 2013, 24(19):1793.

[责任编辑 顾雪竹]