

HPLC 同时测定蝎龙接骨散中 羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量

王亚洲, 杨春旭*

(广西医科大学第四附属医院, 广西 柳州 545005)

[摘要] 目的:建立蝎龙接骨散中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法进行定量分析,用 Inertsil C₈₋₃ 柱,乙腈-0.2% 磷酸-四氢呋喃(28:70:2)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 340 nm。结果:羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的线性范围分别为 11.13 ~ 111.35 mg·L⁻¹ 和 3.42 ~ 34.2 mg·L⁻¹;平均加样回收率分别为 100.35%, 99.23%。结论:此法简便、准确,具有良好的重复性和回收率,适用于蝎龙接骨散中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的同时测定。

[关键词] 蝎龙接骨散; 羟基红花黄色素 A; 阿魏酸; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0109-03

Simultaneous Determination of Hydroxysafflor Yellow A and Ferulic Acid in Xielongjiegu Powder by HPLC

WANG Ya-zhou, Yang Chun-xu*

(No. 4 Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of the content of hydroxysafflor yellow A and ferulic acid in Xielongjiegu powder. **Method:** The quantitative analysis was carried out by HPLC with a Inertsil C₈₋₃ column. The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid-tetrahydrofuran (28:70:2) with a flow rate at 1.0 mL·min⁻¹. Detection wavelength was set at 340 nm. **Result:** The linear ranges for hydroxysafflor yellow A and ferulic acid were 11.13-111.35 mg·L⁻¹ and 3.42-34.2 mg·L⁻¹ respectively. The average recoveries were 100.35% and 99.23%. **Conclusion:** This method is simple and accurate with good repeatability and recovery. It is suitable for the determination of the content of hydroxysafflor yellow A and ferulic acid in Xielongjiegu powder.

[Key words] Xielongjiegu Powder; hydroxysafflor yellow A; ferulic acid; HPLC; content

蝎龙接骨散为我院院内制剂,处方包括全蝎、血竭、当归、红花、白及、儿茶、三七、大黄、桃仁等数味中药,具有活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨等功效^[1],临床用于治疗各种跌打损伤、腰膝酸痛、骨质增生、闭合性骨折等,疗效确切,副作用小。为进一步提高本制剂质量标准,更有效地控制成

品质量,本文参阅有关文献^[2-4],采用高效液相色谱测定方法,可以同时测定蝎龙接骨散中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量。

1 仪器与试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱仪 (SHIMADZU 公司),752 型紫外分光光度计 (南京麒麟公司),AB-L 型电子分析天平 (梅特勒-托利多公司),MP511 型电子 pH 计 (上海三信仪表厂),B2500S 型超声波清洗器 (美国 BRANSON 公司)。组方中各药材均购自柳州市百草堂中药饮片厂,羟基红花黄色素 A 对照品 (上海源叶生物科技有限公司,批号 20110311),阿魏酸对照品 (上海源叶生物科技有限公司,批号 20110406),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为重蒸馏水,蝎龙接骨散 (本院制剂室自制,

[收稿日期] 20120112(003)

[基金项目] 广西科技厅攻关基金项目(9920028);广西柳州市科技局科技攻关基金项目(990608)

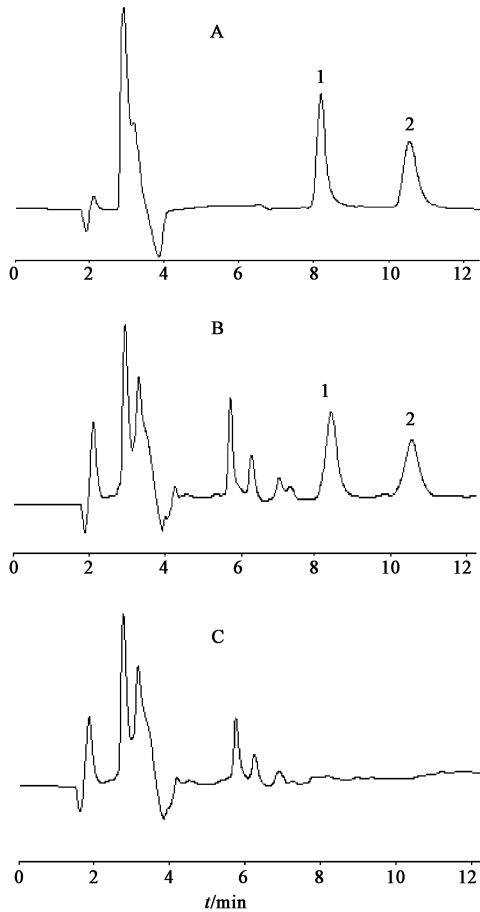
[第一作者] 王亚洲,硕士,主管药师,从事药品质量标准工作, Tel:0772-3802560, E-mail:lzpharmaey@163.com

[通讯作者] * 杨春旭,博士,主任医师,从事医院管理及科研, Tel: 0772-3802560, E-mail: yangchunxu008 @ 126.com

批号 110812,110823,110906)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性实验 Inertsil C_{8,3} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸-四氢呋喃(28:70:2),检测波长 340 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。在此色谱条件下,羟基红花黄色素 A 和阿魏酸均能够达到基线分离,其他成分对测定没有干扰。羟基红花黄色素 A 保留时间约为 8.3 min,阿魏酸保留时间为 10.5 min。见图 1。



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性对照;
1. 羟基红花黄色素 A;2. 阿魏酸

图 1 蝎龙接骨散 HPLC 图谱

2.2 对照品溶液的制备 称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的羟基红花黄色素 A 和阿魏酸对照品适量,精密称定,置于棕色量瓶中,加 50% 甲醇制成每 1 mL 分别含羟基红花黄色素 A 445.4 μg 和阿魏酸 136.8 μg,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取蝎龙接骨散约 1 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入甲醇 5 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,以甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤。续滤液以 0.45 μm 微

孔滤膜过滤,即得。

2.4 阴性对照品溶液的制备 按照处方组成,取除红花和当归以外的其余药材,按工艺要求制成不含羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的散剂,按照供试品溶液制备项下的方法,即得阴性对照品溶液。

2.5 线性范围考察 取上述混合对照品溶液适量,用 50% 甲醇稀释成 6 个浓度,即得羟基红花黄色素 A 浓度分别为 11.13,22.27,44.54,66.81,89.08,111.35 mg·L⁻¹,阿魏酸浓度分别为 3.42,6.84,13.68,20.52,27.36,34.20 mg·L⁻¹ 的溶液。依次进样,按上述色谱条件测定,再分别以两组分的进样浓度为横坐标,以相应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的回归方程分别为 $Y = 17\ 134X + 25\ 607 (r = 0.999\ 5)$, $Y = 38\ 516X - 25\ 860 (r = 0.999\ 6)$ 。结果表明,两组分的线性范围分别为 11.13 ~ 111.35,3.42 ~ 34.2 mg·L⁻¹。

2.6 进样精密度的试验 分别取上述混合对照品溶液 1 000,500,200 μL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,配成高、中、低 3 种浓度。分别在同日内连续进样 5 次,计算日内精密度,结果羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的 RSD 分别为 1.96%,1.43% (n = 5);在 5 日内连续进样 5 次,计算日间精密度,结果两者的 RSD 分别为 2.27%,2.46% (n = 5),说明本法进样精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批(批号 110812)蝎龙接骨散,按供试品溶液制备方法制得 6 份,再按照上述色谱条件测定。测得羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的 RSD 分别为 1.58%,1.34%,说明本法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批(批号 110812)蝎龙接骨散 6 份,每份 0.5 g,分别置于量瓶中,再加入一定量的混合对照品溶液,按供试品溶液制备方法制备成供试品溶液,并按上述色谱条件进行测定。计算结果见表 1。

2.9 样品含量测定 按“供试品溶液的制备”方法制备 3 批(每批各 5 份)蝎龙接骨散供试品溶液,按上述色谱条件测定,以外标法计算供试品溶液的含量,结果见表 2。

3 讨论

HPLC 同时测定制剂中多种组分,选择合适的检测波长尤为关键。我们将羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的对照品溶液分别进行全波长紫外扫描,确定羟基红花黄色素 A 最大吸收波长为 403 nm,阿魏酸的最大吸收波长为 327 nm。在上述色谱条件下,

表1 蝎龙接骨散2种成分加样回收率试验($n=6$)

组分	样品中 含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	$\bar{x}/\%$	RSD /%
羟基红花	21.69	22.27	43.54	98.11	100.35	2.73
黄色素A	21.51	22.27	43.06	96.77		
	21.25	22.27	43.82	101.35		
	22.88	22.27	46.05	104.04		
	23.12	22.27	45.92	102.38		
	22.43	22.27	44.57	99.43		
阿魏酸	6.78	6.84	13.41	96.93	99.23	1.95
	6.65	6.84	13.52	100.49		
	5.99	6.84	12.77	99.12		
	6.23	6.84	13.23	102.34		
	6.42	6.84	13.12	97.95		
	6.61	6.84	13.35	98.54		

表2 蝎龙接骨散样品中2种成分含量测定($n=5$) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	羟基红花黄色素A	阿魏酸
110812	44.31 ± 0.30	12.86 ± 0.14
110823	41.92 ± 0.23	14.15 ± 0.17
110906	43.57 ± 0.16	13.38 ± 0.09

分别于327,340,370,403 nm等处对供试品溶液进行分析,发现阿魏酸最大吸收波长327 nm附近的340 nm处所得的HPLC图谱上各组分峰分离效果较好,杂质干扰峰亦被消除,且能较好地兼顾含量较小的阿魏酸的峰形,因此选择340 nm作为检测波长。

在供试品溶液的制备过程中,关于取样量和加入溶剂量的多少问题,我们摸索了多个条件,最终选择“供试品1 g中加入甲醇5 mL超声提取”。在这个条件下,供试品溶解较好;羟基红花黄色素A和阿魏酸的浓度适中,HPLC图谱中两者的峰值较为合适;加样回收率等结果比较理想。

参考有关文献^[5-7],经过不同流动相的摸索,发现乙腈-0.2%磷酸-四氢呋喃(28:70:2)为测定流动

相时,两组分的出峰时间合适,峰形好、无拖尾,且不受杂质峰干扰。在流动相中少量加入的四氢呋喃,很好的改善了峰形。但四氢呋喃容易与流动相中的溶解氧形成有紫外吸收的络合物,此络合物会提高背景吸收(特别是在260 nm以下),导致检测灵敏度的轻微降低^[8],所以试验流动相必须预先彻底脱气。四氢呋喃易被氧化从而可能在色谱图中产生倒峰,故添加四氢呋喃的流动相宜现用现配。

相比于文献^[9]中的甲醇-氯仿提取再蒸干法,本试验中仅需用甲醇超声处理即可进行含量测定,操作简便易行。对3批样品分别进行分析,测定结果准确、重复性好,说明本法可作为控制蝎龙接骨散质量的定量方法。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:124,141.
- [2] 梁陈方,肖萍,李文仕,等. 蝎龙接骨散的制备及质量控制[J]. 时珍国医国药,2009,20(7):1701.
- [3] 刘进怀,张晴,薛彬,等. HPLC测定降糖明目颗粒中羟基红花黄色素A的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):48.
- [4] 李婉晴,范俊婷,刘勇,等. HPLC法同时测定抗眩晕颗粒中盐酸川芎嗪和阿魏酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):59.
- [5] 于志庚,陈卫军,王新春,等. 月红胶囊中羟基红花黄色素A的HPLC定量分析[J]. 中国中药杂志,2005,30(15):1206.
- [6] 李婉晴,范俊婷,刘勇,等. HPLC法测定抗眩晕颗粒中盐酸川芎嗪和阿魏酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):59.
- [7] 王永新,徐荣,白霜. 高效液相色谱法测定红花散瘀胶囊中羟基红花黄色素A的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(1):12.
- [8] 张庆合. 高效液相色谱实用手册[M]. 北京:化学工业出版社,2008:83.
- [9] 梁陈方,杨春旭,肖萍. 高效液相色谱法测定蝎龙接骨散中血竭素的含量[J]. 中国药师,2009,12(4):420.

[责任编辑 顾雪竹]