

[质 量]

HPLC 法同时测定化瘀祛斑胶囊中 4 种成分

董虹玲, 李钦青*, 柴金苗, 贺文彬, 李秀英
(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定化瘀祛斑胶囊(柴胡、薄荷、黄芩等)中 4 种成分的含有量。**方法** 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Waters C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 检测波长 232 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。**结果** 羟基红花黄色素 A、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷分别在 0.760 8~8.368 8、6.16~67.76、32.136~353.496、1.454 4~15.998 4 μg/mL 范围内呈良好的线性关系($r\geq 0.999\ 5$), 平均加样回收率分别为 100.1%、99.52%、99.93%、100.25%, RSD 分别为 1.40%、1.14%、1.70%、2.63%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于化瘀祛斑胶囊的质量控制。

关键词: 化瘀祛斑胶囊; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 黄芩苷; 蒙花苷; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)07-1519-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.015

Simultaneous determination of four constituents in Huayu Quban Capsules by HPLC

DONG Hong-ling, LI Qin-qing*, CHAI Jin-miao, HE Wen-bin, LI Xiu-ying
(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Huayu Quban Capsules (*Bupleuri Radix*, *Menthae haplocalycis Herba*, *Scutellariae Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Waters C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 232 nm. **RESULTS** Hydroxy safflower yellow A, paeoniflorin, baicalin, linarin showed good linear relationships within the ranges of 0.760 8–8.368 8, 6.16–67.76, 32.136–353.496, 1.454 4–15.998 4 μg/mL ($r\geq 0.999\ 5$), whose average recoveries were 100.1%, 99.52%, 99.93%, 100.25% with the RSDs of 1.40%, 1.14%, 1.70%, 2.63%, respectively. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for quality control of Huayu Quban Capsules.

KEY WORDS: Huayu Quban Capsules; hydroxy safflower yellow A; paeoniflorin; baicalin; linarin; HPLC

化瘀祛斑胶囊被 2015 版《中国药典》^[1] 收载, 是由柴胡、薄荷、黄芩、当归、红花、赤芍组成的中药复方制剂, 具有疏风清热、活血化瘀的功效, 用于治疗黄褐斑、酒渣、粉刺。目前, 关于黄芩苷、芍药苷含有量测定的文献较多^[2-4], 但尚无同时测定羟基红花黄色素 A、芍药苷、黄芩苷、蒙花

苷含有量的报道, 故本实验采用 HPLC 法同时测定化瘀祛斑胶囊中这 4 种成分的含有量, 为该制剂质量控制方法的建立提供科学依据。

1 材料

化瘀祛斑胶囊(批号 20151001、20150801、20150602, 山西仁源堂药业有限公司)。羟基红花

收稿日期: 2017-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81681260247); 山西省科技创新团队建设计划项目(2013131022)

作者简介: 董虹玲(1987—), 女, 硕士, 从事中药物质基础研究。Tel: (0351) 3179903, E-mail: 57198450@163.com

* 通信作者: 李钦青(1978—), 男, 硕士, 从事中药物质及新药开发研究。E-mail: lqq126@126.com

黄色素 A（批号 20160928）、黄芩苷（批号 110715-201318）、蒙花苷（批号 111528-201509）、芍药苷（批号 110936-201640）对照品购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为纯化水。

Waters 2695 高效液相色谱仪，配置 2998 PDA 检测器（美国 Waters 公司）；FB224 电子天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；AUW120D 电子天平（日本岛津公司）；KQ-500E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；GZX-9146MBE 电热鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）。

2 方法与结果

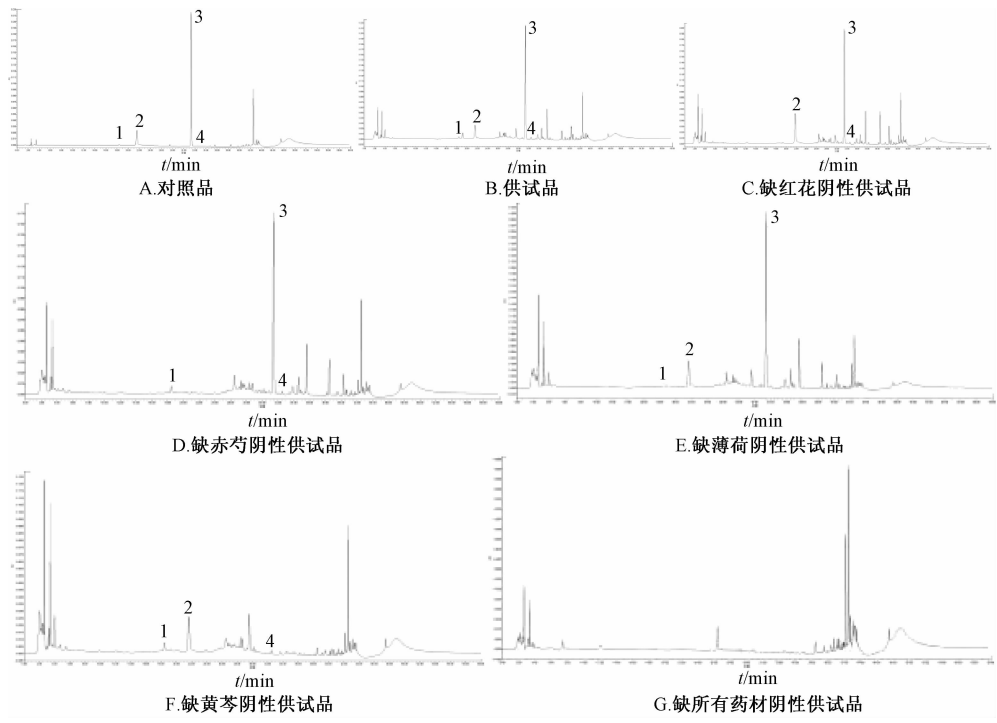
2.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；以乙腈（A）-0.2% 磷酸（B）为流动相，梯度洗脱（0 ~ 10 min，10% A；10 ~ 15 min，10% → 15% A；15 ~ 20 min，15% A；20 ~ 25 min，15% → 28% A；25 ~ 30 min，28% → 30% A；30 ~ 35 min，30% → 45% A；35 ~ 38 min，45% ~ 80% A；38 ~ 40 min，80% → 100% A；40 ~

45 min，100% → 10% A；45 ~ 60 min，10% A）；检测波长 232 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷、芍药苷、蒙花苷、羟基红花黄色素 A 对照品适量，加甲醇制成贮备液（质量浓度分别为 1 606.8、308、72.72、38.04 μg/mL），各精密量取 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，即得（质量浓度分别为 160.68、30.8、7.272、3.804 μg/mL）。色谱图见图 1A。

2.3 供试品溶液制备 取胶囊（批号 20151001）10 粒，去除外壳研细，精密称取约 1 g，置于 100 mL 量瓶中，50% 甲醇定容至刻度，超声（250 W、40 kHz）30 min，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。色谱图见图 1B。

2.4 阴性供试品溶液制备 按胶囊生产工艺分别制备缺红花、赤芍、薄荷、黄芩、所有药材的阴性供试品，按“2.3”项下方法制备相应溶液，即得。色谱图见图 1C ~ 1G。



1. 羟基红花黄色素 A 2. 芍药苷 3. 黄芩苷 4. 蒙花苷
1. hydroxysafflor yellow A 2. paeoniflorin 3. baicalin 4. linarin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5 线性关系考察 精密量取“2.2”项下贮备液 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 mL，置于 50 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，在“2.1”

项色谱条件下进样 10 μL 测定，以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归。结果，羟基红花黄色素 A、芍药苷、黄芩苷、蒙花

苷分别在 0.760 8 ~ 8.368 8、6.16 ~ 67.76、32.136 ~ 353.496、1.454 4 ~ 15.998 4 μg/mL 范围内呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y = 7\,300.2X - 2\,150.9$ ($r = 0.999\,5$)、 $Y = 13\,656X - 26\,233$ ($r = 0.999\,5$)、 $Y = 12\,268X - 11\,417$ ($r = 0.999\,9$)、 $Y = 3\,635.4X - 1\,053.7$ ($r = 0.999\,7$)。

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 10 μL,在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次,测得羟基红花黄色素 A、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷峰面积 RSD 分别为 0.66%、0.51%、0.32%、0.69%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取“2.3”项下供试品溶液,于 0、2、4、8、12、16 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次,测得羟基红花黄色素 A、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷峰面积 RSD 分别 0.65%、0.20%、

0.25%、0.54%,表明溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取同一批样品(批号 20151001),按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次,测得羟基红花黄色素 A、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷含量 RSD 分别 1.53%、0.36%、0.92%、1.09%,表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取含有量已知的同一批胶囊 50 粒(批号 20151001),去壳研细,精密称取 6 份,每份 0.5 g,置于 50 mL 量瓶中,每份加入对照品溶液(含 38.3 μg/mL 羟基红花黄色素 A、210.2 μg/mL 芍药苷、1 056.9 μg/mL 黄芩苷、71.3 μg/mL 蒙花苷)各 5 mL,按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 各成分加样回收率试验结果 (n = 6)

Tab. 1 Results of recovery tests for various constituents (n = 6)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/% (RSD/%)
羟基红花黄色素 A	0.500 7	0.380 5	0.383 0	0.764 3	100.21	100.1
	0.500 3	0.380 2	0.383 0	0.758 4	98.74	(1.40)
	0.501 2	0.380 9	0.383 0	0.771 9	102.11	
	0.500 6	0.380 5	0.383 0	0.759 6	98.97	
	0.502 5	0.381 9	0.383 0	0.762 3	99.31	
	0.501 3	0.381 0	0.383 0	0.769 8	101.52	
芍药苷	0.500 7	2.102 9	2.102 0	4.168 9	98.29	99.52
	0.500 3	2.101 2	2.102 0	4.228 8	101.22	(1.14)
	0.501 2	2.105 0	2.102 0	4.215 2	100.39	
	0.500 6	2.102 5	2.102 0	4.187 9	99.21	
	0.502 5	2.110 5	2.102 0	4.204 7	99.63	
	0.501 3	2.105 4	2.102 0	4.174 1	98.42	
黄芩苷	0.500 7	10.579 8	10.569 0	21.074 7	99.29	99.93
	0.500 3	10.571 3	10.569 0	21.362 3	102.10	(1.70)
	0.501 2	10.590 4	10.569 0	21.310 5	101.43	
	0.500 6	10.577 7	10.569 0	20.882 3	97.52	
	0.502 5	10.617 8	10.569 0	21.070 3	98.91	
	0.501 3	10.592 5	10.569 0	21.195 3	100.32	
蒙花苷	0.500 7	0.711 0	0.713 0	1.416 3	98.92	100.25
	0.500 3	0.710 4	0.713 0	1.447 7	103.41	(2.63)
	0.501 2	0.711 7	0.713 0	1.439 8	102.13	
	0.500 6	0.710 9	0.713 0	1.433 5	101.35	
	0.502 5	0.713 5	0.713 0	1.424 2	99.68	
	0.501 3	0.711 8	0.713 0	1.396 4	96.01	

2.10 样品含有量测定 取 3 批胶囊,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,平行 3 次,计算含有量,结果见

表 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法筛选 本实验考察了甲

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

批号	羟基红花黄色素 A	芍药苷	黄芩苷	蒙花苷
20151001	0.76	4.20	21.13	1.42
20150801	0.51	3.98	19.93	0.93
20150602	0.59	4.70	19.08	0.61

醇、50% 甲醇、20% 甲醇、5% 浓氨甲醇溶液 4 种提取溶剂，以及超声、加热回流 2 种提取方法，发现 50% 甲醇超声提取 30 min 时效率最高，而且操作更简便。

3.2 色谱柱筛选 本实验考察了不同色谱柱 (Waters C₁₈、Diamonsil C₁₈) 对 4 种成分的影响，发现 Waters C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离效果较好。

3.3 流动相筛选^[5-9] 本实验分别以甲醇-水、乙腈-水为流动相进行梯度洗脱，并加入磷酸作为改性剂。结果表明，以乙腈-磷酸为流动相时分离效果较好。然后，比较了乙腈-0.2% 磷酸、乙腈-0.7% 磷酸的分离效果，发现前者能有效改善峰形。

3.4 检测波长筛选^[10] 对 4 种成分对照品溶液进行紫外扫描 (200 ~ 500 nm)，发现芍药苷、黄芩苷、蒙花苷、羟基红花黄色素 A 分别在 232、278、334、403 nm 波长处有较大吸收，其中在 232 nm 波长处四者均有较大吸收，而且响应高，杂质峰少，干扰小，故确定其作为检测波长。

3.5 指标成分选择 本实验前期考察了化瘀祛斑胶囊中各味药材的主要成分，如柴胡中的柴胡皂苷 A、D，当归中的阿魏酸等，但在含有量测定时均

未发现上述成分。由于《中国药典》中赤芍、黄芩、红花含有量测定的指标成分分别为芍药苷、黄芩苷、羟基红花黄色素 A，而且蒙花苷为薄荷中重要成分，活血化瘀作用较强，故选择四者作为指标成分。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：673

[2] 赵 赫，訾 慧. HPLC 法测定化瘀祛斑胶囊中黄芩苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报，2007，9(1)：146-147.

[3] 潘柔和，徐晓卫. RP-HPLC 法测定化瘀祛斑胶囊中黄芩苷的含量[J]. 海峡药学，2004，16(1)：45-47.

[4] 吴 健，马丽萍，王如伟，等. HPLC 法测定化瘀祛斑片芍药苷的含量[J]. 中国现代药物应用，2009，3(14)：27-28.

[5] 闫高颖，董娟妮，杨 洋，等. HPLC 法同时测定心脑血管胶囊中 6 种成分[J]. 中成药，2013，35(8)：1672-1675.

[6] 周 军，张 蕾，王 杰. HPLC-DAD 法测定脑血栓片中苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮ⅡA[J]. 现代药物与临床，2015，30(3)：262-266.

[7] 王亚洲. HPLC 法同时测定蝎龙酒中芍药苷、羟基红花黄色素 A 和阿魏酸[J]. 中成药，2012，34(10)：1925-1928.

[8] 康 建，阚全程，曾建伟，等. 高效液相色谱法测定薄荷中蒙花苷含量[J]. 医药论坛杂志，2007，28(20)：6-7，9.

[9] 宋永贵，苏 丹，耿璐璐，等. HPLC-DAD 同时测定通达颗粒中 4 种活性成分的含量[J]. 中成药，2010，32(7)：1137-1140.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：23-24.