

整体柱 HPLC 同时测定白葛胶囊中 4 种有效成分

王园姬, 周明瑶, 韩省力, 卢闻*
(西安交通大学医学院, 西安 710061)

[摘要] 目的: 建立一种同时快速测定白葛胶囊中葛根素、大豆苷元、欧前胡素及异欧前胡素含量的方法。方法: 采用 C_{18} 整体柱 (4.6 mm × 50 mm, 2 μ m), 甲醇 (A) - 0.1% 冰醋酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 进样体积 5 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果: 在建立的色谱条件下, 4 种有效成分可获得良好的分离, 且各自在一定的浓度范围内线性关系良好 ($r > 0.9995$), 方法回收率在 95% ~ 105%。结论: 所建立的方法简便、快速、可靠, 可用于白葛胶囊中多种成分的快速检测。

[关键词] 葛根素; 欧前胡素; 大豆苷元; 异欧前胡素; 整体柱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0082-04

Simultaneous Determination of Four Active Components in Baige Capsules by HPLC and Monolithic Column

WANG Yuan-ji, ZHOU Ming-yao, HAN Sheng-li, LU Wen*
(Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

[Abstract] **Objective:** a method of simultaneous and fast determination the contents of puerarin, daidzein, imperatorin and isoimperatorin in Baige capsules was established. **Method:** the monolithic C_{18} column was used to perform the separation, and the mobile phase was methanol (A) - 0.1% glacial acetic acid (B) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was at 254 nm and the injection volume was 5 μ L, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. **Result:** these four components could be well separated under the established chromatographic condition, the linear correlation of each component was fine in certain concentration ($r > 0.9995$), the recovery was between 95% - 105%. **Conclusion:** the established method was simple, rapid and reliable and could be successfully applied in the active component detection in Baige capsules.

[Key words] puerarin; daidzein; imperatorin; isoimperatorin; monolithic column

白葛胶囊是由白芷和葛根两味药材组成的现代中药复方制剂, 已获得临床批件 (批号 2005L02257), 功能主治为解郁化痰、祛风通络。经过文献调研, 发现测定葛根中葛根素及大豆苷元^[1]、白芷中欧前胡素及异欧前胡素^[2-3]的报道多

采用普通的 C_{18} 色谱柱, 未见采用整体柱同时测定这几种成分的报道。本文首次采用整体柱, 建立了同时测定白葛胶囊中 4 种有效成分的方法^[4], 为白葛胶囊中多种成分的测定提供了一种新的方法, 也为同时含有白芷和葛根两味药材的复方制剂, 如眼轻松颗粒、十神汤、通窍活血汤等的质量控制提供了参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-2010 型高效液相色谱仪 (日本岛津), SB-5200 型超声波清洗器 (宁波新芝生物科技股份有限公司), KDC-16H 型高速离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司), 优普超纯水机。

1.2 试药 葛根素、大豆苷元、欧前胡素、异欧前胡

[收稿日期] 20110930(013)

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项 (2010ZDKG-105)

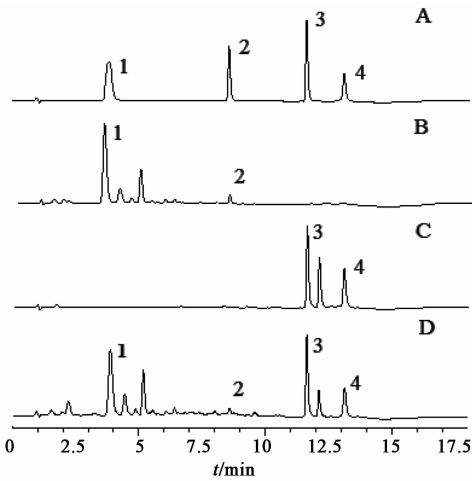
[第一作者] 王园姬, 在读博士研究生, 从事药物体内作用过程分析研究, Tel: 029-82657740, Fax: 029-82655451, E-mail: wangyuanji123@126.com

[通讯作者] * 卢闻, Tel: 029-82657740, E-mail: lvlu2004@mail.xjtu.edu.cn

素对照品均购自中国药品生物制品检定所(批号分别为 110752-200912, 1502-200101, 11826-200410, 110827-200407); 色谱甲醇(Honeywell Burdick & Jackson, USA); 水为自制超纯水, 其余试剂均为分析纯; 白葛胶囊为自制(批号 201009), 白芷和葛根为其发挥解郁化痰、祛风通络药理作用的药味, 其内在质量控制指标定为白葛胶囊中欧前胡素; 白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Beenth. et Hook 购自陕西省西安市子午路易圣堂药房, 葛根 *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi 购自陕西省西安市药材市场, 经西安交通大学医学院药学系牛晓峰副教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Chromolith C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 2 μm); 流动相甲醇(A)-0.1% 冰醋酸(B); 梯度洗脱条件(0 ~ 2 min, 20% A; 2 ~ 10 min, 20% ~ 65% A; 10 ~ 12 min, 65% A; 12 ~ 14 min, 65% ~ 20% A); 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样体积 5 μL, 对照品及样品色谱图见图 1。在此色谱条件下, 葛根素的保留时间约为 3.8 min, 大豆苷元的保留时间约为 8.5 min, 欧前胡素的保留时间约为 11.5 min, 异欧前胡素的保留时间约为 13.0 min。



A. 混合对照品; B. 葛根药材提取液;

C. 白芷药材提取液; D. 白葛胶囊供试品溶液;

1. 葛根素; 2. 大豆苷元; 3. 欧前胡素; 4. 异欧前胡素

图 1 对照品及白葛胶囊样品色谱图

2.2 对照品溶液的制备 称取欧前胡素对照品、异欧前胡素对照品、葛根素对照品及大豆苷元对照品适量, 精密称定, 甲醇溶解、定容, 得到系列浓度的对照品储备液。

2.3 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适

量, 制得 4 种成分系列浓度的混合对照品溶液(葛根素质量浓度分别为 2.16, 4.32, 10.8, 21.6, 43.2, 86.4 mg·L⁻¹; 大豆苷元质量浓度分别为 0.026, 0.052, 0.13, 0.26, 0.52, 1.04 mg·L⁻¹; 欧前胡素质量浓度分别为 1.22, 2.44, 6.1, 12.2, 24.4, 48.8 mg·L⁻¹; 异欧前胡素质量浓度分别为 0.62, 1.24, 3.1, 6.2, 12.4, 24.8 mg·L⁻¹)。

按 2.1 项下的色谱条件进样测定峰面积。以峰面积 Y 积分值为纵坐标, 各成分浓度 X (mg·L⁻¹) 为横坐标, 绘制标准曲线。得到葛根素的回归方程为 $Y = 19\ 777X + 525.94$ ($r = 0.999\ 9$); 大豆苷元的回归方程为 $Y = 51\ 265X + 206.48$ ($r = 0.999\ 9$); 欧前胡素的回归方程为 $Y = 27\ 387X + 4\ 928.6$ ($r = 0.999\ 9$); 异欧前胡素的回归方程为 $Y = 22\ 231X + 8\ 397.1$ ($r = 0.999\ 7$)。表明葛根素在 2.16 ~ 86.4 mg·L⁻¹、大豆苷元在 0.026 0 ~ 0.520 mg·L⁻¹、欧前胡素在 1.22 ~ 48.8 mg·L⁻¹、异欧前胡素在 0.620 ~ 24.8 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液(葛根素 21.6 mg·L⁻¹、大豆苷元 0.13 mg·L⁻¹、欧前胡素 12.2 mg·L⁻¹、异欧前胡素 6.2 mg·L⁻¹), 按 2.1 项下的色谱条件重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算得葛根素峰面积的 RSD 0.38%、大豆苷元峰面积的 RSD 0.30%、欧前胡素峰面积的 RSD 0.79%、异欧前胡素峰面积的 RSD 1.6%。表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一对照品溶液, 分别在 0, 0.5, 1, 3, 20, 30 h 时, 按 2.1 项下的色谱条件进样, 测定峰面积, 计算得葛根素峰面积的 RSD 0.90%、大豆苷元峰面积的 RSD 1.0%、欧前胡素峰面积的 RSD 1.2%、异欧前胡素峰面积的 RSD 2.4%, 表明各对照品溶液在 30 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取白葛胶囊内容物适量, 研匀, 称取 6 份, 每份约 0.1 g, 分别精密称定。制备供试品溶液, 过滤, 取续滤液, 进样测定峰面积, 计算得葛根素峰面积的 RSD 1.7%、大豆苷元峰面积的 RSD 1.2%、欧前胡素峰面积的 RSD 1.1%、异欧前胡素峰面积的 RSD 1.1%, 表明供试品溶液的制备方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 称取已知含量的白葛胶囊内容物粉末 9 份, 每份各约 0.05 g, 分别精密称定, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。得葛根素的平均加样回收率为 97.3%, 大豆苷元的平均加样回收率为 95.1%, 欧前胡素的平均加样回收率为 98.5%, 异欧前胡素的平均加样回收率

为 96.7%。

2.8 样品的含量测定

2.8.1 白葛胶囊供试品溶液的制备 取白葛胶囊 10 粒,倾出内容物,研匀。称取粉末约 0.1 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇 45 mL,超声提取 10 min,提取 1 次,取出,放冷,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.8.2 白芷药材供试品溶液的制备 参照《中国药典》2010 年版白芷项下含量测定方法,称取白芷粉末约 0.4 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇 45 mL,超声处理 1 h,取出,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.8.3 白芷提取物供试品溶液制备 取白芷提取物适量,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇 8 mL,超声使其

完全溶解,取出,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.8.4 葛根药材供试品溶液的制备 参照《中国药典》2010 年版葛根项下含量测定方法,取葛根粉末约 0.1 g,精密称定,置于锥形瓶中,精密加入 30% 乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用 30% 乙醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.8.5 葛根提取物供试品溶液的制备 取葛根提取物粉末 24 mg,置于 50 mL 量瓶中。加 50% 甲醇 40 mL,超声使其完全溶解取出,放冷,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.8.6 含量测定 取制备的各供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件进样测定。结果见表 1。

表 1 白葛胶囊中 4 种成分含量测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

mg·g⁻¹

样品名称	葛根素	大豆苷元	欧前胡素	异欧前胡素
白葛胶囊	11.9 ± 0.21	0.159 ± 0.001 9	6.00 ± 0.067	3.08 ± 0.037
白芷药材	-	-	0.887 ± 0.12	0.616 ± 0.056
白芷提取物	-	-	125 ± 25	75.6 ± 9.3
葛根药材	35.6 ± 4.6	0.430 ± 0.011	-	-
葛根提取物	217 ± 43	5.08 ± 1.2	-	-

注:“-”表示该项测定中不含此成分。

3 讨论

本文测得白芷中欧前胡素的平均质量分数为 0.886 9 mg·g⁻¹,即 0.088 69%,符合《中国药典》关于白芷中欧前胡素不得少于 0.080% 的规定;测得葛根中葛根素的平均质量分数为 35.59 mg·g⁻¹,即 3.559%,符合《中国药典》中关于葛根中葛根素不得少于 2.4% 的规定。

葛根素及大豆苷元极性较大^[1],而欧前胡素及异欧前胡素极性较小^[2-3],要同时测定 4 种成分难度较大。本文采用整体柱,用甲醇-0.1% 冰醋酸作为流动相进行梯度洗脱,能在较短的时间内完成对白葛胶囊中 4 种成分的分​​离分析,大大的提高了分析的效率。

目前对胶囊剂供试品溶液的制备,大多采用超声提取的方法^[5-6]。超声提取效率高,能够在较短的时间内,较为完全的将胶囊内容物中的待测成分提取出来,并且能够避免加热回流提取操作时间较长、热不稳定成分易分解破坏的缺点^[7-9]。白葛胶囊中的化学成分众多,经过简单的甲醇超声提取之后,直接进液相测定,干扰较多,色谱分离效果不理想,故本文对提取方法进行全面的考察,分别比较了

当提取溶剂为 30% ,50% ,70% ,100% 甲醇时,超声提取和回流提取时,白葛胶囊中葛根素、大豆苷元、欧前胡素及异欧前胡素的含量。试验结果表明,当提取溶剂为 50% 的甲醇、超声提取 10 min 时,对白葛胶囊中 4 种成分的提取较为完全。

[参考文献]

[1] Bebrevska L, Theunis M, Vlietinck A, et al. Optimization and validation of an HPLC-Method for quality control of *Pueraria lobata* root[J]. Natural Product Communications, 2008, 3(12): 2021.

[2] Chen Y, Jin Y C, Chen Y F, et al. A novel HPLC method to analyze imperatorin and isoimperatorin of *Angelica dahurica* oils obtained by supercritical fluid Extraction [J]. J Liquid chromatography and related technologies, 2009, 32(16): 2384.

[3] Kang J, Zhou L, Sun J H, et al. Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furocoumarins in the roots of *Angelica dahurica* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique[J]. J Pharm Bio Analysis, 2008, 47(4-5): 778.

不同煎煮方法对六味地黄汤浸出物及主成分含量的影响

谭家华, 罗君*, 贺祝英, 张建玲, 于佳
(贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 考察煎药机煎法对中药复方汤剂总浸出物及有效成分的影响, 为科学评价煎药机煎药和中药饮片“后下”提供依据。方法: 以经典方“六味地黄汤”为代表方, 以汤剂浸出物和汤剂中丹皮酚的含量为指标, 评价汤剂质量。结果: 丹皮酚在煎药机煎液中的含量为 $0.0187 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著高于传统煎液, 而总浸出物则相反。结论: 传统煎法与煎药机煎法煎煮的六味地黄汤剂在质量上存在较大差异。

[关键词] 煎煮方法; 六味地黄汤; 总浸出物; 丹皮酚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0085-03

The Impact of Different Decocting Methods for Liuwei Dihuang Decoction's Extract and Active Ingredients

TAN Jia-hua, LUO Jun*, HE Zhu-ying, ZHANG Jian-lin, YU Jia

(The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the impact of machine-boiling decoction on TCM prescription's total extracts and active ingredients, to provide a basis for the scientific evaluation of the extracting machine and the theory of Chinese Herbal medicine or 'decocted later' to provide a basis. **Method:** The classic prescription 'Liuwei Dihuang decoction' was used as the representative, and the content of the two decoctions was analyzed with RP-HPLC using paeonol as indicator was analyzed. This result was used to evaluate the quality of decoctions. **Result:** Paeonol in the decoctions of the machine-boiling was significantly higher than that of the traditional one.

[收稿日期] 20111031(006)

[基金项目] 贵阳中医学院基金项目([2010]30号)

[第一作者] 谭家华, 学士, 副主任药师, 从事中药质量控制与新药研究, Tel:0851-8612596, E-mail:53011402@qq.com

[通讯作者] *罗君, 硕士, 药师, 从事中药质量控制与新药研究, Tel:0851-8612596, E-mail:luojun031009@163.com

- [4] Feng C, Ruan J L, Cai Y L. Simultaneous Determination of 10 active components in traditional Chinese medicine "YIGONG" Capsule by RP-HPLC-DAD [J]. J Pharm Bio Anal, 2008, 47(2): 442.
- [5] Guan X Y, Li H F, Yang W Z, et al. HPLC-DAD-MS (n) analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in Xian-ling-gu-bao capsules [J]. J Pharm Bio Anal, 2011, 55(5): 923.
- [6] 卢闻, 贺浪冲, 杨广德, 等. 白川降压胶囊 HPLC 指纹图谱定性定量分析方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1999.
- [7] Gao Y, Gao W Y, Guo P, et al. Simultaneous determination of nine active components in Traditional Chinese Medicine 'Xue-Fu-Zhu-Yu' capsule by HPLC-ELSD [J]. Latin American J of pharmacy, 2011, 30(2): 281.
- [8] Kasawar G B, Farooqui M N. Development and validation of HPLC method for the determination of pregabalin in capsules [J]. Indian J pharm sciences, 2010, 72(4): 517.
- [9] Batista AND, Colombo R, de Pascoli IC, et al. Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of Myrcia uniflora [J]. Revista brasileira de farmacognosia-brazilian J of pharmacognosy, 2011, 21(3): 402.

[责任编辑 蔡仲德]