

溶液于紫外扫描仪上绘制紫外吸收光谱,波长范围200~400 nm,结果原儿茶醛和黄芩苷均在(280±2) nm有最大吸收波长。

3.2 供试品提取方法的确定 在供试品的提取中,分别采取超声(20 min、30 min和60 min)、乙醚振摇提取<sup>[6]</sup>(3、4、5次)和加热回流(30 min、60 min、120 min)3种方法进行试验,结果发现原儿茶醛在超声30 min提取测得量最高,黄芩苷在上述各种提取方法中测定量结果相差不大,故选用超声30 min作为本实验供试品提取方法。

3.3 流动相比比例确认 通过文献查找,发现测定原儿茶醛的流动相甲醇-1%冰醋酸(13:87)较多,而测定黄芩苷的流动相甲醇-1%冰醋酸(45:55)较多,两者流动相比比例相差较大,本实验曾用甲醇-1%冰醋酸不同比例等度进行调节测试,均不能满意同时检测到两种成分,后经摸索采用梯度洗脱调节流动相比比例能得到很好的峰形,分离完全,杂峰干扰少,理论塔板数高达10 000多。

3.4 丹参测定成分的选择 丹参有效成分较多,可分为脂溶性和水溶性两部分。脂溶性成分主要为丹参酮II<sub>A</sub>,水溶性成分包括丹酚酸B、丹参素、原儿茶醛等。本制剂的制法是水煎法,脂溶性成分丹参酮II<sub>A</sub>量很低,难以检测。同时由于中药复方中成分复杂,在实验条件下,水溶性成分丹酚酸B、丹参素与相邻峰不能分离,不符合定量测定要求。因此,本实验选择参考《中国药典》2010版丹红化瘰口服液的含量测定项,选择丹参有效成分原儿茶醛为测定指标成分。

3.5 测定方法 样品定量测定中每批所含的原儿

茶醛和黄芩苷的量各不相同,可能是每批所用原药材含量不同所致,因此很有必要对原儿茶醛和黄芩苷的量作相应的控制。本方为复方制剂,药味虽不多,但成分复杂,经多次试验,结果表明本方法的色谱条件柱效最高,分离度大,精密度高,重复性好,无干扰,且配制简单,能有效地控制该制剂的内在质量。

#### 参考文献:

- [1] SYZ-ZF-003-2004. 上海市食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准[S].
- [2] 卫生部颁药品标准:中药成方制剂第十七册[S]. 1998:174.
- [3] 吕文海,谭鹏,宋磊,等. 山东临沂不同加工方法丹参饮片中原儿茶醛含量测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1825-1826.
- [4] 汲臣杰,李雪松. HPLC法测定丹参口服液中原儿茶醛的含量[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(5): 336-337.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:579.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:611.
- [7] 国家药品标准(新药转正标准)中药第39册[S]. 15.
- [8] 马家燕. 对不同品种,不同产地丹参药材中原儿茶醛及丹参素含量的比较分析[J]. 中国乡村医药, 2000, 7(11): 28-29.
- [9] 张玲莉,彭燕,涂毅. 高效液相色谱法测定黄芩口服液中黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2005(5): 388-389.
- [10] 张玲,徐新刚. 9种含丹参中成药中原儿茶醛的含量测定[J]. 药物分析杂志, 1997, 17(4): 253-255.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:401.
- [12] 徐德然,王康才,王峥涛,等. 丹参中丹参素、原儿茶醛来源的初步研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(3): 148-150.

## HPLC法测定活血胶囊中羟基红花黄色素A、柚皮苷

毛阿娟<sup>1</sup>, 王晓雯<sup>2</sup>, 王世祥<sup>1</sup>, 彭宁<sup>2</sup>, 张亚军<sup>1</sup>, 郑晓晖<sup>1</sup>, 刘勤社<sup>1,2\*</sup>

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 陕西省人民医院, 陕西 西安 710068)

摘要:目的 建立活血胶囊(黄芪、红花、桃仁、枳壳、川芎、当归、赤芍、酸枣仁等)中羟基红花黄色素A和柚皮苷测定方法。方法 色谱柱 Agilent HC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-0.2%甲酸水(羟基红花黄色素A 20:80, 柚皮苷 33:67) 检测波长 羟基红花黄色素A 403 nm, 柚皮苷 283 nm, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 25℃。结果

收稿日期:2011-05-05

基金项目:陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2009ZDKG-85); 陕西省自然科学基金(2010JM4047)

作者简介:毛阿娟(1985—)女,硕士生,从事中药物质基础研究。Tel:(029) 88302686

\* 通信作者:刘勤社(1963—)男,教授,从事中西医结合研究。Tel:(029) 85251331-3223, E-mail: lqsspph@126.com

羟基红花黄色素 A 在 1.25 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $R=0.9999$ ) 柚皮苷在 8.75 ~ 350  $\mu\text{g/mL}$  ( $R=1$ ) 质量浓度范围内峰面积具有良好的线性关系,方法回收率( $n=6$ ) 分别为 98.7% 和 99.2%。羟基红花黄色素 A 和柚皮苷的最低检出限分别为 2.5 ng 和 2.75 ng。结论 本方法操作简便,结果准确,重现性良好,可为活血胶囊的质量控制提供一定依据。

关键词: HPLC; 活血胶囊; 羟基红花黄色素 A; 柚皮苷

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)10-1733-04

## Determination of hydroxy safflower yellow A and naringin in Huoxue Capsule by HPLC

MAO A-juan<sup>1</sup>, WANG Xiao-wen<sup>2</sup>, WANG Shi-xiang<sup>1</sup>, PENG Ning<sup>2</sup>, ZHANG Ya-jun<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-hui<sup>1</sup>, LIU Qin-she<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. The People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710068, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a method of determining hydroxy safflower yellow A and naringin in Huoxue Capsule (*Astragali Radix*, *Carthami Flos*, *Persicae Semen*, *Aurantii Fructus*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Angelicae sinensis Radix*, *Paeoniae Radix rubra*, *Ziziphi spinosae semen*, etc.). **METHODS** The determination was carried out with Agilent HC-C<sub>18</sub> column. The mobile phase consisted of methanol-0.2% acetic(20:80) for hydroxy safflower yellow A and (33:67) for naringin. The detection wavelengths were 403 nm for hydroxy safflower yellow A, and 283 nm for naringin. The flow rate was 0.8 mL/min and the column temperature was 25 °C. **RESULTS** There was a good linear relationship between the absorption peak area and the concentration in the range of 1.25 – 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $R=0.9999$ ) for hydroxy safflower A and 8.75 – 350  $\mu\text{g/mL}$  ( $R=1$ ) for naringin. The average recoveries ( $n=6$ ) were 98.7% and 99.2%, and the limit of detections were 2.5 ng and 2.75 ng, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, and reproducible. It provides bases for the quality control.

**KEY WORDS:** HPLC; Huoxue Capsule; hydroxy safflower yellow A; naringin

活血胶囊由西安大唐制药有限公司生产,具有补气养血、活血化痰、理气安神的作用。该药选用地道中药材原料黄芪、红花、桃仁、枳壳、川芎、当归、赤芍、酸枣仁等多味中药,主要用于治疗气血虚弱、瘀血阻滞所致的心绞痛、过敏性紫癜、颈椎病和神经衰弱等疾病<sup>[1-3]</sup>。中药复方中羟基红花黄色素 A 和柚皮苷定量测定的报道较多<sup>[4-11]</sup>,而活血胶囊中这两种成分的定量测定尚未见报道,在前面工作中我们已对其中芍药苷、苦杏仁苷、川芎嗪、阿魏酸进行了测定<sup>[12]</sup>。为了更全面控制药物质量,本实验对其中羟基红花黄色素 A、柚皮苷进行了测定。

### 1 仪器与试剂

Agilent 四元高效液相色谱仪(1100 系列),包括:四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱和 DAD 二极管阵列检测器; Sartorius BP221S 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); Maxima 超纯水机(英国); KQ5200DE 型数控超声波清洗仪(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

本研究所用的活血胶囊样品由西安大唐制药集团公司提供。羟基红花黄色素 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111637-200905);柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110722-200610);色谱甲醇(美国 Fisher 公司),其它试剂均为分析纯。

### 2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent HC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );检测波长:羟基红花黄色素 A 403 nm 柚皮苷 283 nm;流动相:甲醇-0.2% 甲酸水(羟基红花黄色素 A 20:80 柚皮苷 33:67);体积流量:0.8 mL/min;柱温:25 °C。

在拟定色谱条件下,羟基红花黄色素 A 和柚皮苷与其他组分色谱峰均可基线分离,且分离度 > 1.5;羟基红花黄色素 A 和柚皮苷的理论塔板数分别为 11 838、39 717;且阴性样品无干扰。对照品、供试品及阴性样品色谱图见图 1。

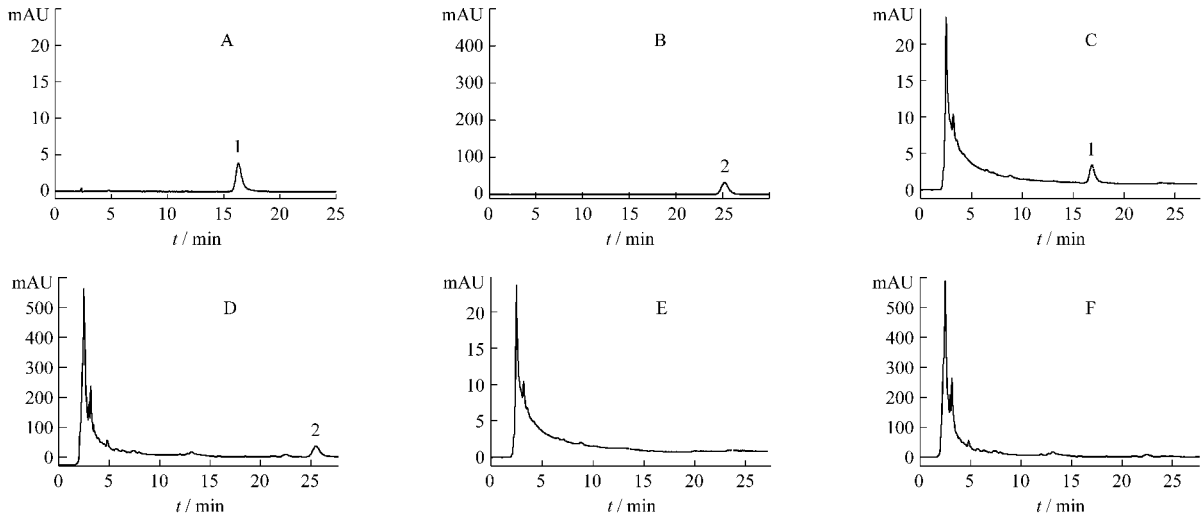


图1 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms

A. 羟基红花黄色素 A 对照品 B. 柚皮苷对照品 C. 羟基红花黄色素 A 供试品 D. 柚皮苷供试品 E. 缺红花阴性对照 F. 缺枳壳阴性对照  
1. 羟基红花黄色素 A 2. 柚皮苷  
A. reference substance of hydroxy safflower yellow A B. reference substance of naringin C. sample of Huoxue Capsule for determining hydroxy safflower yellow A D. sample of Huoxue Capsule for determining naringin E. negative sample without *Carthami Flos* F. negative sample without *Aurantii Fructus* 1. hydroxy safflower yellow A 2. naringin

2.2 对照品溶液的配制 精密称取羟基红花黄色素 A 标准品 1.2 mg 柚皮苷标准品 1.4 mg, 分别置 2 mL 的量瓶中, 用纯水超声溶解, 稀释至刻度, 摇匀作为对照品溶液(羟基红花黄色素 A 0.6 mg/mL 柚皮苷 0.7 mg/mL) 4 °C 储存备用。

2.3 供试品溶液的制备 取活血胶囊样品, 研细, 精密称取 0.3 g, 置具塞锥形瓶中, 加 50 mL 纯水, 密塞超声处理 30 min, 放冷, 摇匀, 微孔滤膜过滤, 取滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性供试品溶液的制备 按活血胶囊生产工艺制备缺红花、枳壳的阴性制剂, 并按照供试品溶液的制备方法制备各阴性供试品溶液。

### 3 结果

3.1 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下对照品溶液适量, 将其配成羟基红花黄色素 A 质量浓度为: 1.25、2.5、5、12.5、25、50  $\mu\text{g/mL}$ , 柚皮苷质量浓度为: 8.75、17.5、35、87.5、175、350  $\mu\text{g/mL}$  的系列对照品溶液。精密吸取上述质量浓度的对照品溶液各 50  $\mu\text{L}$ , 按确定的色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 对应峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。结果: 羟基红花黄色素 A:  $Y = 12.919X - 1.2878$ ,  $R = 0.9999$ ; 柚皮苷:  $Y = 9.6967X + 12.492$ ,  $R = 1.000$ 。

3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液 50  $\mu\text{L}$  (羟基红花黄色素 A 25  $\mu\text{g/mL}$ , 柚皮苷 87.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 分别连续进样 5 次, 羟基红花黄色素 A 和柚皮苷峰面

积的 RSD 值分别为 1.9%、1.2%, 表明其精密度良好。

3.3 重复性试验 取活血胶囊样品 (批号 20081204) 5 份, 分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 并进行测定, 其峰面积的 RSD 值分别为 1.3% 和 2.8%, 表明样品重复性良好。

3.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 50  $\mu\text{L}$  (批号 20081006), 室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 分别进样, 羟基红花黄色素 A 和柚皮苷峰面积的 RSD 值分别为 1.6% 和 1.9%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

3.5 回收率试验 取已知量的活血胶囊样品 (批号 20081006) 0.3 g, 平行 6 份, 置 50 mL 量瓶中, 分别加入羟基红花黄色素 A 对照品溶液 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 和柚皮苷对照品溶液 (400  $\mu\text{g/mL}$ ) 各 2 mL, 用纯水稀释至刻度, 按 2.3 项下供试品溶液制备方法进行制备, 分别测定, 计算回收率, 结果见表 1、2。

由表 1 和 2 可知, 羟基红花黄色素 A 和柚皮苷的平均回收率分别为 98.7% 和 99.2%, 表明方法回收率良好。

3.6 样品测定 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 进样量均为 50  $\mu\text{L}$ , 每批样品平行测定 3 次, 记录峰面积, 代入标准曲线, 按照标准曲线法计算羟基红花黄色素 A 和柚皮苷量, 测定结果见表 3。

表1 羟基红花黄色素A加样回收率结果 (n=6)

Tab.1 Result of recovery test of hydroxy safflower yellow A (n=6)

取样量 /mg	样品原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
300.02	0.066	0.20	0.272	103.0		
300.01	0.065	0.20	0.262	98.5		
299.07	0.064	0.20	0.262	98.8	98.7	2.3
299.09	0.067	0.20	0.257	94.8		
300.00	0.063	0.20	0.264	100.3		
300.02	0.069	0.20	0.263	97.2		

表2 柚皮苷加样回收率结果 (n=6)

Tab.2 Result of recovery test of naringin (n=6)

取样量 /mg	样品原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
300.02	0.75	0.80	1.52	97.4		
300.01	0.73	0.80	1.58	99.0		
299.07	0.79	0.80	1.55	101.2	99.2	2.7
299.09	0.74	0.80	1.51	96.7		
300.00	0.77	0.80	1.59	103.6		
300.02	0.77	0.80	1.55	97.2		

表3 样品中羟基红花黄色素A和柚皮苷测定结果 (n=3)

Tab.3 The contents of hydroxy safflower yellow A and naringin in sample (n=3)

批号	羟基红花黄色素 A / (mg/g)	RSD / %	柚皮苷 / (mg/g)	RSD / %
20090203	0.17	4.0	2.26	3.3
20081204	0.14	3.2	2.27	5.3
20090205	0.21	3.3	2.53	2.6
20090201	0.14	3.4	2.16	4.0
20090302	0.16	3.1	2.92	2.6
20081006	0.19	4.3	2.30	1.9

#### 4 讨论

本实验首先对活血胶囊样品的提取方法进行了考察,比较纯水、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、以及 100% 甲醇,结果纯水提取效率较其他高,且成本低,因此我们选择纯水作为活血胶囊的提取溶剂。同时我们对提取时间也进行了考察,比较超声处理 20 min、30 min、40 min、50 min,结果超声 30 min 得到样品测定成分含有量基本达到最大,因此我们对样品超声提取 30 min。

为了同时测定羟基红花黄色素 A 和柚皮苷,我们首先选择等度洗脱,但两物质出峰时间相差太远,进而采用梯度洗脱,但基线上漂严重;同时由于样品中羟基红花黄色素 A 和柚皮苷量有限,在同一检测波长下峰面积较小,积分误差较大,所以最后决定对两成分进行分别测定。

本实验对不同流动相也进行了比较,如甲醇-水、甲醇-0.2% 甲酸水、乙腈-水,结果显示采用甲醇-0.2% 甲酸水作为流动相时,羟基红花黄色素 A 和柚皮苷峰形良好,与周围峰达到完全分离,且毒性小成本低,因此我们选甲醇-0.2% 甲酸水作为洗脱系统。

#### 参考文献:

- [1] 田金荷. 活血胶囊临床应用及临床研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(29): 300-301.
- [2] 魏安伟. 活血胶囊治疗稳定型心绞痛疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(25): 3063-3064.
- [3] 刘月庆,王睿,毕开顺,等. HPLC 法测定红花中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(4): 356-358.
- [4] 陈宗良,朱克,周玲,等. HPLC 法测定愈伤灵胶囊中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 298-299.
- [5] 吴锋,豆久锋,陈忠良. HPLC 法测定祛风止痛胶囊中羟基红花黄色素 A [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1817-1818.
- [6] 金鸣,藏宝霞,李金荣,等. 羟基红花黄色素 A 热稳定性的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1197.
- [7] Wei X B, Liu H Q, Sun X, et al. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 386(1): 58.
- [8] 侯剑萍,王春霞. 健胃片中柚皮苷的含量测定[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1182-1183.
- [9] Ribeiro I A, Ribeiro M H L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method [J]. *Food Control*, 2008, 19(4): 432-438.
- [10] 崔宇宏,常海萍,史宪海. 对枳壳中柚皮苷含量测定方法的改进[J]. 中国药品标准, 2005, 6(1): 46-47.
- [11] 王发英,徐欢,杨武亮,等. 枳壳质量标准研究[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1897.
- [12] 王世祥,王晓雯,高志娟,等. HPLC 测定活血胶囊中芍药苷、苦杏仁苷、川芎嗪及阿魏酸的含量[J]. 中成药, 2001, 33(4): 619-622.