

HPLC同时测定心脑血管胶囊中葛根素、虎杖苷和野黄芩苷的含量

栾爽, 王冬梅, 赵怀清*, 高颢, 申涛, 石健 (沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 利用梯度洗脱, 建立高效液相色谱法测定心脑血管胶囊中葛根素、虎杖苷和野黄芩苷含量的方法。方法 采用高效液相色谱法。Diamondsil ODS柱 (4.6 mm ×200 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) 和 0.05%磷酸水溶液 (B) 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 336 nm。结果 葛根素的线性范围为 0.023 2 ~ 0.185 6 g · L⁻¹ (r=0.999 5), 平均回收率为 100.0%, RSD = 1.3%, 虎杖苷的线性范围为 0.015 2 ~ 0.121 6 g · L⁻¹ (r=0.999 6), 平均回收率为 98.7%, RSD = 0.9%, 野黄芩苷的线性范围为 0.004 6 ~ 0.036 9 g · L⁻¹ (r=0.999 8), 平均回收率为 100.4%, RSD = 0.9%。结论 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于心脑血管胶囊的质量控制。

关键词: 心脑血管胶囊; 高效液相色谱法; 葛根素; 虎杖苷; 野黄芩苷

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001 - 2494 (2008) 19 - 1510 - 03

Simultaneous Determination of Puerarin, Polygonin and Scutellarin in Xinnaoiantong Capsules by HPLC

LUAN Shuang, WANG Dongmei, ZHAO Huaiqing*, GAO Ye, SHEN Tao, SHI Jian (School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a quantitative method simultaneous for determination of puerarin, polygonin and scutellarin in Xinnaoiantong capsules by HPLC. **METHODS** The separation was performed on a column Diamondsil ODS (4.6 mm ×200 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and 0.05% H₃PO₄ (B) with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ with the wavelength at 336 nm. **RESULTS** For puerarin, the calibration curve was linear (r=0.999 5) in the range of 0.023 2 - 0.185 6 g · L⁻¹, the average recovery was 100.0% (RSD = 1.3%). For polygonin, the calibration curve was linear (r=0.999 6) in the range of 0.015 2 - 0.121 6 g · L⁻¹, the average recovery was 98.7% (RSD = 0.9%). For scutellarin, the calibration curve was linear (r=0.999 8) in the range of 0.004 6 - 0.036 9 g · L⁻¹, the average recovery was 100.4% (RSD = 0.9%). **CONCLUSION** The method was sensitive, accurate and can be used in the quality control of Xinnaoiantong capsules.

KEY WORDS: Xinnaoiantong capsules; HPLC; puerarin; polygonin; scutellarin

心脑血管胶囊是贵州苗族药, 为地方标准升国家标准的中药品种。由灯盏细辛、虎杖、葛根和柿叶等中药材经提取加工制成的胶囊剂。具有活血化瘀、通络止痛之功效, 用于淤血闭阻引起的胸痹、眩晕、冠心病心绞痛、脑动脉硬化及高脂血症等^[1]。葛根素、虎杖苷和野黄芩苷分别为药材葛根、虎杖和灯盏细辛中的有效成分。关于葛根素、

虎杖苷和野黄芩苷 3组分的同时测定尚未见文献报道。本实验采用梯度洗脱反向高效液相色谱法同时测定心脑血管胶囊中葛根素、虎杖苷和野黄芩苷的含量。实验结果表明, 本法简便、快捷、灵敏、准确、可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

REFERENCES

- [1] ZHANG H, LU M H, FENG W Y, *et al* Study on the antiinflammatory, antitussive, expectorant and analgesic effects of Shuangqing Yanhou tablets [J]. *Sichuan J Physiol Sci* (四川生理科学杂志), 2005, 27(3): 99-101.
- [2] ZHANG L P. Determination of the content of chlorogenic acid in Yinqiao Shangfeng capsules by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25(7): 633-634.
- [3] ZHANG Y Q, YE F Y, WU Q, *et al* Content determination of gallic acid in *Canarium album* raeusch by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13(7): 388-389.

- [4] PAN G Q, LU Y C. Determination of gallic acid in qiweikezi powder by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(9): 1350-1351.
- [5] MAO C F, HU Z J, WU Q P, *et al* Determination of chlorogenic acid in Jinlian Kangbingdu oral solution by RP-HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25(3): 240-241.
- [6] SUN L L, JIANG B, YUAN Z H, *et al* Determination of the content of gallic acid in *Sanguisorbae* slice by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2006, 28(8): 1144-1147.

(收稿日期: 2007-10-28)

作者简介: 栾爽, 女, 硕士研究生 *通讯作者: 赵怀清, 男, 教授, 硕士生导师

Tel: (024) 23986250 E-mail: zhaohq1955@sina.com

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (LC - 10AT泵, SPD - 10AV 紫外检测器, 日本岛津公司); ANASTAR 色谱数据工作站 (美国 Suntek Science 公司); 超声波仪 (上海冠特超声仪器有限公司); 电子分析天平 (北京塞多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试药

心脑血管胶囊 (批号 20060318, 20060815, 20061209) (贵州太合药业); 葛根素对照品 (110752-200511)、虎杖苷对照品 (11575-200301) 和野黄芩苷对照品 (110842-200605) (中国药品生物制品检定所); 甲醇 (色谱纯), 磷酸 (分析纯), 水 (重蒸水)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) 和 0.05% 磷酸水溶液 (B) 梯度洗脱: $t=0\sim 10$ min, B: 90% 不变; $t=10\sim 29$ min, B: 90% ~ 84%; $t=29\sim 50$ min, B: 84% ~ 80%; 流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 336 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品 11.6 mg, 虎杖苷对照品 7.6 mg, 野黄芩苷对照品 2.3 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液, 每 1 mL 分别含葛根素 0.464 mg, 虎杖苷 0.304 mg, 野黄芩苷 0.092 mg。

2.2.2 供试品溶液的制备 取心脑血管胶囊 5 粒, 内容物混匀, 取约 0.2 g 粉末, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称重, 超声处理 30 min, 冷却, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.3 阴性对照品溶液的制备 按照心脑血管胶囊的制备工艺分别制备不含葛根、虎杖和灯盏细辛的阴性样品, 并按 “2.2.2” 项下方法制成阴性对照品溶液。

2.3 系统适用性实验

取供试品溶液, 在 “2.1” 色谱条件下进样, 理论塔板数按葛根素峰计算不低于 10 000, 按虎杖苷峰计算不低于 13 000, 按野黄芩苷峰计算不低于 26 000。葛根素、虎杖苷和野黄芩苷的保留时间分别为 24.0, 40.7 和 48.3 min, 与相邻色谱峰的分

度均大于 1.5。阴性对照品测定无干扰。见图 1。

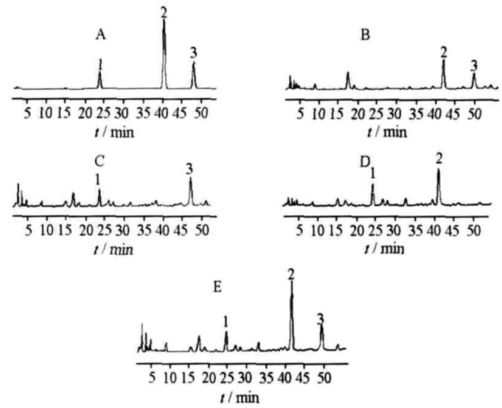


图 1 心脑血管胶囊样品色谱图

A - 对照品; B - 缺葛根阴性样品; C - 缺虎杖阴性样品; D - 缺灯盏细辛阴性样品; E - 心脑血管胶囊样品; 1 - 葛根素; 2 - 虎杖苷; 3 - 野黄芩苷

Fig. 1 Chromatograms of Xinnaoiantong capsules samples

A - chemical reference substance; B - blank of Xinnaoiantong capsules without *Radix Puerariae*; C - blank of Xinnaoiantong capsules without *Polygonum cuspidatum*; D - blank of Xinnaoiantong capsules without *Erigeron breviscapus*; E - Xinnaoiantong capsules; 1 - puerarin; 2 - polygonin; 3 - scutellarin

2.4 标准曲线的绘制

精密量取对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得标准系列溶液。分别取上述溶液各 20 μL, 在 “2.1” 色谱条件下进样, 记录色谱峰面积, 以峰面积 Y 对进样浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 作线性回归。见表 1。

表 1 3 种成分回归方程与线性范围

Tab. 1 Regression equations and calibration range of three components

Drug	Regression equation	r	Calibration range/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Puerarin	$Y=3.429\times 10^6+2.455\times 10^4$	0.999 5	0.023 2~0.185 6
Polygonin	$Y=2.329\times 10^7+4.194\times 10^4$	0.999 6	0.015 2~0.121 6
Scutellarin	$Y=3.240\times 10^7+3.342\times 10^3$	0.999 7	0.004 6~0.036 9

2.5 精密度实验

2.5.1 仪器精密度 取同一对照品溶液 (含葛根素、虎杖苷和野黄芩苷分别为 0.092 8, 0.060 8 和 0.018 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 在 “2.1” 色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 结果葛根素、虎杖苷和野黄芩苷的峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.7% 和 2.0% ($n=6$)。

2.5.2 方法重复性 取同 1 批 (1) 样品 6 份, 按 “2.2.2” 项下方法操作, 平行制备供试品溶液 6 份, 在 “2.1” 色谱条件下进样, 记录色谱峰面积, 结果葛根素、虎杖苷和野黄芩苷含量 ($\text{mg}\cdot$

g^{-1}) 的 RSD 分别为 1.5%、1.5% 和 1.7% ($n = 6$)。

2.6 稳定性实验

取同 1 份供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 6, 12 和 24 h 按“2.1”色谱条件测定, 记录色谱峰面积。结果葛根素、虎杖苷和野黄芩苷的峰面积 RSD 分别为 1.6%, 1.6% 和 1.6% ($n = 6$), 说明样品在 24 h 内稳定。

2.7 回收率实验

取已知含量的心脑联通胶囊 9 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别精密加入对照品溶液适量, 按“2.2.2”项下制备低、中、高浓度供试品溶液, 同一浓度 3 份, 在“2.1”色谱条件下进样, 记录色谱峰面积, 结果葛根素、虎杖苷和野黄芩苷的平均回收率分别为 100.0%, 98.7% 和 100.4%, RSD 分别为 1.3%, 0.9% 和 0.9% ($n = 9$)。数据见表 2。

表 2 加样回收率实验结果 $n = 9$

Tab. 2 Recoveries of samples. $n = 9$

Component	Original /mg	Added /mg	Found /mg	Recovery /%	Mean /%	RSD /%
Puerarin	1.046	0.580	1.629	100.5	100.0	1.3
	1.051	1.160	2.209	99.8		
	1.058	1.740	2.790	99.6		
Polygonin	0.675	0.380	1.049	98.2	98.7	0.9
	0.679	0.760	1.429	98.7		
	0.683	1.140	1.814	99.2		
Scutellarin	0.208	0.115	0.323	100.4	100.4	0.9
	0.209	0.230	0.440	100.7		
	0.210	0.345	0.555	100.1		

2.8 样品含量测定

取 3 批心脑联通胶囊, 按“2.2.2”项下制备供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下进样, 记录色谱峰面积, 外标一点法计算含量。数据见表 3。

表 3 葛根素、虎杖苷和野黄芩苷含量测定结果 $n = 3$

Tab. 3 Results of puerarin, polygonin and scutellarin content determination. $n = 3$

Batch	Puerarin	Polygonin	Scutellarin
	/mg · capsule ⁻¹	/mg · capsule ⁻¹	/mg · capsule ⁻¹
1	4.192	2.720	0.843
2	4.043	2.625	0.834
3	4.094	2.648	0.597

3 讨论

3.1 检测波长的确定

野黄芩苷的最大吸收波长为 286, 336 nm^[2], 中国药典中虎杖苷检测波长为 306 nm, 葛根素检测波长为 250 nm^[3]。野黄芩苷在心脑联通胶囊中含量较低, 故选择 336 nm 为检测波长, 在此波长下, 野黄芩苷响应值高, 且杂质干扰少, 便于测定。

3.2 提取条件的选择

首先采用单因素法考察了甲醇回流、甲醇超声、体积分数 70% 乙醇回流和体积分数 70% 乙醇超声提取对待测组分含量的影响。结果超声提取与回流提取效果无明显差异, 甲醇提取高于体积分数 70% 乙醇提取, 且超声提取操作简便, 故选用甲醇超声提取。然后, 应用正交设计法, 选用 $L_9(3^4)$ 因素水平表考察了超声时间 (20, 30 和 40 min), 甲醇浓度 (100%, 90% 和 80%) 和提取溶剂体积 (20, 25 和 30 mL) 对待测组分含量的影响。对实验数据直观分析发现, 甲醇浓度是主要因素, 且体积分数 80% 甲醇提取的待测组分含量高于体积分数 100% 和体积分数 90% 的甲醇。所以, 又同法考察了超声时间 (20, 30 和 40 min), 甲醇浓度 (80%, 70% 和 60%) 和提取溶剂体积 (20, 25 和 30 mL) 对待测组分含量的影响。结果确定以体积分数 70% 的甲醇 25 mL, 超声 30 min 为最佳提取条件。

中医用药主要形式是复方, 中药复方制剂通过处方中多味中药材中多种化学成分共同作用而产生疗效, 是多成分, 多靶点, 整合调节作用的结果。若仅对其中单一成分的含量进行控制, 不能全面地反映中药复方制剂的药效。本实验以多味药材多个有效成分的含量测定体系对心脑联通胶囊的质量进行综合评价, 体现中医药整体作用的特点, 能够较好地控制中药复方制剂的质量。

REFERENCES

- [1] DING X G, LU L N, LI Y J. Determination of emodin in Xinniaoliangong Capsules with RP-HPLC[J]. *J Guiyang Med Coll* (贵阳医学院学报), 2005, 30(3): 232-233, 238.
- [2] YANG W Y, ZHANG Y, DUAN J G. Determination of scutellarin in *Erigeron breviscapus* with RP-HPLC [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学报), 2001, 24(3): 37-38, 41.
- [3] *Ch P* (2005) Vol 1 (中国药典 2005 年版. 一部) [S]. 2005: 233-234.

(收稿日期: 2007-09-06)