

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.04.020

高效液相色谱法同时测定沈阳红药胶囊中4种有效成分含量

王 婧

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要:目的 建立同时测定沈阳红药胶囊中4种有效成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸(用三乙胺调 pH 至 3.0) - 乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 316 nm (0~18 min)、203 nm (18~22 min)、249 nm (22~90 min), 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。结果 阿魏酸、三七皂苷 R₁、欧前胡素、异欧前胡素进样量分别在 0.023 1~0.185 μg ($r=0.999\ 8$)、0.451~3.60 μg ($r=0.999\ 7$)、0.015 8~0.127 μg ($r=0.999\ 9$)、0.006 73~0.053 8 μg ($r=0.999\ 3$) 范围内与峰面积线性关系良好, 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$)。阿魏酸、欧前胡素、异欧前胡素定量限分别为 0.462 8, 0.660 2, 1.682 0 ng。平均加样回收率分别为 99.19%, 99.12%, 98.22%, 99.00%, RSD 分别为 0.95%, 1.08%, 1.27%, 1.08% ($n=6$)。结论 所建立的方法准确、专属性强, 可用于同时测定沈阳红药胶囊中4种有效成分的含量。

关键词: 沈阳红药胶囊; 高效液相色谱法; 含量测定; 阿魏酸

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)04-0083-04

Simultaneous Determination of Four Active Ingredients in Shenyanghongyao Capsules by HPLC

WANG Jing

(Lianyungang Center for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of four active ingredients in Shenyanghongyao Capsules. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid (adjust pH to 3.0 with triethylamine) - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 316 nm (0-18 min), 203 nm (18-22 min), 249 nm (22-90 min), the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The injection volume of ferulic acid, notoginsenoside R₁, imperatorin and isoimperatorin showed a good linear relationship with the peak area in the ranges of 0.023 1 - 0.185 μg ($r=0.999\ 8$), 0.451 - 3.60 μg ($r=0.999\ 7$), 0.015 8 - 0.127 μg ($r=0.999\ 9$) and 0.006 73 - 0.053 8 μg ($r=0.999\ 3$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$). The limits of quantitation (LOQ) of ferulic acid, imperatorin and isoimperatorin were 0.462 8, 0.660 2 and 1.682 0 ng, respectively. The average recoveries of ferulic acid, notoginsenoside R₁, imperatorin and isoimperatorin were 99.19%, 99.12%, 98.22% and 99.00% with RSDs of 0.95%, 1.08%, 1.27% and 1.08% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is accurate and specific, which can be used for the simultaneous determination of four active ingredients in Shenyanghongyao Capsules.

Key words: Shenyanghongyao Capsules; HPLC; content determination; ferulic acid

沈阳红药胶囊由三七、川芎、白芷、当归、土鳖虫、红花、延胡索7味中药组方, 具有活血止痛、祛瘀生新功效, 可治跌打损伤、筋骨肿痛等症。三七为方中君药, 广泛应用于治疗跌打损伤、瘀滞肿痛等症^[1]。三七皂苷 R₁ 为其主要有效成分, 能止血止痛、滋补、抗疲劳、增强免疫力^[2]。川芎具有活血行气、祛风止痛功效^[3], 主要含阿魏酸、川芎嗪、苯酚类化合物等酚酸、有机酸、生物碱等成分^[4-5]。川芎除有行气活血功效外, 还对中枢神经系统有一定镇静作用^[6], 并能抑制大肠杆菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌等菌种的活性, 具有明显的抗菌效力^[7-9]。当归主要含有挥发油、有机酸、黄酮类等化学成分^[10], 所含阿魏酸可抑制血小板聚集和血栓形成^[11-12]。白芷所含以欧前胡素和异欧前胡素为代表的香豆素类化合物是

其镇痛的主要成分^[3,13]。沈阳红药胶囊现行质量标准收载于2020年版《中国药典(一部)》^[3], 仅采用高效液相色谱(HPLC)法测定了人参皂苷 R_{g1} 含量。三七皂苷 R₁、阿魏酸、欧前胡素、异欧前胡素是该制剂中相应药材的主要有效成分, 本研究中采用波长切换-HPLC法同时测定沈阳红药胶囊中这些成分含量, 旨在为该制剂的质量评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100型高效液相色谱仪, 包括在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、G4212B二极管阵列检测器、Agilent Chemstation 色谱工作站[安捷伦科技(中国)有限公司]; BT125D型电子天平(精度为十万分

之一,赛多利斯科学仪器<北京>有限公司);SYWQ800型超声波清洗器(山东申仪电子科技有限公司)。

1.2 试剂

沈阳红药胶囊(沈阳红药集团股份有限公司,批号分别为190102,190201,190502);阿魏酸对照品(批号为110773-201614,含量为99.0%),三七皂苷 R_1 对照品(批号为110745-201619,含量为95.0%),欧前胡素对照品(批号为110826-201616,含量为99.6%),异欧前胡素对照品(批号为110827-201611,含量为99.4%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,甲醇、磷酸、三乙胺均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.1%磷酸(A,用三乙胺调pH至3.0)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:316 nm(0~18 min)、203 nm(18~22 min)、249 nm(22~90 min);柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

表1 梯度洗脱程序

Tab.1 Program of gradient elution

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)	时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	80	20	65	50	50
13	80	20	90	50	50
45	72	28			

2.2 溶液制备

取阿魏酸、三七皂苷 R_1 、欧前胡素、异欧前胡素对照品各适量,精密称定,加甲醇制成含阿魏酸1.157 mg/mL、三七皂苷 R_1 2.253 mg/mL、欧前胡素0.792 2 mg/mL、异欧前胡素0.336 4 mg/mL的单一对照品贮备液。精

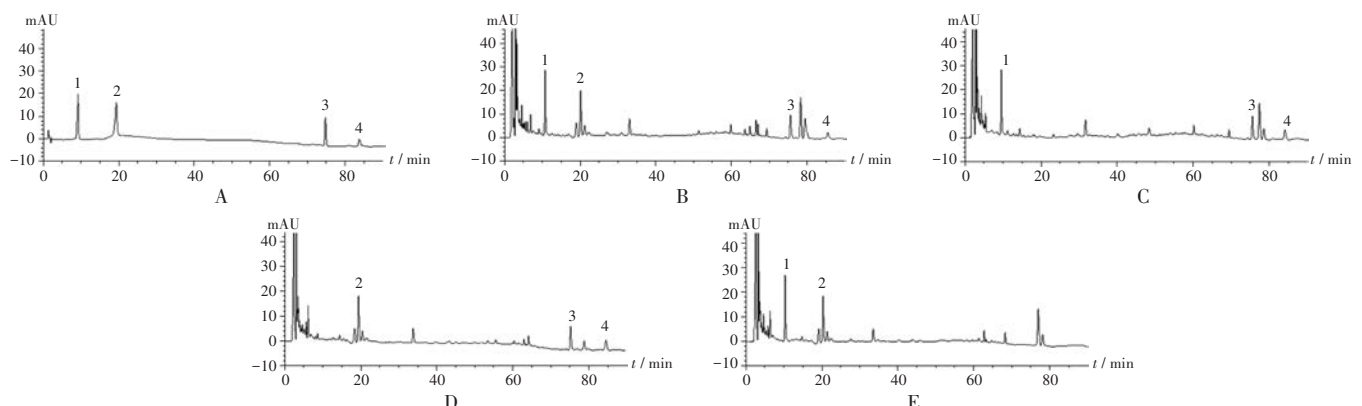
密度取阿魏酸、欧前胡素、异欧前胡素单一对照品贮备液各1 mL及三七皂苷 R_1 对照品贮备液10 mL,置同一100 mL容量瓶中,加甲醇定容,制成阿魏酸、三七皂苷 R_1 、欧前胡素、异欧前胡素质量浓度分别为11.57,225.3,7.922,3.364 μ g/mL的混合对照品溶液。取样品内容物,混匀,取约2.5 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,加70%甲醇适量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理45 min,放冷至室温,用70%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按沈阳红药胶囊处方和工艺分别制备缺三七、川芎、当归、白芷的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱峰。结果阿魏酸、三七皂苷 R_1 、欧前胡素、异欧前胡素峰均与其他成分峰达到基线分离,阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:分别精密量取混合对照品溶液2,4,8,10,12,16 μ L,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μ g)为横坐标进行线性回归。得回归方程,阿魏酸为 $Y_1 = 5.249 2X_1 - 4.889 1$ ($r_1 = 0.999 8$),三七皂苷 R_1 为 $Y_2 = 0.309 8X_2 - 6.054 7$ ($r_2 = 0.999 7$),欧前胡素为 $Y_3 = 4.761 3X_3 + 1.649 3$ ($r_3 = 0.999 9$),异欧前胡素为 $Y_4 = 3.907 1X_4 - 2.447 3$ ($r_4 = 0.999 3$)。结果表明,阿魏酸、三七皂苷 R_1 、欧前胡素、异欧前胡素进样量分别在0.023 1~0.185 μ g、0.451~3.60 μ g、0.015 8~0.127 μ g、0.006 73~0.053 8 μ g范围内与峰面积线性关系良好。

定量限考察:分别精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按2.1项下色谱条件进样测



1. 阿魏酸 2. 三七皂苷 R_1 3. 欧前胡素 4. 异欧前胡素

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺三七的阴性对照品溶液 D. 缺川芎、当归的阴性对照品溶液 E. 缺白芷的阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Ferulic acid 2. Notoginsenoside R_1 3. Imperatorin 4. Isoimperatorin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution lacking Notoginseng Radix et Rhizoma D. Negative reference solution lacking Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix E. Negative reference solution lacking Angelicae Dahuricae Radix

Fig.1 HPLC chromatograms

定,以信噪比10:1时的进样量作定量限。结果阿魏酸、欧前胡素、异欧前胡素定量限分别为0.462 8,0.660 2,1.682 0 ng。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果阿魏酸、三七皂苷R₁、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的RSD分别为0.69%,0.51%,0.79%,0.68%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液,分别于室温放置0,4,8,12,18,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果阿魏酸、三七皂苷R₁、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的RSD分别为1.21%,1.46%,1.12%,1.17%(n=6),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为190102)内容物适量,各6份,每份2.5 g,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果阿魏酸、三七皂苷R₁、欧前胡素、异欧前胡素的平均含量分别为0.228 4,3.456,0.131 6,0.061 17 mg/g, RSD分别为0.41%,0.50%,0.84%,0.80%(n=6),表明方法重复性较好。

加样回收试验:取样品(批号为190102)内容物6份,每份约1.25 g,精密称定,分别加入一定质量浓度的单一对照品贮备液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取3批样品内容物各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 测定波长选择

考察检测波长时,使用DAD检测器在200~400 nm范围内扫描光谱图,结果阿魏酸在316 nm波长处、三七皂苷R₁在203 nm波长处、欧前胡素和异欧前胡素在249 nm波长处有最大吸收,故选择上述波长作为4个有效成分的检测波长。

3.2 流动相考察

反相液相色谱体系中流动相通常为甲醇-水、乙腈-水体系,为了使待测组分得到较好的分离效果,预试验中考察了水-乙腈、0.1%磷酸(用三乙胺调pH至6.0或3.0)-乙腈3个流动相体系。前两者导致供试品所得图谱基线不平稳,色谱峰分离效果较差,或图谱基线平稳,色谱峰间分离度较好,但图谱中阿魏酸峰未显现。以后者为流动相时,图谱基线平稳,4种有效成分均

表2 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 2 Results of the recovery test (n=6)							
待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
阿魏酸	1.252 1	0.286 0	0.289 2	0.570 3	98.31	99.19	0.95
	1.249 6	0.285 4	0.289 2	0.575 1	100.17		
	1.251 5	0.285 8	0.289 2	0.571 8	98.89		
	1.251 1	0.285 8	0.289 2	0.576 2	100.41		
	1.248 2	0.285 1	0.289 2	0.572 1	99.24		
	1.251 4	0.285 8	0.289 2	0.569 6	98.13		
三七皂苷R ₁	1.252 1	4.327 3	4.280 7	8.572 1	99.16	99.12	1.08
	1.249 6	4.318 6	4.280 7	8.611 2	100.28		
	1.251 5	4.325 2	4.280 7	8.581 3	99.43		
	1.251 1	4.323 8	4.280 7	8.608 1	100.08		
	1.248 2	4.313 8	4.280 7	8.518 3	98.22		
	1.251 4	4.324 8	4.280 7	8.499 7	97.53		
欧前胡素	1.252 1	0.164 8	0.166 4	0.328 1	98.14	98.22	1.27
	1.249 6	0.164 4	0.166 4	0.327 8	98.20		
	1.251 5	0.164 7	0.166 4	0.326 2	97.06		
	1.251 1	0.164 6	0.166 4	0.330 9	99.94		
	1.248 2	0.164 3	0.166 4	0.329 5	99.28		
	1.251 4	0.164 7	0.166 4	0.325 6	96.70		
异欧前胡素	1.252 1	0.076 59	0.077 37	0.153 9	99.92	99.00	1.08
	1.249 6	0.076 44	0.077 37	0.151 9	97.53		
	1.251 5	0.076 55	0.077 37	0.153 3	99.20		
	1.251 1	0.076 53	0.077 37	0.154 2	100.39		
	1.248 2	0.076 35	0.077 37	0.152 8	98.81		
	1.251 4	0.076 55	0.077 37	0.152 5	98.16		

表3 样品含量测定结果(mg/g,n=3)

Tab. 3 Results of content determination of four active ingredients in the samples (mg/g,n=3)				
批号	阿魏酸	三七皂苷R ₁	欧前胡素	异欧前胡素
190102	0.229 0	3.448 1	0.131 0	0.059 88
190201	0.243 6	3.520 6	0.136 3	0.057 82
190502	0.210 5	3.920 6	0.150 2	0.060 83

显现,且与相邻色谱峰分离度较好,因此选择0.1%磷酸(用三乙胺调pH至3.0)-乙腈体系为流动相。

3.3 进样量考察

供试品溶液进样量会影响图谱中各成分色谱峰的紫外吸收效果及分离效能,当供试品溶液进样量为5 μL时,4种有效成分的色谱峰紫外吸收强度较弱,尤其对异欧前胡素峰影响最大;供试品溶液进样量为20 μL时,其色谱图中各成分紫外响应值较大,但部分组分色谱峰与相邻色谱峰不能完全分离,分离度小于1.5;当供试品溶液进样量为10 μL时,其色谱图中基线平稳、色谱峰紫外响应值较大,4种有效成分与相邻色