

HPLC同时测定五加生化胶囊中3种有效成分的含量

耿放¹, 朱魁元², 王发善³, 邹韬博², 李铁男², 张宁^{2*}

(1. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江佳木斯 154007; 3. 多多药业有限公司, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的: 建立同时测定五加生化胶囊中3种有效成分阿魏酸、绿原酸和异秦皮啶的含量分析方法。方法: 采用高效液相色谱法, ANGLA Venusil XBP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 检测波长 323, 327, 343 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。结果: 在上述色谱条件下, 绿原酸、阿魏酸、异秦皮啶之间有良好的分离度, 绿原酸 (λ = 327 nm) 线性范围 18.14 ~ 108.84 mg·L⁻¹ (r = 0.999 8); 异秦皮啶 (λ = 343 nm) 线性范围 5.10 ~ 30.60 mg·L⁻¹ (r = 0.999 5); 阿魏酸 (λ = 323 nm) 线性范围 7.34 ~ 44.04 mg·L⁻¹ (r = 0.999 4), 平均回收率分别为 (97.92 ± 1.751)%, (98.82 ± 1.494)%, (104.0 ± 1.355)%。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 为五加生化胶囊的质量控制提供可借鉴的分析方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 五加生化胶囊; 阿魏酸; 绿原酸; 异秦皮啶

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0109-03

Simultaneous Determination of Three Active Ingredients in Wujia Shenghua Capsule by HPLC

GENG Fang¹, ZHU Kui-yuan², WANG Fa-shan³, ZOU Tao-bo², LI Tie-nan², ZHANG Ning^{2*}

(1. Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 2. Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China; 3. DUODUO Pharmaceutical Co. Ltd., Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, ferulic acid and isofraxidine in Wujia Shenghua capsules. **Method:** The chromatographic separation was performed on a Welch Materials XBP-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the column temperature was maintained at 25 °C. The UV detection wavelengths were at 327, 323, 343 nm. A gradient elution of methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution was adopted at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The injection volume was 20 μL. **Result:** The good resolution can be achieved among chlorogenic acid, ferulic acid and isofraxidine. Chlorogenic acid, ferulic acid and isofraxidine were linear in the range of 18.15-108.90 mg·L⁻¹ (r = 0.999 8), 5.10-30.60 mg·L⁻¹ (r = 0.999 5) and 7.35-44.10 g·L⁻¹ (r = 0.999 4), respectively. The average recoveries (n = 6) were between 95% and 105%. **Conclusion:** The method is accurate, easy and reproducible, which can be applied to quality control of Wujia Shenghua capsule.

[Key words] HPLC; Wujia Shenghua capsule; chlorogenic acid; ferulic acid; isofraxidine

五加生化胶囊收载于《国家药品标准——新药转正标准》第33册^[1], 其源于产后圣方——生化汤, 由刺五加、当归、川芎、桃仁、甘草、炮姜等药物制

成, 具有益气养血、活血化瘀、行气止痛功效, 适用于产后气虚血瘀所致阴道出血及痛经等症^[2]。但原国家标准^[1]中仅有异秦皮啶的含量测定, 无法整体

[收稿日期] 20110730(004)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511167)

[第一作者] 耿放, 博士, 从事天然药物活性成分研究, Tel: 15046068433, E-mail: gengfang1980@hotmail.com

[通讯作者] * 张宁, 副教授, 硕士, 从事中药药效物质基础及体内代谢研究, Tel: 0454-6050350, E-mail: zhang-ning2006@hotmail.com

控制药品质量。本实验以高效液相色谱法同时测定五加生化胶囊中阿魏酸^[3-6]、绿原酸^[7-8]、异秦皮啶^[7]三种主要药效物质的含量,为全面控制五加生化胶囊的内在质量提供方法借鉴。

1 仪器与试剂

戴安 P680 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),TGL-16G-C 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),(赛多利斯公司),阿魏酸(批号 0773-9910,中国药品生物制品检定所);异秦皮啶(批号 110837-200304,中国药品生物制品检定所),绿原酸(批号 110753-200413,中国药品生物制品检定所)。五加生化胶囊(批号 0911251,0910261,0805161,0909091,1002031,0811021,0803041,1005121,1007031,0902051,0806191,多多药业有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 DIKMA 公司);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 ANGLA Venusil XBP-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 甲醇, B 0.1% 磷酸溶液,流速 1.0 mL·min⁻¹,梯度洗脱(表 1);检测波长 323, 327, 343 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序表

t/min	A	B
0	5	95
10	20	80
18	25	75
23	25	75
32	30	70
72	70	30
87	100	0

2.2 对照品溶液的制备 称取阿魏酸、绿原酸和异秦皮啶对照品适量,精密称定,置于同一量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含阿魏酸 367 μg、绿原酸 907 μg 和异秦皮啶 255 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定五加生化胶囊内容物约 0.4 g,用 25 mL 甲醇超声提取 30 min(两次),滤过,合并滤液,浓缩,用甲醇定容置 10 mL 量瓶中,上清液 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液作为供试品溶液,进样 20 μL。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品混合溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配成不同浓度的混合对照品溶液。吸取各混合对照品溶液 20 μL 注入

高效液相测谱仪,以峰面积(mAU * min)积分为纵坐标,对照品浓度(mg·L⁻¹)为横坐标绘制得标准曲线,绿原酸(λ = 327 nm) Y = 1.451 3X - 3.433 6 (r = 0.999 8),线性范围 18.14 ~ 108.84 mg·L⁻¹;异秦皮啶(λ = 343 nm) Y = 0.853 4X - 1.038 2 (r = 0.999 5),线性范围 5.10 ~ 30.60 mg·L⁻¹;阿魏酸(λ = 323 nm) Y = 1.096 1X - 8.236 (r = 0.999 4),线性范围 7.34 ~ 44.04 mg·L⁻¹。

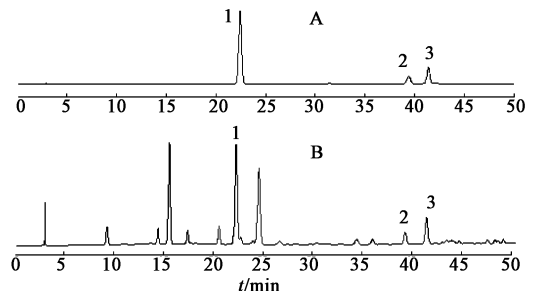
2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,进样 20 μL,连续进样 6 次,记录色谱峰峰面积,阿魏酸、绿原酸和异秦皮啶色谱峰峰面积 RSD 分别为 1.02%, 0.96%, 1.21%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定,记录色谱峰峰面积,阿魏酸、绿原酸和异秦皮啶色谱峰峰面积 RSD 分别为 1.23%, 1.86%, 1.71%。表明 3 种成分在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 重复制备 6 份同一批次的供试品溶液,分别测定,记录色谱峰峰面积,阿魏酸、绿原酸和异秦皮啶色谱峰峰面积 RSD 分别为 0.94%, 1.89%, 1.74%。表明本方法重现性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的五加生化胶囊内含物约 0.2 g,精密加入混合对照品溶液 0.35 mL(相当于绿原酸 317 μg,阿魏酸 128 μg,异秦皮啶 79 μg),按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,进行回收率测定。结果表明,阿魏酸、绿原酸、异秦皮啶的回收率分别为 97.92%, 98.82%, 104.0%, RSD 分别为 1.75%, 1.49%, 1.36%。表明回收率良好(表 2)。

2.9 样品测定 取 11 批样品,制备供试品溶液溶液,每个样品重复进样 3 次,按确定的色谱条件进行分析,在拟定的条件下各被测成分与共存成分实现基线分离(图 1)。在此基础上,以外标法计算样品中各成分含量(表 3)。



1. 绿原酸; 2. 异秦皮啶; 3. 阿魏酸

图 1 混合对照品(A)、五加生化胶囊样品(B)的 HPLC(327 nm)

表2 五加生化胶囊中各成分回收率实验($n=6$)

对照品	称样量/g	样品含量/mg	加入对照品量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
阿魏酸	0.209 8	0.134 0	0.128 5	0.260 2	98.20	97.92	1.75
	0.212 3	0.135 6	0.128 5	0.265 1	100.8		
	0.205 6	0.131 3	0.128 5	0.257 6	98.30		
	0.207 5	0.132 5	0.128 5	0.257 0	96.88		
	0.206 6	0.122 0	0.128 5	0.247 7	97.79		
	0.210 4	0.134 4	0.128 5	0.257 2	95.53		
绿原酸	0.209 8	0.324 0	0.317 5	0.634 5	97.79	98.82	1.49
	0.212 3	0.327 9	0.317 5	0.641 8	98.88		
	0.205 6	0.317 5	0.317 5	0.627 1	97.50		
	0.207 5	0.320 5	0.317 5	0.642 4	101.4		
	0.206 6	0.319 1	0.317 5	0.635 3	99.59		
	0.210 4	0.324 9	0.317 5	0.635 3	97.77		
异秦皮啶	0.209 8	0.078 0	0.089 3	0.172 4	105.7	104.0	1.36
	0.212 3	0.078 9	0.089 3	0.171 4	103.6		
	0.205 6	0.076 4	0.089 3	0.170 6	105.5		
	0.207 5	0.077 1	0.089 3	0.169 3	103.2		
	0.206 6	0.076 8	0.089 3	0.168 6	102.3		
	0.210 4	0.078 2	0.089 3	0.170 5	103.4		

表3 五加生化胶囊中各成分测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	阿魏酸	绿原酸	异秦皮啶
0911251	0.67 ± 0.01	1.62 ± 0.03	0.39 ± 0.01
0910261	0.75 ± 0.01	1.42 ± 0.02	0.37 ± 0.01
0805161	0.57 ± 0.01	1.02 ± 0.02	0.32 ± 0.01
0909091	0.71 ± 0.01	1.54 ± 0.03	0.50 ± 0.01
1002031	0.43 ± 0.01	1.23 ± 0.02	0.43 ± 0.01
0811021	0.39 ± 0.01	1.38 ± 0.02	0.40 ± 0.01
0803041	0.39 ± 0.01	1.27 ± 0.02	0.41 ± 0.01
1005121	0.84 ± 0.01	1.29 ± 0.02	0.49 ± 0.01
1007031	0.85 ± 0.01	1.03 ± 0.02	0.41 ± 0.01
0902051	0.75 ± 0.01	1.64 ± 0.02	0.63 ± 0.01
0806191	0.61 ± 0.01	1.08 ± 0.02	0.41 ± 0.01

3 讨论

本实验比较了甲醇、50%甲醇、95%乙醇、水、乙酸乙酯等溶剂提取效果,结果表明以甲醇提取总体效果最佳,且两次超声提取效率占提取3次的95%以上,故选择甲醇作为溶剂超声提取两次。

比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水等不同比例的流动相系统进行梯度洗脱,结果甲醇-0.1%磷酸进行梯度洗脱效果较好,各峰保留时间适中,且基线平稳;曾分别考察柱温(25,30,35,40℃)3种成分的色谱峰面积无区别,故选择柱温25℃

阿魏酸为《中国药典》2010年版当归和川芎含

量测定项下测定成分^[3-4],异秦皮啶是国家药品标准中五加生化胶囊含量测定项下检测成分^[1],绿原酸是刺五加的主要成分^[8],3种成分均具有较强的生理活性。本研究对三种成分进行同时含量测定,方法简单、准确、重现性好,可以更加全面地评价五加生化胶囊的质量,为提高其质量标准提供依据和参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 国家药品标准-新药转正标准. 第33册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 33.
- [2] 罗珍琴,黄谷蓉. 妇科新药-五加生化胶囊[J]. 中内药学, 2007, 5(4): 379.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 28, 89.
- [4] 陈富超,李鹏,朱军,等. HPLC法测定五加生化胶囊中阿魏酸的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(6): 728.
- [5] 张燕,陈乃江. 用高效液相色谱法测定五加生化胶囊中阿魏酸的含量[J]. 中国保健, 2008, 16(13): 389.
- [6] 王欢,唐于平,郭建明. 当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 73.
- [7] 孙国祥,于秀明,毕开顺. 刺五加 HPLC 数字化指纹图谱研究[J]. 中成药, 2007, 29(9): 1249.
- [8] 孙卓然,刘圆,孟庆艳,等. RP-HPLC 测定四川产红毛五加药材茎皮及叶中不同采收期绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 15.

[责任编辑 蔡仲德]