

HPLC 同时测定白癜风丸中羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的含量

喻录容, 何先元*, 黄英如

(重庆医科大学 中医药学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的:建立同时测定白癜风丸中羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 含量的测定方法。方法:采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm。结果:羟基红花黄色素 A 在 4.91~36.86 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系($r=0.9995$),平均回收率 99.12%,RSD 0.9%。丹酚酸 B 在 14.99~112.42 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系($r=0.9997$),平均回收率为 98.79%,RSD 1.0%。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于白癜风丸的质量控制。

[关键词] 白癜风丸;羟基红花黄色素 A;丹酚酸 B;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(2015)23-0037-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230037

Simultaneous Determination of Hydroxysafflor Yellow A and Salvianolic Acid B in Baidianfeng Pills by HPLC YU Lu-rong, HE Xian-yuan*, HUANG Ying-ru (Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC method for simultaneous determination of hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in Baidianfeng pills. **Method:** The determination was performed on a Welchrom C₁₈ column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase in gradient elution mode at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm. **Result:** Hydroxysafflor yellow A presented a good linearity in the concentration range of 4.91-36.86 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$). The average rate of recovery was 99.12% with RSD 0.9%. Salvianolic acid B presented a good linearity in the concentration range of 14.99-112.42 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$). The average rate of recovery was 98.79% with RSD of 1.0%. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible, and it can be used for quality control of Baidianfeng pills.

[Key words] Baidianfeng pills; hydroxysafflor yellow A; salvianolic acid B; HPLC

白癜风丸由黄芪、红花、补骨脂、川芎、丹参、当归、白鲜皮等组成,具有益气行滞、活血解毒、利湿消斑、驱风止痒之功效,临床用于白癜风的治疗。白癜风丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》第十五册^[1],原标准太过简单,不能有效控制该药品质量,对于其中有效成分的含量测定有些研究^[2-3],但关于方中红花和丹参的含量测定尚未见报道现行标准没有含量测定项,不能很好反映产品质量^[1]。红花为方中主药,据研究,羟基红花黄色素 A 为红花主要水溶性活血化瘀有效成

分^[4],而丹酚酸 B 为方中丹参的水溶性活性成分,二者溶解性相似,具备同时测定的有利条件,故本文参考有关文献^[5-9],建立了以高效液相色谱法同时测定二者含量的方法,可用于控制该药品的质量。

1 仪器与试剂

1260 系列高效液相色谱仪(配四元梯度泵, G1314F 紫外检测器,美国 Agilent),BP-211D 型电子天平(赛多利斯)。

羟基红花黄色素 A(批号 111637-200905,纯度 91.8%)和丹酚酸 B(批号 111562-201110)对照品

[收稿日期] 20141019(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373668);重庆市卫生局科技项目(2012-2-144)

[第一作者] 喻录容,硕士,讲师,从事药物制剂以及制剂分析的研究,Tel:13350383721,E-mail:136817118@qq.com

[通讯作者] *何先元,教授,从事中药资源开发利用以及药理学的研究,Tel:13647653516,E-mail:yulurong1976@163.com

均购自中国食品药品检定研究院,乙腈(色谱纯),其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水自制。3 个厂家 9 批白癜风丸(市售)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)梯度洗脱(0~12min, 12% A; 12~20 min, 12%~35% A; 20~30min, 35% A),检测波长 280 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,进样量 10 μL。理论塔板数按羟基红花黄色素 A 峰计算不低于 4 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称羟基红花黄色素 A 对照品 13.38 mg,置 50 mL 量瓶中,加 75% 甲醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密称取丹酚酸 B 对照品 19.12 mg,置 25 mL 量瓶中,加上述羟基红花黄色素 A 对照品溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液(羟基红花黄色素 A 0.245 7 g·L⁻¹,丹酚酸 B 0.749 5 g·L⁻¹)。精密量取对照品储备液 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加 75% 甲醇稀释至刻度,即得对照品溶液。

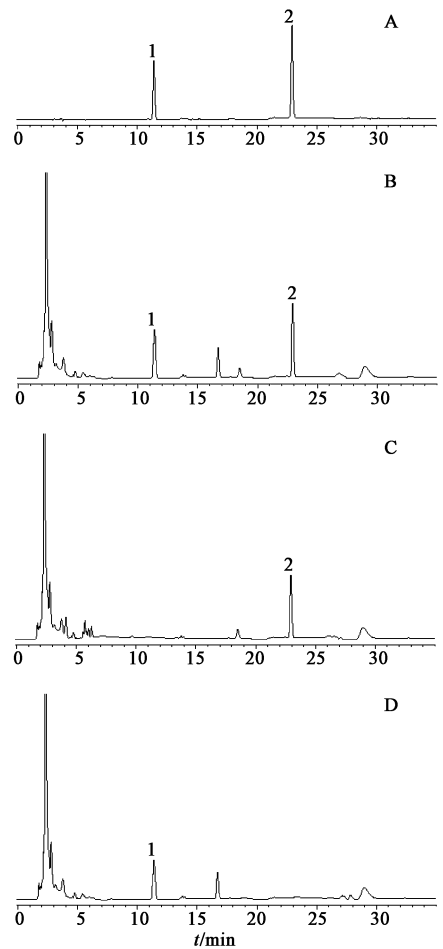
2.2.2 供试品溶液 取本品适量,研细,精密称取 0.8 g,置具塞锥形瓶中,准确加入 75% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方制法分别制备不含红花、丹参的阴性样品,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 吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,按上述色谱条件分别进样,结果供试品色谱中无干扰,说明供试品溶液中的其他成分对测定结果无影响,见图 1。

2.4 线性关系的考察 精密量取 2.2.1 项下的对照品储备液 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 75% 甲醇至刻度,摇匀,按 2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,得羟基红花黄色素 A 回归方程为 $Y = 15.132 4X - 6.249 1$ ($r = 0.999 5$),丹酚酸 B 回归方程为 $Y = 11.253 8X - 1.831 6$ ($r = 0.999 7$),羟基红花黄色素 A,丹酚酸 B 在 4.91~36.86, 14.99~112.42 mg·L⁻¹ 分别呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.2.1 项下的对照品溶液,进样 10 μL,连续进样 6 次测定。结果羟基红花黄色



1. 羟基红花黄色素 A; 2. 丹酚酸 B; A. 对照品; B. 供试品; C. 缺红花阴性样品; D. 缺丹参阴性样品

图 1 白癜风丸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of sample

素 A 和丹酚酸 B 的峰面积 RSD 分别为 0.9%, 1.4%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号样品 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,以 2.1 项下色谱条件测定,结果羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的含量 RSD 分别为 1.3%, 0.9%, 说明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样测定,结果其羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的峰面积 RSD 分别为 0.8%, 1.4%, 表明制备的供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量(羟基红花黄色素 A 0.627 mg·g⁻¹,丹酚酸 B 1.885 mg·g⁻¹)的白癜风丸 6 份,每份 0.4 g,分别精密加入 2.2.1 项下的对照品储备液各 1.0 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL 测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 白癜风丸中两种成分的加样回收率试验

Table 1 Two components recovery test of Baidianfeng pills

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值
						(RSD) /%
羟基红花 黄色素 A	0.400 6	0.251	0.246	0.491	97.56	99.12 (0.9)
	0.398 9	0.250	0.246	0.493	98.94	
	0.401 2	0.252	0.246	0.498	100.28	
	0.400 8	0.251	0.246	0.496	99.72	
	0.401 6	0.252	0.246	0.495	98.78	
丹酚酸 B	0.400 6	0.755	0.750	1.492	98.33	98.79 (1.0)
	0.402 3	0.758	0.750	1.502	99.21	
	0.398 9	0.752	0.750	1.486	97.96	
	0.401 2	0.756	0.750	1.506	100.03	
	0.400 8	0.756	0.750	1.502	99.59	
0.401 6	0.757	0.750	1.489	97.64		

2.9 样品测定 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,以 2.1 项下色谱条件测定,不同厂家共 9 批白癜风丸样品中羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的含量结果见表 2。

表 2 9 批样品中羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的含量 (n=3)

Table 2 Content of hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in nine samples (n=3)

厂家	批号	羟基红花黄色素 A mg·g ⁻¹	丹酚酸 B mg·g ⁻¹
A	20131016	0.586	1.675
A	20131103	0.601	1.593
A	20131128	0.632	1.881
B	20130611	0.437	1.389
B	20130925	0.321	1.590
B	20130816	0.273	1.267
C	20130528	0.326	1.634
C	20130709	0.375	1.499
C	20130917	0.288	1.460

3 讨论

本文选取羟基红花色素 A 和丹酚酸 B 作为目标成分,参考有关文献^[5-9],经过对比实验,确立以

280 nm 作为检测波长,以乙腈-0.1% 磷酸为流动相梯度洗脱,两成分的响应信号良好、基线平稳,供试品中各峰分离情况理想。

方中另 2 味药川芎和当归所含的特征性成分阿魏酸,理论上亦可同时检测,但在实验过程中发现其含量太低,与其他 2 种成分悬殊太大,不宜同时检测。

根据 9 批样品所测得的结果,可看到不同厂家不同批次所含 2 种成分的含量有所差异,羟基红花黄色素 A 的含量甚至相差几倍,所以很有必要对其合理定量从而监管该药品的质量。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第十五册[S]. 1997:56-57.

[2] 潘细贵,汪洋,冯晓东,等. HPLC 法测定白癜风丸中阿魏酸的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(9):49-50.

[3] 马俊玲,宋金春,杨茂. 反相高效液相色谱法测定白癜风丸中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 中国医院药学杂志,2001,21(6):342-343.

[4] 金鸣,李金荣,吴伟. 羟基红花黄色素 A 抗氧化作用的研究[J]. 中草药,2004,35(6):665-666.

[5] 王亚洲,杨春旭. HPLC 同时测定蝎龙接骨散中羟基红花色素 A 和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):109-111.

[6] 赵国英,袁秀荣,李玲,等. 鹿红颗粒中黄芪甲苷和羟基红花黄色素 A 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):40-42.

[7] 严红. HPLC 法同时测定中药多种有效成分含量的应用[J]. 天津药学,2010,22(1):67-70.

[8] 王亚洲. HPLC 法同时测定蝎龙酒中芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸[J]. 中成药,2012,34(10):1925-1928.

[9] 厉瑶,郭正泰,龚行楚,等. 丹参红花混煎液中丹参素、羟基红花黄色素 A、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 的 HPLC 测定方法[J]. 中国中药杂志,2013,38(11):1653-1656.

[责任编辑 顾雪竹]