

HPLC 测定五味渣驯丸中羟基红花黄色素 A、 没食子酸和马兜铃酸 A 的含量

倪琳, 杨锡

(甘肃省食品药品检验所 甘肃省中药品质与安全评价工程技术研究中心, 兰州 730000)

[摘要] 目的:建立五味渣驯丸中羟基红花黄色素 A、没食子酸、马兜铃酸 A 的含量测定方法。方法:采用 HPLC 对制剂中主要成分羟基红花黄色素 A、没食子酸、马兜铃酸 A 进行定量分析。CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-0.4% 磷酸(30:70)、甲醇-0.2% 磷酸(7:93)、甲醇-0.05% 冰醋酸(79:21)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 403, 273, 390 nm。结果:羟基红花黄色素 A、没食子酸、马兜铃酸 A 的线性范围分别为 0.116 ~ 1.740 μg ($r = 0.999\ 97$), 0.067 ~ 0.673 μg ($r = 0.999\ 95$), 0.024 ~ 0.247 μg ($r = 0.999\ 99$); 平均回收率分别为 98.62% (RSD 2.15%), 100.01% (RSD 2.03%), 96.83% (RSD 1.74%)。结论:本方法简便、结果准确可靠,可有效控制制剂质量。

[关键词] 羟基红花黄色素 A; 没食子酸; 马兜铃酸 A; 高效液相色谱法; 五味渣驯丸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0109-04

Determination of Hydroxysafflor Yellow A, Gallic Acid and Aristolochic Acid A in Wuwei Zhaxun Pill by HPLC

NI Lin, YANG Xi

(Gansu Provincial Institute of Food and Drug Control, Gansu Province Traditional Chinese Medicine Quality and Safety Evaluation of Engineering Technology Research Center, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an method for determination of hydroxysafflor yellow A, gallic acid and aristolochic acid A in Wuwei Zhaxun pill. **Method:** The hydroxysafflor yellow A, gallic acid and aristolochic acid A in Wuwei Zhaxun pill was determined by HPLC. CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used and detection wavelength was at 403, 273, 390 nm. The mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid (30:70), methanol-0.2% phosphoric acid (7:93), methanol-0.05% glacial acetic acid (79:21), with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The calibration curves of hydroxysafflor yellow A, gallic acid and aristolochic acid A were in a good linearity over the ranges of 0.116-1.740 μg ($r = 0.999\ 97$), 0.067-0.673 μg ($r = 0.999\ 95$), 0.024-0.247 μg ($r = 0.999\ 99$), respectively. The average recoveries were 98.62% (RSD 2.15%), 100.01% (RSD 2.03%), 96.83% (RSD 1.74%). **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used for the control.

[Key words] hydroxysafflor yellow A; gallic acid; aristolochic acid A; HPLC; Wuwei Zhaxun pill

藏药五味渣驯丸(藏文名渣驯阿巴日布)收载于《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药)(第一册)》,由红花、诃子、木香马兜铃、渣驯膏、甘青青兰

5味药组成,具有清肝解毒的功效,用于各种肝炎引起的上腹不适、乏力、纳差、巩膜皮肤黄染、尿色深黄等^[1]。原标准中只有显微鉴别项。红花的主要有效成分为羟基红花黄色素 A,诃子中主要有效成分为没食子酸,木香马兜铃中主要有效成分为马兜铃酸 A。本试验采用高效液相色谱法测定羟基红花黄色素 A、没食子酸、马兜铃酸 A 的含量,方法简便,结果准确可靠,为有效控制制剂质量提供了依据。

[收稿日期] 20111022(004)

[第一作者] 倪琳,本科,主管药师,从事中成药、藏药质量分析及检验工作, Tel: 0931-4968949, E-mail: nilinmanager937@sohu.com

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters Alliance e2695 四元泵, Waters 2998 二极管阵列检测器, Mettler AE240 电子天平。

1.2 试药 羟基红花黄色素 A 对照品(批号 111637-200704)、没食子酸对照品(批号 110831-200302)、马兜铃酸 A 对照品(批号 110746-200406),均购自中国药品生物制品检定所;五味渣驯丸样品(批号 100903, 100802, 100701)由甘南佛阁藏药有限公司提供;甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取羟基红花黄色素 A 对照品适量,精密称定,加 25% 甲醇制成每 1 mL 含 0.116 mg 的溶液,即得。取没食子酸对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.067 3 mg 的溶液,即得。取马兜铃酸 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 23.62 μg 的溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 羟基红花黄色素 A 取本品 5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加 25% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,用 25% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

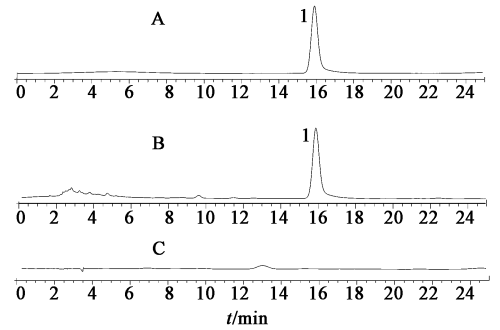
2.2.2 没食子酸 取本品 1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加 50% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)40 min,放冷,用 50% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 马兜铃酸 A 取本品 2g,精密称定,置锥形瓶中,精密加甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备 按供试品的处方和制法,分别制成不含红花、诃子、木香马兜铃的阴性样品,按上述供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

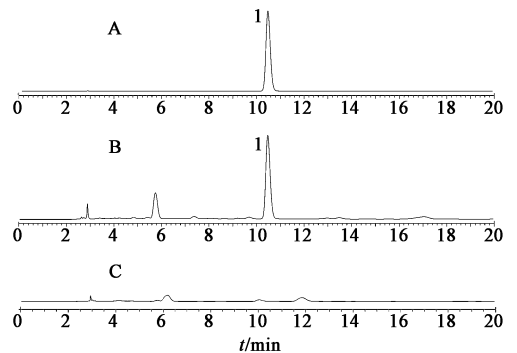
2.4 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱选用 CAPCELL PAK C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸(30:70),检测波长 403 nm,(羟基红花黄色素 A),甲醇-0.2% 磷酸(7:93),检测波长 273 nm(没食子酸),甲醇-0.05% 冰醋酸(79:21),检测波长 390 nm(马兜铃酸 A),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,进样体积 10 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数分别按羟基红花黄色素 A 峰、没食子酸峰、马兜铃酸 A 峰计算均不低于 3 000。对照品、供试品以及阴性对

照色谱图见图 1~3。阴性对照无干扰。



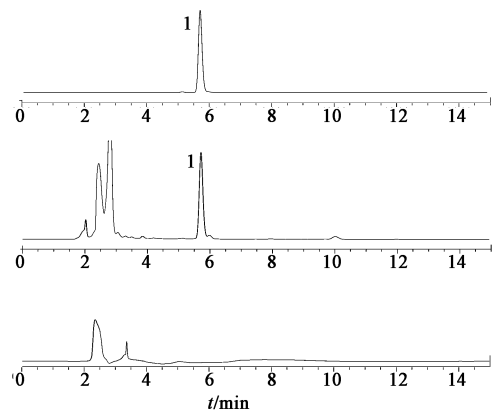
A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 羟基红花黄色素 A

图 1 五味渣驯丸中羟基红花黄色素 A HPLC



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 没食子酸

图 2 五味渣驯丸中没食子酸 HPLC



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 马兜铃酸 A

图 3 五味渣驯丸中马兜铃酸 A HPLC

2.5 工作曲线与线性关系 分别精密吸取羟基红花黄色素 A 对照品溶液 1, 5, 8, 10, 12, 15 μL 、没食子酸对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL 、马兜铃酸 A 对照品溶液 1, 4, 6, 8, 10, 12 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积积分值,分别以对照品溶液的进样量(μg)(X)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标(Y),作图,

得到回归方程。羟基红花黄色素A, $Y = 5.8953 \times 10^{-7} X + 0.0456$ ($r = 0.99997$), 没食子酸 $Y = 3.2464 \times 10^{-7} X + 0.0934$ ($r = 0.99995$), 马兜铃酸A $Y = 8.3630 \times 10^{-7} X + 0.0456 \times 10^{-4}$ ($r = 0.99999$)。结果表明,羟基红花黄色素A在0.116~1.740 μg 均呈良好的线性关系;没食子酸在0.067~0.673 μg 均呈良好的线性关系;马兜铃酸A在0.024~0.247 μg 均呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取羟基红花黄色素A对照品溶液、没食子酸对照品溶液、马兜铃酸A对照品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,连续进样6次,测定峰面积,RSD分别为0.96%,0.07%,0.55%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,每隔2 h时间进样1次,结果在12 h内,供试品溶液中羟基红花黄色素A、没食子酸、马兜铃酸A峰面积稳定,RSD分别为1.25%,1.62%,0.87%。

2.8 重复性试验 取五味渣驯丸(批号100903)6份共3组,1组每份5 g,1组每份2 g,1组每份2 g,精密称定,分别按羟基红花黄色素A、没食子酸、马兜铃酸A供试品溶液制备方法制备,在确定的色谱条件下进行分析,含羟基红花黄色素A 1.45 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 1.25%;含没食子酸 6.96 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 0.95%;含马兜铃酸A 0.28 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 1.14%。

2.9 加样回收率试验 分别取已知羟基红花黄色素A、没食子酸、马兜铃酸A含量的供试品(批号100903)6份共3组,一组每份约2 g,一组每份约0.5 g,一组每份约1 g,精密称定,分别精密加入一定量的羟基红花黄色素A对照品溶液(0.10085 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、没食子酸对照品溶液(0.2127 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、马兜铃酸A对照品溶液(0.02062 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),分别按羟基红花黄色素A、没食子酸、马兜铃酸A供试品溶液制备方法制备,依法测定,即得(表1)。

表1 五味渣驯丸加样回收率试验

样品	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得总量/%	回收率/%	平均/%	RSD/%
羟基红花黄色素A	2.2317	3.2136	2.017	5.1533	96.17	98.62	2.15
	2.1821	3.1422	2.017	5.1300	98.55		
	2.0578	2.9632	2.5213	5.5150	101.21		
	2.0627	2.9703	2.5213	5.5007	100.36		
	2.0421	2.9406	3.0255	5.9443	99.28		
	2.0873	3.0057	3.0255	5.9141	96.13		
没食子酸	0.5178	3.6039	2.127	5.6730	97.28	100.01	2.03
	0.5123	3.5719	2.127	5.7365	101.27		
	0.5547	3.8607	3.1905	7.1424	102.86		
	0.5421	3.7730	3.1905	6.9804	100.53		
	0.5625	3.9150	4.254	8.1630	99.86		
	0.5879	4.0918	4.254	8.2714	98.25		
马兜铃酸A	1.2115	0.3392	0.2062	0.5355	95.20	96.83	1.74
	1.1728	0.3283	0.2062	0.5258	95.78		
	1.1364	0.3182	0.3092	0.6257	99.45		
	1.2737	0.3566	0.3092	0.6608	98.38		
	1.4596	0.4087	0.4124	0.8039	95.83		
	1.3182	0.3691	0.4124	0.7665	96.36		

2.10 样品的测定 取3批五味渣驯丸按供试品溶液的制备方法制成供试液,分别进样,测得峰面积值,计算五味渣驯丸中羟基红花黄色素A、没食子酸、马兜铃酸A的含量(表2)。

3 讨论

3.1 流动相的选择 用同一种色谱条件测定3种成分,但分离效果不理想,且波长不好统一,曾试验甲醇-0.03 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [2]、乙腈-0.05%磷酸^[3]测定羟

表 2 五味渣驯丸样品测定 ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	羟基红花黄色素 A	没食子酸	马兜铃酸 A
100903	1.44	6.96	0.28
100802	1.52	6.92	0.26
100701	1.50	6.79	0.28

基红花黄色素 A 的含量,对照品及供试品色谱中羟基红花黄色素 A 峰形拖尾、在文献^[4]流动相基础上适当调整,羟基红花黄色素 A 的峰形较好,最后确定甲醇-0.4% 磷酸 (30:70) 作为本文测定羟基红花黄色素 A 含量流动相的方法。曾试验乙腈-0.05% 磷酸^[5]测定没食子酸的含量,供试品色谱中没食子酸未达到基线分离、在文献^[6-7]流动相基础上适当调整,没食子酸分离效果良好,最后确定甲醇-0.2% 磷酸 (7:93) 作为本文测定没食子酸含量流动相的方法。在文献^[8-10]流动相基础上适当调整,马兜铃酸 A 分离效果良好,最后确定甲醇-0.05% 冰醋酸 (79:21) 作为本文测定马兜铃酸 A 含量流动相的方法。

3.2 提取时间的选择 采取 25% 甲醇、50% 甲醇、甲醇超声处理,考察了不同超声时间 20,30,40,60 min 所提取的 3 种成分的含量,结果样品中羟基红花黄色素 A 以 25% 甲醇超声 30 min 提取完全、没食子酸以 50% 甲醇超声 40 min 提取完全、马兜铃酸 A 以甲醇超声 30 min 提取完全。

3.3 检测波长的选择 采用 DAD 在 190~400 nm 全波长扫描,结果羟基红花黄色素 A 最佳吸收为 403 nm,没食子酸最佳吸收为 273 nm,马兜铃酸 A 最佳吸收为 390 nm。

马兜铃酸的肾毒性与剂量呈相关性^[11]。在五味渣驯丸中含有较高含量的马兜铃酸 A,为此还须再进一步研究,有必要加强对木香马兜铃药材的质

量控制和鉴定,在制剂中对木香马兜铃中马兜铃酸 A 进行控制,以及对临床不良反应的监测和研究。

[参考文献]

- [1] 卫生部. 中国卫生部药品标准. 藏药. 第 1 册 [S]. WS₃-BC-0274-95.
- [2] 刘红,郁晓芝,李炳奇,等. RP-HPLC 法测定保健饮料中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 食品科学,2006,27(2):232.
- [3] 宋洪涛,张丽,张颖. HPLC 法测定舒胸制剂中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 解放军药学报,2008,24(1):67.
- [4] 王水潮. HPLC 法测定三十五味沉香丸中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 中国药科大学学报,2008,39(6):582.
- [5] 崔岚,李肖玲,祝德秋. 反相高效液相色谱法测定清炎颗粒中没食子酸的含量 [J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(10):880.
- [6] 王景,徐秀珍,夏文孝,等. 反相高效液相色谱法测定洁白胶囊中没食子酸的含量 [J]. 中国药业,2011,20(20):41.
- [7] 霍文,刘占军,张婷婷. 反相高效液相色谱法测定石榴皮中没食子酸的含量 [J]. 西北药学杂志,2007,22(5):242.
- [8] 齐晋山. HPLC 测定单叶细辛中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 齐鲁药事,2010,29(10):593.
- [9] 周士臻. 高效液相色谱法测定关木通药材中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 海峡药学报,2007,19(5):46.
- [10] 吴建红. 高效液相色谱法测定导赤散及其配伍组中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 湖北中医学院学报,2009,11(3):30.
- [11] 郭晓昕,程鲁榕. 马兜铃酸毒理学性研究与启示 [J]. 中国新药杂志,2005,14(3):363.

[责任编辑 顾雪竹]