

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)20-0079-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.20.017



高效液相色谱法测定史国公药酒中羟基红花黄色素 A 含量

付卡利, 何娟娟, 陈 灿, 刘逆夫, 张 鹏[△]

(株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000)

摘要:目的 建立测定史国公药酒中羟基红花黄色素 A 含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(12:88, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 403 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。结果 羟基红花黄色素 A 质量浓度在 2.814~45.025 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9995, n=5$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 102.12%, RSD 为 2.44% ($n=6$)。结论 所建立的方法操作简便, 结果准确、稳定, 且简化了流动相组成及供试品溶液的制备方法, 可用于史国公药酒的质量控制。

关键词: 史国公药酒; 羟基红花黄色素 A; 高效液相色谱法; 含量测定

Determination of Hydroxysafflor Yellow A in Shiguogong Medicinal Liquor by HPLC

FU Kali, HE Juanjuan, CHEN Can, LIU Nifu, ZHANG Peng

(Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan, China 412000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of hydroxysafflor yellow A in Shiguogong Medicinal Liquor. **Methods** The chromatographic column was the Kromasil 100-5-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (12:88, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 403 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of hydroxysafflor yellow A was 2.814-45.025 μg/mL ($r=0.9995, n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rate of hydroxysafflor yellow A was 102.12% with an RSD of 2.44% ($n=6$). **Conclusion** The established method is easy, accurate and stable, which simplifies the composition of mobile phase and the preparation of test solution, and it can be used for the quality control of Shiguogong Medicinal Liquor.

Key words: Shiguogong Medicinal Liquor; hydroxysafflor yellow A; HPLC; content determination

史国公药酒是历史悠久的著名酒剂^[1], 目前仍有多家企业生产, 其由玉竹、鳖甲、白术、牛膝、桑寄生、蚕沙、当归、红花等 17 味中药以白酒为溶剂经浸渍、渗漉制成, 有祛风除湿、活血通络功效, 主要用于治疗风寒湿痹、骨节疼痛、四肢麻木等证。其为《卫生部药品标准中药成方制剂(第四册)》收载品种^[2], 但尚未建立含量测定方法。红花中含有的羟基红花黄色素 A 有活血化瘀、抗肿瘤等作用^[3-12]。目前虽有史国公药酒中羟基红花黄色素 A 含量测定的报道^[13], 但测定过程繁杂, 供试品溶液的制备过程复杂, 供试品图谱中羟基红花黄色素 A 色谱峰前移。本研究中建立了测定史国公药酒中羟基红花黄色素 A 含量的高效液相色谱(HPLC)法, 旨在为该制剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1260 Infinity 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AB135-S 型电子天平、AB204-S 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度分别为 0.01 mg 和 0.1 mg)。

1.2 试药

史国公药酒(株洲千金药业股份有限公司, 批号分别为 20161102, 20161103, 20161104, 20161105, 20161106, 20170901); 羟基红花黄色素 A 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111637-201207, 含量 92.5%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil 100-5-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液(12:88, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 403 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液制备

取羟基红花黄色素 A 对照品 19.47 mg, 精密称定, 置 20 mL 容量瓶中, 加 25% 甲醇定容, 得质量浓度为 0.9005 mg/mL 的对照品贮备液; 加 25% 甲醇稀释, 得质量浓度为 22.513 μg/mL 的对照品溶液。取样品约 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

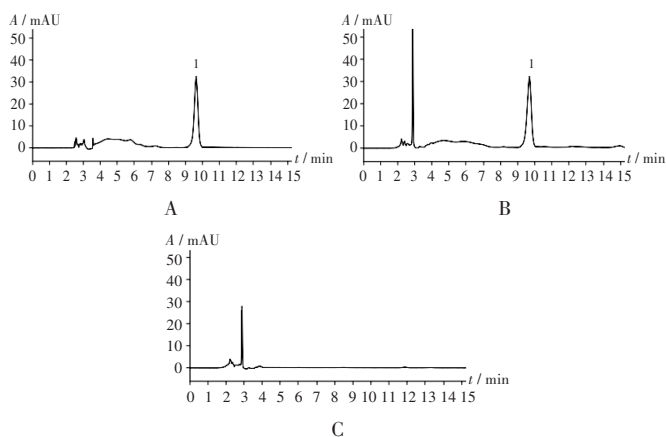
第一作者: 付卡利, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为药品研发及质量控制, (电子信箱)385833066@qq.com。

[△]通信作者: 张鹏, 男, 博士研究生, 高级工程师, 研究方向为药品研发及质量控制, (电子信箱)tiger910719@163.com。

按史国公药酒处方及工艺制备缺红花的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验与专属性试验:分别吸取2.2项下3种溶液,按2.1项下色谱条件测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,理论板数按羟基红花黄色素A峰计均大于6000,分离度均大于2.0,且阴性对照无干扰。详见图1。



1. 羟基红花黄色素A

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Hydroxysafflor yellow A

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察:取2.2项下对照品贮备液,加25%甲醇稀释,得质量浓度分别为2.814, 5.628, 11.256, 22.513, 45.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以待测成分的质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 26.7795X - 15.1770$ ($r = 0.9995, n = 5$)。结果表明,羟基红花黄色素A质量浓度在2.814~45.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取样品(批号为20161106)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.62% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品(批号为20161106)溶液适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,计算峰面积。结果的 RSD 为1.09% ($n = 6$),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20161106)6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果平均含量为19.753 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD 为0.45% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品(批号为

20161106)6份,各5 mL,分别置10 mL容量瓶中,精密加入质量浓度为108.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液1 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
98.765	108.06	209.97	102.91	102.12	2.44
98.765	108.06	210.89	103.76		
98.765	108.06	210.76	103.64		
98.765	108.06	211.11	103.97		
98.765	108.06	207.70	100.81		
98.765	108.06	204.26	97.63		

2.4 样品含量测定与限度拟订

分别取6批样品适量,各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算平均含量。结果6批样品含量分别为19.814, 22.119, 21.603, 20.260, 19.753, 16.988 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平均20.090 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n = 3$)。故暂订史国公药酒中含红花以羟基红花黄色素A计不得少于16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (约为均值的80%,本企业依据生产过程中的误差、设备等因素拟订)。

3 讨论

3.1 流动相选择

参考文献[13]与2020年版《中国药典(一部)》^[14],分别考察了乙腈-0.1%磷酸水溶液(12:88, V/V)和甲醇-乙腈-0.7%磷酸水溶液(26:2:27, $V/V/V$)^[13-14]作为流动相。结果前者为流动相时色谱峰分离度符合要求,峰形好,理论板数高,故选择。

3.2 检测波长选择

预试验中将对照品溶液注入高效液相色谱仪中,并在200~600 nm波长范围内扫描,结果羟基红花黄色素A在403 nm波长处有最大吸收,与2020年版《中国药典(一部)》中该成分的测定波长^[14]一致,故选择。

3.3 耐用性考察

考察不同柱温(25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$)、不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL/min)下本研究中检测条件的耐用性,结果羟基红花黄色素A含量的 RSD 分别为4.17% ($n = 3$)和0.97% ($n = 3$),表明柱温和温度的微小变化对测定结果影响不大。

3.4 方法评价

本研究所建方法操作简便,结果准确、稳定,且简化了流动相组成及供试品溶液的制备方法,供试品HPLC图谱中相应色谱峰对称性较好,可用于史国公药酒的质量控制。目前关于史国公药酒质量控制的研究