

RP-HPLC法同时测定十味活血丸中阿魏酸、橙皮苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量

邱颖¹, 董振敏², 门金玉¹, 马丽丽¹, 赵怀清^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016 2. 辽河油田卫生事业管理部, 盘锦 124010)

摘要 目的: 建立同时测定十味活血丸中阿魏酸、橙皮苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷 3 种活性成分含量的 RP-HPLC 法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以甲醇-0.05% 醋酸-四氢呋喃 (34:65:0.2) 为流动相; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 320 nm。结果: 阿魏酸、橙皮苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷浓度分别在 1.80~18.0、40.0~400.3、0.0~30.0 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r > 0.9995$, $n = 6$); 方法平均回收率 ($n = 9$) 分别为 101.6%, 99.9%, 98.0%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可为十味活血丸质量评价提供依据。

关键词: 十味活血丸; 阿魏酸; 橙皮苷; 5-O-甲基维斯阿米醇苷; RP-HPLC

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-1793(2009)08-1260-04

RP-HPLC simultaneous determination of ferulic acid, hesperidin and 5-O-methylvisamioside in Shiwei Huoxue pills

QIU Ying¹, DONG Zhen-min², MEN Jin-yu¹, MA Li-li¹, ZHAO Huai-qing^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China 2. Department of Health Care Management of Liaohe Oilfield Panjin 124010 China)

Abstract Objectives To develop an RP-HPLC method for simultaneous determination of ferulic acid, hesperidin and 5-O-methylvisamioside in Shiwei Huoxue pills. **Methods** The analysis was carried on a Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase methanol-water containing 0.05% acetic acid-tetrahydrofuran (34:65:0.2) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The UV detection wavelength was set at 320 nm and the column temperature was 35 °C. **Results** The linear ranges of ferulic acid, hesperidin and 5-O-methylvisamioside were 1.80~18.0, 40.0~400.3, 0.0~30.0 μg · mL⁻¹ ($r > 0.9995$, $n = 6$), respectively. The average recoveries ($n = 9$) of ferulic acid, hesperidin and 5-O-methylvisamioside were 101.6%, 99.9% and 98.0%, respectively. **Conclusions** This method is suitable to control the quality of Shiwei Huoxue pills, which provides the advantages of simplicity, accuracy and reproducibility.

Key words Shiwei Huoxue pills; ferulic acid; hesperidin; 5-O-methylvisamioside; RP-HPLC

十味活血丸收载于国家中成药标准汇编, 由桃仁、陈皮、红花、白芷、防风、木香、甘草、当归、香附和延胡索 10 味中药组成, 具有活血、止痛行气之功效, 用于跌打损伤、淤血肿痛等症的治疗。现行质量标准仅对防风等几味药材进行了薄层鉴别。研究表明, 当归中的阿魏酸具有明显的活血化淤作用^[1], 陈皮中的橙皮苷具有较强的抗炎杀菌作用^[2], 防风中的 5-O-甲基维斯阿米醇苷具有镇痛、抗炎、抗菌作用^[3]。已有文献报道^[4~6]用 HPLC 法分别测定阿魏酸、橙皮苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含

量, 但同时测定这 3 种组分含量的方法尚未见报道, 本实验对色谱条件作了优化选择, 建立了同时测定十味活血丸中阿魏酸、橙皮苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷 3 种活性成分含量的 RP-HPLC 法, 为全面的控制十味活血丸的质量提供依据。

1 仪器与试剂

LC-10AT 型高效液相输液泵 (日本 Shimadzu 公司), SPD-10A 型紫外检测器 (日本 Shimadzu 公司), 2010 色谱工作站 (浙江大学), BS-124S 电子分析天平 (北京 Sartorius 仪器系统有限公司), KQ-

* 通讯作者 Tel: 13066787576 E-mail: zhaohq1955@126.com

50B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110721-200512 和 111523-200405),阿魏酸对照品(Sigma A Hrich 试剂公司,批号为 357835/1,纯度 99.0%),甲醇(色谱醇,天津市康科德科技有限公司),四氢呋喃(色谱醇,天津市康科德科技有限公司),冰醋酸(分析醇,天津市大茂化学试剂厂),水(二次重蒸水,自制),十味活血丸(某药厂,批号分别为 070801, 070825, 070912)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别称取对照品阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得浓度分别为 180, 111, 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液 I, II, III。分别精密量取上述对照品储备液 2.5, 9.0, 5.0 mL 置 25 mL 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(每 1 mL 含阿魏酸 18.0 μg , 橙皮苷 40.0 μg , 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 30.0 μg)。

2.1.2 供试品溶液 取十味活血丸,研细,取细粉约 0.5 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇 30 mL,超声处理(功率 90 W, 频率 59 kHz) 30 min 过滤,残渣用适量的甲醇洗涤,合并滤液与洗液,旋转蒸干,残渣用甲醇溶解并稀释至 10 mL,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.3 阴性对照溶液 按处方比例分别称取除当归、陈皮和防风以外的其余药味,按制备工艺制成相应的阴性样品,按“2.1.2”项下操作,分别制成缺当归、陈皮和防风阴性对照溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.05% 醋酸-四氢呋喃 (34: 65: 0.2); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 320 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.3 系统适用性 在上述色谱条件下,阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷色谱峰与相邻峰的分度均大于 1.5,理论塔板数按阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰计算分别不低于 4000, 3000, 5000, 3 个组分色谱峰对称因子均在 0.95~1.05 之间,阴性对照对样品测定无干扰。结果见图 1。

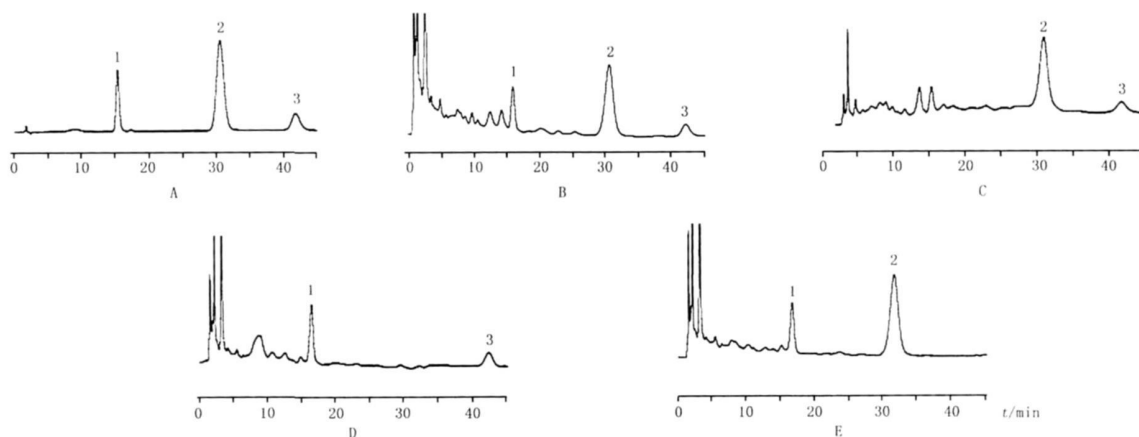


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 对照品 (reference substances) B. 样品 (sample) C. 缺当归样品 (negative sample without Radix Angelicae Sinensis) D. 缺陈皮样品 (negative sample without Pericarpium Citri Reticulatae) E. 缺防风样品 (negative sample without Radix Saposhnikovia)

1. 阿魏酸 (ferulic acid) 2. 橙皮苷 (hesperidin) 3. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 (5-*O*-methylvisamioside)

2.4 线性关系 精密量取阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的混合溶液 1, 2, 4, 6, 8 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取上述混合对照品溶液各 20 μL ,按上述色谱条件进样分析,记录色谱峰面积。以对照品浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

为横坐标,色谱峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归计算。求得阿魏酸、橙皮苷及 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷回归方程 ($n=6$) 分别为:

$$Y = 3.658 \times 10^4 X + 0.8515 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 5.535 \times 10^3 X + 0.1252 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 6.693 \times 10^3 X + 0.1036 \quad r = 0.9999$$

结果表明阿魏酸浓度在 1.80~18.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 橙

皮苷浓度在 40.0~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷浓度在 3.00~30.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一对照品溶液(阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的浓度分别为 10.8, 240, 18.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 计算阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.24%, 1.2%。

2.6 重复性试验 取批号 070801 的样品, 按“2.1.2”项下方法操作, 平行制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下进行分析, 阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量平均值分别为 0.022, 0.496, 0.034 $\text{mg}\cdot\text{丸}^{-1}$; RSD 分别为 0.80%, 1.6%, 1.4%。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 室温静

置, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 0.90%, 0.70%, 1.3%。结果表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验 分别精密称取已知含量的样品(批号 070801) 9 份, 每份 0.25 g 分为 3 组, 每组 3 份, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿魏酸对照品溶液 0.06, 0.12, 0.18 mL; 1637 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 橙皮苷对照品溶液 0.38, 0.76, 1.14 mL 和 870 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液 0.05, 0.1, 0.15 mL。每一浓度 3 份, 照“2.1.2”项下方法操作, 在上述色谱条件下进样分析。阿魏酸、橙皮苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷平均回收率($n=9$)分别为 101.6%, 99.9%, 98.0%。结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果 ($n=9$)
Tab 1 Results of the recoveries

化合物 (component)	样品量 (original) / μg	加入量 (add) / μg	得到量 (found) / μg	回收率 (average recovery) / %	平均值 (average) / %	RSD (%)
阿魏酸 (ferulic acid)	55.70	27.00	82.98	101.0	101.6	1.8
	55.90	27.00	83.28	101.4		
	55.64	27.00	82.87	100.9		
	55.53	54.00	110.30	101.4		
	56.06	54.00	109.92	99.8		
	56.19	54.00	109.52	98.8		
	56.01	81.00	140.28	104.0		
	56.25	81.00	140.52	104.0		
	55.99	81.00	139.93	103.6		
橙皮苷 (hesperidin)	1256	622.1	1889	101.7	99.9	1.4
	1260	622.1	1897	102.3		
	1254	622.1	1873	99.4		
	1252	1244	2471	98.0		
	1264	1244	2506	99.8		
	1267	1244	2522	100.9		
	1263	1866	3103	98.6		
	1268	1866	3107	98.5		
	1262	1866	3129	100.0		
5- <i>O</i> -甲基维斯 阿米醇苷 (5- <i>O</i> - methylvisammirole)	86.34	43.50	129.3	98.7	98.0	1.6
	86.65	43.50	129.4	98.3		
	86.24	43.50	128.3	96.7		
	86.07	87.00	169.3	95.6		
	86.89	87.00	172.4	98.3		
	87.09	87.00	171.5	97.0		
	86.82	130.5	214.3	97.7		
	87.19	130.5	219.2	101.1		
	86.78	130.5	216.0	99.0		

2.9 样品含量测定 取样品 3 批, 每批取 3 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 取 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 外标一点法计算含量。结果见表 2。

表 2 含量测定结果 ($n=3$)

Tab 2 Determination results

批号 (Lot No.)	阿魏酸 (fennic acid) / mg per pill	RSD %	橙皮苷 (hesperidin) /mg per pill	RSD %	5-O-甲基维斯 阿米醇苷 (5-O- methylephedrine) /mg per pill	RSD %
070801	0.021	0.68	0.495	1.8	0.033	1.7
070825	0.021	1.1	0.494	1.6	0.033	1.8
070912	0.021	0.9	0.488	0.6	0.032	0.42

3 讨论

以甲醇配制一定浓度的橙皮苷、阿魏酸和 5-O-甲基维斯阿米醇苷溶液, 在 190~400 nm 进行紫外扫描, 橙皮苷在 280 nm 处有较大的吸收, 而阿魏酸在 320 nm 处有较大的吸收, 5-O-甲基维斯阿米醇苷在 254 nm 处有较大的吸收, 3 种成分中阿魏酸的含量相对较小, 为保证定量的准确性, 实验选择 320 nm 为检测波长。

阿魏酸含有酚羟基, 具有一定酸性, 易电离。本实验对比了不同比例甲醇-水-四氢呋喃的醋酸和磷酸溶液作为流动相, 结果表明酸性强度和种类对阿魏酸色谱峰分离影响较大, 采用 0.05% 醋酸水溶液, 可以减少拖尾, 改善峰形, 且分离效果好^[4]。又流动相中加入四氢呋喃可以有效改善 5-O-甲基维斯阿米醇苷的峰形^[6], 缩短分析时间。实验选择甲醇-0.05% 醋酸-四氢呋喃 (34:65:0.2) 为流动相, 3 个组分分离度满足要求且峰形良好。

实验以甲醇为溶剂分别考察超声与加热回流 2 种提取方式, 2 种方式提取率相近, 回流提取杂质较多, 因此选择甲醇超声提取法。同时对提取时间进

行了考察, 以甲醇为提取溶剂分别超声提取 15、30、45 min。经考察, 结果表明超声提取 30 min 与 45 min 提取结果基本一致, 表明超声提取 30 min 时基本提取完全。

有文献报道阿魏酸不稳定^[7], 研究了光照和 pH 对阿魏酸稳定性的影响。结果表明阿魏酸在光照和碱性条件下很不稳定, 故实验应选用中性或酸性溶剂配制溶液, 且在整个实验过程中应避免光。

参考文献

- GUO Yu-lin (郭玉麟), ZHONG San-bao (钟三保). Research on synthesis and clinical pharmacology of piperazine fenlate (阿魏酸哌嗪的合成及其药理与临床研究). *J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 1987, 2(1): 52
- ZHENG Xiao-ji (郑小吉), ZHAN Xiao-nu (詹晓如), WANG Xiao-ping (王小平). Research advances of tangerine peel (陈皮研究进展). *Med Chin Med* (中国现代中药), 2007, 9(10): 30
- WANG Lin-li (王林丽), SONG Zhi-yong (宋志勇). Research advances of divaricate Saposhnikovia Root (防风的研究进展). *Chin Pharm* (中国药业), 2006, 5(17): 63
- XIAO Pei-yun (肖培云), YANG Yong-shou (杨永寿), LIU Guang-ming (刘光明). Determination of fennic acid in Xigui (白族药西归中阿魏酸的含量测定). *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med* (云南中医中药杂志), 2007, 28(12): 29
- JIANG Shun-yao (姜舜尧). Determination of hesperidin in two Chinese traditional patent medicines containing Pericarpium Citri Reticulatae by HPLC (HPLC 法测定 2 种含陈皮中成药中的橙皮苷的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(8): 613
- CHEN En-yu (陈恩瑜). Determination of Prim-oglycosin and 5-O-methylephedrine in Yupingfeng oral liquid by HPLC (HPLC 法测定玉屏风口服液中升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量). *J Strait Pharm* (海峡药科学), 2004, 16(3): 80
- GUO Shu-hao (郭书好), XU Shi-hai (徐石海), HU Xiao-gang (胡小刚), et al. Research on stability of fennic acid (阿魏酸的稳定性研究). *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2001, 20(Suppl 11): 93

(本文于 2008 年 7 月 25 日收到)