

HPLC 同步测定天舒胶囊 3 种成分的含量

梁娟娟^{1,2}, 高慧敏^{1,3*}, 陈两绵^{1,3}, 王智民^{1,3*}, 张启伟^{1,3}, 萧伟⁴, 王振中⁴, 王永炎¹
(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 河南中医学院 药学院, 郑州 450008;
3. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;
4. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同步测定天舒胶囊中天麻素、5-羟甲基糠醛、阿魏酸 3 种成分的含量。方法: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱(0~10 min, 5%~10% A; 10~16 min, 10% A; 16~50 min, 10%~60% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 221 nm(天麻素)、283 nm(5-羟甲基糠醛)、322 nm(阿魏酸), 柱温 30 ℃。结果: 天麻素、5-羟甲基糠醛、阿魏酸分别在 5.61~299, 3.31~212, 4.63~247 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系; 天舒胶囊中 3 种成分的加样回收率分别为 99.74%, 102.5%, 100.3%, RSD 分别为 0.84%, 1.53%, 0.49%。5 批天舒胶囊市售样品中天麻素、5-羟甲基糠醛和阿魏酸的含量分别为 2.70~3.65, 2.07~2.67, 1.95~2.10 mg·g⁻¹。结论: 测定天麻素、5-羟甲基糠醛和阿魏酸的含量能够有效地控制天舒胶囊的产品质量。

[关键词] 天舒胶囊; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0081-04

[doi] 10.11653/syfy2013170081

Simultaneous Determination of Three Constituents in Tianshu Capsule by HPLC

LIANG Juan-juan^{1,2}, GAO Hui-min^{1,3*}, CHEN Liang-mian^{1,3}, WANG Zhi-min^{1,3*},
ZHANG Qi-wei^{1,3}, XIAO Wei⁴, WANG Zhen-zhong⁴, WANG Yong-yan¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Pharmacy College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicine, Beijing 100700, China;
4. Jiangsu Kanion Pharmaceut Co Ltd, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the simultaneous determination of gastrodin, 5-hydroxymethylfurfural and ferulic acid in Tianshu Capsule. **Method:** Phenomenex Luna C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol (A) and water containing 0.1% phosphoric acid (B), and the gradient program was as followed: 0-10 min, 5%-10% A; 10-16 min, 10% A; 16-50 min, 10%-60% A. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was set at 30 ℃. The detection wavelength was at 221 nm (gastrodin), 283 nm (5-hydroxymethylfurfural) and 322 nm (ferulic acid). **Result:** The linear ranges were 5.61-299 mg·L⁻¹ for gastrodin, 3.31-212 mg·L⁻¹ for 5-hydroxymethylfurfural and 4.63-

[收稿日期] 20130504(009)

[基金项目] 中国博士后基金项目(2012M510731); 中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金项目(SKL2010M0204); 重大新药创制项目(2009ZX09308-003)

[第一作者] 梁娟娟, 硕士研究生, 从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax: 86-10-84014128, E-mail: liangyujuan1@126.com

[通讯作者] * 高慧敏, 副研究员, 从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax: 86-10-84014128, E-mail: huimin_gao@126.com;

* 王智民, 研究员, 从事中药化学与质量评价研究, Tel/Fax: 86-10-84014128, E-mail: zhmw123@263.net

247 mg·L⁻¹ for ferulic acid, respectively. The average recoveries of three constituents were 99.74%, 102.5% and 100.3% with the RSD of 0.84%, 1.53% and 0.49%. The contents of three compounds, gastrodin, 5-hydroxymethylfurfural and ferulic acid in Tianshu Capsules were 2.70-3.65, 2.07-2.67 mg·g⁻¹ and 1.95-2.10 mg·g⁻¹. **Conclusion:** Determination of gastrodin, 5-hydroxymethylfurfural and ferulic acid could effectively control the product quality of Tianshu Capsules.

[Key words] Tianshu Capsule; HPLC; determination

天舒胶囊(Tianshu Capsule, TSC)由川芎和天麻两味药材提取精制而成,收载于 2010 年版《中国药典》一部,具有活血平肝之功效,主要用于血瘀所致血管神经性头痛等疾病的治疗^[1,2]。目前天舒胶囊的质量控制采用不同的色谱条件分别测定天麻素和阿魏酸^[1],文献报道了 HPLC 同步测定天麻素、阿魏酸和 6,7-二羟基藁本内酯^[3],由于藁本内酯类物质具有热敏性和光敏性,不易贮存,并且暂无含量测定级别的市售对照品供应,难以用于天舒胶囊的质量控制。HPLC 和 LC-MS-MS 分析表明天舒胶囊主要成分天麻素、5-羟甲基糠醛(5-HMF)和阿魏酸分别来源于天麻和川芎(结果待发表)。天麻素具有促进心肌细胞能量代谢、降低血压和外周血管阻力作用^[4];5-HMF 具有抗氧化、抗心肌缺血及保护血管内皮细胞的作用^[5];阿魏酸能明显增加冠脉流量,拮抗血小板聚集,增加心肌收缩力,改善血液循环^[6]。天舒胶囊提取物不同部位对 PC12 细胞增殖抑制、氧糖剥夺模型脑微血管内皮细胞和脑神经胶质细胞保护作用的体外试验结果也表明天麻素、5-HMF 和阿魏酸可能是天舒胶囊治疗血瘀所致血管神经性头痛等疾病的物质基础。为了更好地控制天舒胶囊的质量,本研究针对主要成分天麻素、5-HMF 和阿魏酸,建立了同步测定的高效液相色谱法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, XS105 型 1/10 万天平(DualRange), 1/万天平(Mettler Toledo), SHZ-D(III)型循环水式真空泵(河南省予华仪器有限公司), SIGMA1-14 型离心机(德国 SIGMA 公司), EYELA1100 型旋转蒸发仪。

5 批天舒胶囊为江苏康缘药业股份有限公司提供的市售成品;对照品天麻素(批号 110807-200205)、5-羟甲基糠醛(5-HMF, 批号 111626-201007)和阿魏酸(批号 0773-9607)购于中国药品生物制品检定所。甲醇(色谱级, Fisher Sci.), 甲醇(AR, 北京化工厂)、磷酸(AR, 北京化学试剂公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),洗脱梯度(0~10 min, 5%~10% A; 10~16 min, 10% A; 16~50 min, 10%~60% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长 221, 283, 322 nm,进样量 10 μL。

上述色谱条件下,天麻素、5-HMF 和阿魏酸对照品及样品的 HPLC 图见图 1,3 种成分在各自的检测波长下与其他色谱峰分离度良好,并且经纯度检查为单一色谱峰。

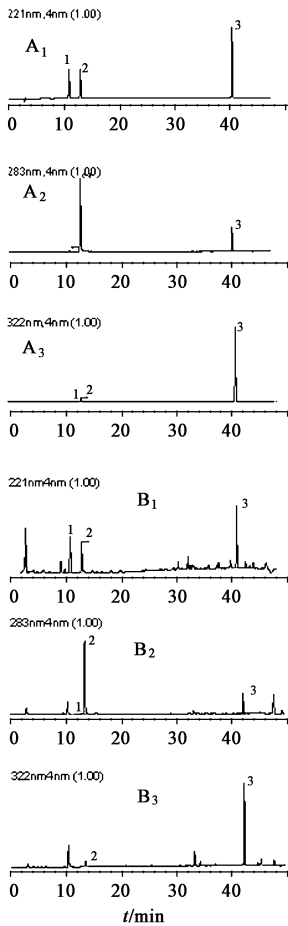
2.2 对照品溶液的制备 分别取上述 3 种对照品适量,精密称定,加入 50% 甲醇制成每 1 mL 含有天麻素 0.598 mg,阿魏酸 0.493 mg 的混合对照品溶液和每 1 mL 含有 0.424 mg 的 5-HMF 对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取天舒胶囊内容物混匀,研细,称取约 1 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 150 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,离心(14 800 r·min⁻¹)10 min,取上清液,即得。

2.4 线性关系考察 将天麻素和阿魏酸混合对照品溶液依次稀释,得到 7 个混标溶液中天麻素的质量浓度依次为 299, 179, 89.8, 44.9, 22.5, 11.2, 5.61 mg·L⁻¹,阿魏酸的质量浓度依次为 247, 148, 74.1, 37.1, 18.5, 9.26, 4.63 mg·L⁻¹;5-HMF 对照品溶液依次稀释为 212, 106, 53.1, 26.5, 13.3, 6.63, 3.31 mg·L⁻¹。上述对照品溶液分别进样 10 μL,在 2.1 色谱条件下进行分析。以对照品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,以峰面积(Y)积分值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液(TSC 批号 110608),按上述色谱条件连续进样 6 次,天麻素、5-HMF、阿魏酸 3 个成分峰面积的 RSD 分别为 0.33%, 0.53%, 0.045%。

2.6 重复性试验 取同一批天舒胶囊(批号



1. 天麻素;2. 5-HMF;3. 阿魏酸

A₁. 混合对照品(221 nm);A₂. 混合对照品(283 nm);

A₃. 混合对照品(322 nm);B₁. 天舒胶囊(221 nm);

B₂. 天舒胶囊(283 nm);B₃. 天舒胶囊(322 nm)

图1 混合对照品和天舒胶囊
在221、283和322 nm下的HPLC

表1 3个成分的线性回归方程

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 /mg·L ⁻¹
天麻素	$Y = 18\ 608\ 105X + 36\ 207$	0.999 9	5.61 ~ 299
5-HMF	$Y = 68\ 571\ 741X + 117\ 288$	0.999 4	3.31 ~ 212
阿魏酸	$Y = 70\ 986\ 787X + 53\ 550$	1.000 0	4.63 ~ 247

110608),按2.3项下方法平行制备供试品溶液6份,分别进样10 μL,测定天麻素、5-HMF和阿魏酸的含量分别为2.71,2.69,2.04 mg·g⁻¹,RSD分别为0.43%,0.89%,0.39%。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,于室温下放置,分别于0,2,4,8,12,24,48,72 h进样,天麻素、5-HMF、阿魏酸的峰面积的RSD分别为0.94%,0.68%,0.42%,表明供试品溶液在72 h内稳定。

2.8 加样回收率试验 称取同一批天舒胶囊(批

号110608)约0.2 g各9份,精密称定,分别精密加入对照品(约相当于各样品含量的80%,100%,120%),按2.3项下方法制备供试品溶液,测定3种成分的含量,计算加样回收率和RSD,结果见表2。

表2 天舒胶囊3种成分加样回收率

成分	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%			
天麻素	0.542	0.427	0.966	99.29	99.74	0.84			
	0.542	0.427	0.964	98.83					
	0.542	0.427	0.968	99.77					
	0.542	0.512	1.06	101.2					
	0.542	0.512	1.05	99.22					
	0.542	0.512	1.05	99.22					
	0.542	0.641	1.19	101.1					
	0.542	0.641	1.18	99.53					
	0.542	0.641	1.18	99.53					
	5-HMF	0.538	0.396	0.930			98.99	102.5	1.53
		0.538	0.396	0.938			101.0		
		0.538	0.396	0.943			102.3		
0.538		0.494	1.05	103.6					
0.538		0.494	1.05	103.6					
0.538		0.494	1.05	103.6					
0.538		0.593	1.15	103.2					
0.538		0.593	1.15	103.2					
0.538		0.593	1.15	103.2					
阿魏酸		0.408	0.293	0.701	100.0	100.3	0.49		
		0.408	0.293	0.699	99.32				
		0.408	0.293	0.701	100.0				
	0.408	0.410	0.820	100.5					
	0.408	0.410	0.819	100.2					
	0.408	0.410	0.820	100.5					
	0.408	0.440	0.851	100.7					
	0.408	0.440	0.852	100.9					
	0.408	0.440	0.851	100.7					
	0.408	0.440	0.851	100.7					

2.9 样品测定 取5批天舒胶囊,按2.3项下方法制备供试品溶液,每批平行制备3份,分别进样2次,测定天麻素、5-HMF和阿魏酸的含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 指标成分的选择 天舒胶囊来源于金·刘完素《宣明论方》治疗偏头痛的经典复方-大川芎方,综

表 3 天舒胶囊成品制剂中 3 种成分的含量 ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	天麻素(221 nm)	5-HMF(283 nm)	阿魏酸(322 nm)
090720	2.70	2.07	1.95
100717	3.63	2.62	2.10
100718	3.65	2.63	2.02
110607	3.06	2.67	2.02
110608	2.70	2.67	2.03

合文献对大川芎方的化学分析^[7-14]和我们前期对天舒胶囊的 HPLC 和 LC-MS-MS 分析,天舒胶囊中主要成分包括以天麻素为代表的小分子酚苷类、巴利森苷类,阿魏酸为代表的有机酸类和以藁本内酯为代表的苯酞类;5-HMF 作为天麻饮片中的主要成分之一,经过提取、精制和成型工艺,也被转移到了天舒胶囊中。实验设计时曾考虑天麻素、5-HMF、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷、阿魏酸和藁本内酯同步测定,但巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷是天舒胶囊中的微量成分,藁本内酯与其他目标成分极性差异较大,优化同步测定的色谱条件时,巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷和藁本内酯的色谱峰纯度一直难以满足定量分析要求。因此,本研究只涉及了天麻素、5-HMF 和阿魏酸的高效液相同步测定方法,微量的巴利森苷类不建议作为天舒胶囊的质量控制指标,藁本内酯类物质单独测定。

3.2 检测波长的选择 2010 年版《中国药典》对天舒胶囊的含量测定采用两个不同的色谱条件分别测定天麻素、阿魏酸的含量,本研究分别选择天麻素(221 nm)、5-HMF(283 nm)和阿魏酸(322 nm)的紫外最大吸收作为检测波长,进行同一样品在不同波长下同步检测,3 种成分与相邻色谱峰分离度良好,并且每一个色谱峰的纯度检查均显示为单一色谱峰。

在优化的色谱条件下,5 批天舒胶囊中天麻素、5-HMF 和阿魏酸的含量分别为 2.70 ~ 3.65, 2.07 ~ 2.67 和 1.95 ~ 2.10 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其中天麻素和阿魏酸的含量均符合 2010 年版《中国药典》天舒胶囊质量标准项下天麻素 $\geq 2.35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,阿魏酸 $\geq 1.09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的限度要求。

[参考文献]

[1] 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,2010:523.

[2] Xia W, Zhu M J, Zhang Z. Effect of Tianshu capsule in treatment of migraine: a meta-analysis of randomized control trials [J]. J Trad Chinese Medicine, 2013, 33(1):9.

[3] 张晖芬,陈晓辉,霍艳双,等. RP-HPLC 双波长切换法同时测定天舒胶囊中天麻素、阿魏酸和 6,7 二羟基藁本内酯的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2012, 29(6):443.

[4] 孙中吉,王辉. 天麻素注射液的药理作用和临床应用[J]. 时珍国医国药,2008,19(4):1011.

[5] 傅紫琴,王明艳,蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨[J]. 中华中医药学刊,2008,26(3):508.

[6] 欧仕益,包惠燕,蓝志东. 阿魏酸及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 中药材,2001,24(3):220.

[7] 周明眉,王兴,杨奎,等. 从大川芎方看中药现代化研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2002,4(1):27.

[8] 洪燕龙,冯怡,徐德生,等. 大川芎方治疗偏头痛效应组分的提取、纯化工艺研究[J]. 中药材,2007,30(6):721.

[9] 倪书茂,钱大玮,尚尔鑫,等. 大川芎方化学成分的超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):39.

[10] 魏元锋,张宁,林晓,等. 大川芎方多元释药系统的体外释药特征和大鼠体内药代动力学研究[J]. 药学报,2011,46(9):1150.

[11] 魏元锋,林晓,张宁,等. 大川芎方效应组分血中移行成分 UPLC-MS 分析[J]. 中国中药杂志,2011,36(9):1245.

[12] Sun G L, Lin X, Hong Y L, et al. Simultaneous determination of three bioactive ingredients of Da Chuanxiong Fang in rat plasma by HPLC-DAD: application to Pharmacokinetic study [J]. J Liq Chromatogr Related Technol, 2011, 34(16):1811.

[13] Zheng Q, Yue P F, Wu B, et al. Pharmacokinetics comparative study of a novel Chinese traditional herbal formula and its compatibility [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1):221.

[14] 沈岚,林晓,梁爽,等. HPLC-DAD-MSⁿ 联用技术表征大川芎方效应组分中主要化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):128.

[责任编辑 顾雪竹]