

高效液相色谱法同时测定跌打活血散中羟基红花黄色素A和阿魏酸的含量

赵文法, 冯家龙

聊城市检验检测中心药品检验科, 山东 聊城

收稿日期: 2024年2月20日; 录用日期: 2024年3月21日; 发布日期: 2024年3月28日

摘要

目的: 建立跌打活血散中红花和当归的主要成分羟基红花黄色素A和阿魏酸的含量测定方法。方法: 以 Agilent ZORBAXSB-C8柱(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)为色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸-四氢呋喃(18:80:2)为流动相, 检测波长为340 nm, 流速为1.0 ml/min, 柱温为30 $^{\circ}$ C。结果: 羟基红花黄色素A在40.2~201.0 μ g/mL浓度范围内线性关系良好, $r = 0.9995$ (RSD = 1.6%, $n = 5$), 平均回收率为96.2% (RSD = 1.3%, $n = 6$); 阿魏酸在1.01~5.05 μ g/mL浓度范围内线性关系良好, $r = 0.9997$ (RSD = 1.1%, $n = 5$), 平均回收率为98.6% (RSD = 1.5%, $n = 6$)。结论: 本方法简便、准确, 结果稳定, 可用于跌打活血散中红花和当归的主要成分羟基红花黄色素A和阿魏酸的测定。

关键词

跌打活血散, 羟基红花黄色素A, 阿魏酸, 含量测定, 高效液相色谱

Simultaneous Determination of Hydroxysafflor Yellow A and Ferulic Acid in Diedahuoxue Powder by HPLC

Wenfa Zhao, Jialong Feng

Drug Inspection Department of Liaocheng Inspection and Testing Center, Liaocheng Shandong

Received: Feb. 20th, 2024; accepted: Mar. 21st, 2024; published: Mar. 28th, 2024

Abstract

Object: To establish a method for the determination of Hydroxysafflor yellow A and ferulic acid in diedahuoxue powder. Methods: Agilent ZORBAX SB-C8 column (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm) was used as the chromatographic column, acetonitrile-0.1% phosphoric acid-tetrahydrofuran (18:80:2) as

the mobile phase, the detection wavelength was 340 nm, the flow rate was 1.0 ml/min, and the column temperature was 30°C. Results: The linear range of Hydroxysafflor yellow A was 40.2~201.0 µg/ml, $r = 0.9995$ (RSD = 1.6%, $n = 5$), the average recovery was 96.2% (RSD = 1.3%, $n = 6$); the linear range of Ferulic Acid was 1.01~5.05 µg/ml, $r = 0.9997$ (RSD = 1.1%, $n = 5$), the average recovery was 98.6% (RSD = 1.5%, $n = 6$). Conclusion: The method is simple, accurate and stable. It can be used for the determination of Hydroxysafflor yellow A and Ferulic Acid in diedahuoxue Powder.

Keywords

Diedahuoxue Powder, Hydroxysafflor Yellow A, Ferulic Acid, Determination, HPLC

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

跌打活血散现行质量标准收载于《中国药典》2020年版一部[1], 处方由红花, 当归, 血竭, 三七, 烫骨碎补, 续断, 乳香(炒), 没药(炒), 儿茶, 大黄, 冰片, 土鳖虫等组成。方中红花、乳香、没药活血祛瘀止痛; 血竭、三七、骨碎补、儿茶、土鳖虫活血疗伤; 当归、续断养血活血, 疗伤续折; 大黄、冰片破瘀消积止痛。诸药合用, 共奏舒筋活血, 散瘀止痛之功效。临床上主要用于治疗跌打损伤, 瘀血疼痛, 闪腰岔气。现行质量标准仅规定了没药、乳香、血竭、红花、续断、大黄、土鳖虫的显微鉴别, 大黄、当归、儿茶的薄层色谱鉴别及制剂通则检查, 不利于该产品的质量, 制剂处方中主成分当归, 其有效成分均为阿魏酸, 红花的有效成分为羟基红花黄色素 A。本研究在参考大量文献资料的基础上[2]-[12], 采用高效液相色谱法同时测定跌打活血散中的羟基红花黄色素 A 和阿魏酸, 同时控制成品中当归和红花含量, 可用于控制跌打活血散的质量, 为其质量标准的提高提供依据。

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪(配 DAD 检测器); Agilent ZORBAX SB-C8 色谱柱(5 µm, 250 mm × 4.6 mm); BT125D 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司); KQ100 型超声波药品处理机(昆山市超声仪器有限公司)。

2.2. 试剂

羟基红花黄色素 A 对照品(批号: 111638-201810, 中国食品药品检定研究院), 阿魏酸对照品(批号: 110773-201614, 中国食品药品检定研究院), 色谱乙腈(天津大茂化学试剂), 其他试剂均为分析纯, 样品为市售, 阴性样品为自制。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件与系统适用性试验

1) 色谱条件以 Agilent ZORBAX SB-C8 柱(5 µm, 250 mm × 4.6 mm)为色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸-四氢呋喃(18:80:2)为流动相, 波长为 340 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30°C, 进样量为 10 µl。

2) 系统适用性试验理论板数按羟基红花黄色素 A 峰计算应不低于 3000, 羟基红花黄色素 A 和阿魏

酸与相邻峰的分离度均大于 1.5。

3.2. 溶液的制备方法

3.2.1. 供试品溶液的制备

取本品适量约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 ml, 密塞, 称定重量, 超声提取 25 分钟, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇稀释成 10 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 即得。

3.2.2. 对照品溶液的制备

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品和阿魏酸对照品, 加 50% 甲醇制成每 1 ml 含羟基红花黄色素 A 80 μg 和阿魏酸 2 μg 的混合溶液, 摇匀, 即得。

3.2.3. 阴性样品溶液的制备

按质量标准【处方】和【制法】项下的规定制备不加红花和当归的阴性样品适量, 取约 1.0 g, 照“3.2.1.”项下方法操作, 即得。

3.3. 专属性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μl , 注入液相色谱仪, 按“3.1.”项下色谱条件测定。结果表明, 阴性样品中在与羟基红花黄色素 A 对照品和阿魏酸对照品保留时间相应的位置无色谱峰, 说明处方中其他组分对测定无干扰, 方法专属性好, 选择性高。

3.4. 线性关系的考察

取羟基红花黄色素 A 对照品和阿魏酸对照品, 精密称定, 加 50% 甲醇制成含羟基红花黄色素 A 为 40.2、60.3、80.4、120.6、201.0 $\mu\text{g/ml}$ 和阿魏酸为 1.01、1.515、2.02、3.03、5.05 $\mu\text{g/ml}$ 的标准系列混合溶液, 按“3.1.”项下色谱条件, 分别取各浓度对照品溶液 10 μl 注入液相色谱仪测定, 以浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 羟基红花黄色素 A 在 40.2~201.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 阿魏酸在 1.01~5.05 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 见表 1~2。

Table 1. Results of linear relationship examination for hydroxysafflower yellow pigment A

表 1. 羟基红花黄色素 A 线性关系考察结果

	1	2	3	4	5	响应因子 RSD%
浓度(mg/mL)	40.2	60.3	80.4	120.6	201	
峰面积 A	1905.641	2896.161	3787.983	5689.829	9581.247	
响应因子 $f = C/A \times 1000$	21.095	20.821	21.225	21.196	20.978	0.6%
标准曲线方程	$A = 47.584C - 8.3191$					$r = 0.9998$

Table 2. Results of linear relationship examination of ferulic acid

表 2. 阿魏酸线性关系考察结果

	1	2	3	4	5	响应因子 RSD%
浓度($\mu\text{g/mL}$)	1.01	1.515	2.02	3.03	5.05	
峰面积 A	203.928	304.526	410.248	612.43	1025.032	
响应因子 $f = C/A \times 1000$	0.495	0.497	0.492	0.495	0.493	0.2%
标准曲线方程	$A = 203.29C - 2.0804$					$r = 0.9999$

3.5. 精密度试验

按“3.2.1.”项下制备样品溶液, 取同一供试品溶液, 按“3.1.”项下色谱条件测定进样 10 μ l, 连续进样 5 次, 以峰面积计算, 羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 为 1.2%, 阿魏酸峰面积的 RSD 为 0.9%, 结果表明精密度良好, 符合分析要求。

3.6. 重复性试验

取同一批号的供试品, 按“3.2.1.”项下制备样品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.1.”项色谱条件测定, 以峰面积计算含量, 羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 为 1.8%, 阿魏酸峰面积的 RSD 为 1.2%, 结果表明本方法重复性符合要求。

3.7. 稳定性试验

取“3.6.”项下其中一份供试品溶液, 按“3.1.”项下色谱条件下, 分别在 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 测定 1 次。测定供试品中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量, 以观察供试品溶液在检测过程中待测成分的稳定性。试验结果表明供试品溶液在 24 小时内稳定性良好, 能够满足测定需要。

3.8. 加样回收试验

取已知含量的供试品(批号: 20200201)适量, 加入适量混合对照品溶液, 制成低、中、高三个不同浓度的供试品溶液各 3 份, 分别测定其含量, 计算羟基红花黄色素 A 平均回收率为 95.9%, RSD 为 0.8% ($n = 6$); 阿魏酸平均回收率为 98.9%, RSD 为 1.0% ($n = 6$)。试验结果表明, 该方法准确度符合规定。结果见表 3~4。

Table 3. Results of the recovery test for hydroxysafflower yellow pigment A ($n = 6$)

表 3. 羟基红花黄色素 A 加样回收试验结果($n = 6$)

	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率	平均回收率及 RSD%
低	0.5012	0.952	0.816	1.662	94.0%	95.9% RSD = 1.0%
	0.5036	0.957	0.816	1.677	94.6%	
中	0.5016	0.953	1.020	1.943	98.5%	
	0.5002	0.950	1.020	1.931	98.0%	
高	0.5062	0.962	1.224	2.077	95.0%	
	0.5097	0.968	1.224	2.090	95.3%	

Table 4. Results of Ferulic Acid sample recovery test ($n = 6$)

表 4. 阿魏酸加样回收试验结果($n = 6$)

	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率	平均回收率及 RSD%
低	0.5012	0.0226	0.016	0.0386	97.8%	98.8% RSD = 1.0%
	0.5036	0.0227	0.016	0.0387	95.1%	
中	0.5016	0.0226	0.020	0.0426	100.6%	
	0.5002	0.0225	0.020	0.0425	100.1%	
高	0.5062	0.0228	0.024	0.0468	99.4%	
	0.5097	0.0229	0.024	0.0469	99.9%	

3.9. 样品测定

对 3 批样品进行测定, 分别按“3.2.1.”项下方法制备供试品溶液, 按 3.1.”项下色谱条件测定, 以峰面积计算含量, 结果见表 5。

Table 5. Determination results of three batches of samples

表 5. 三批样品测定结果

含量	批号	20191001	20200201	20200302
羟基红花黄色素 A (mg/g)		1.85	1.90	1.92
阿魏酸(mg/g)		0.049	0.045	0.047

4. 讨论

4.1. 色谱条件的选择

主要依据供试品溶液中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸主峰有无干扰, 通过 DAD 检测器对供试品中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的全波长检测, 经比较供试品溶液在以乙腈-0.1%磷酸-四氢呋喃(18:80:2)为流动相, 波长为 340 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30℃的色谱条件下, 羟基红花黄色素 A 和阿魏酸主峰与其他杂质峰分离良好, 羟基红花黄色素 A 主峰的纯度因子 999.92, 阿魏酸主峰的纯度因子 1000, 在可接受的阈值内。

4.2. 供试品溶液制备方法选择

比较了提取溶剂水、甲醇、50%甲醇, 提取方法加热回流 30 min、超声 25 min 等不同的方法, 结果表面用 50%甲醇, 超声提取操作简单, 测定的羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量较高且与其他提取方法基本一致。

4.3. 综合评价

本文参考国内外大量中成药中有关羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量测定方法的文献资料和多次试验, 建立了本实验方法, 实验结果显示, 本方法简便、准确, 结果稳定, 可用于控制跌打活血散的质量及本品中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸含量的质量评价。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1723-1724.
- [2] 王福成, 冯瑞祥, 杨玲霞, 等. HPLC 法同时测定舒心宁片中羟基红花黄色素 A、阿魏酸的含量[J]. 甘肃医药, 2018, 37(3): 271-272.
- [3] 王亚洲, 杨春旭. HPLC 同时测定蝎龙接骨散中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 18(22): 109-111.
- [4] 戴作波, 姜志戎. HPLC 法测定麝香接骨丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 系统医学, 2018, 3(12): 156-159.
- [5] 许爱珍, 李欢, 张宏, 等. 痹通冲剂中羟基红花黄色素 A 和葛根素的含量测定[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(6): 721-723+728.
- [6] 李娣, 曹雪晓, 蒲位凌, 等. 血必净注射液用有效成分的 HPLC 法定量检测[J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1157-1160.
- [7] 许辉, 刘军, 代鹏程, 等. 三七消痔栓中羟基红花黄色素 A 测定[J]. 内蒙古石油化工, 2019, 45(1): 3-5.
- [8] 刘雪, 石晓倩, 吴晏杰, 等. UPLC 法同时测定新安名方脑络欣通中 5 个活性成分的含量[J]. 贵州中医药大学学

报, 2020, 44(4):26-31.

- [9] 徐金玲, 樊磊磊, 王雪芹, 等. 浓缩当归丸质量标准的提高及阿魏酸的含量测定研究[J]. 中国药品标准, 2020, 21(6): 510-514.
- [10] 庄佳芳, 李扬, 史涛. HPLC 波长切换法同时测定强肝颗粒中 8 种活性成分的含量[J]. 中国药师, 2020, 23(6): 1223-1226.
- [11] 杨小兰, 谢和兵, 尼玛次仁, 等. HPLC 法测定藏药十六味杜鹃花丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 食品与药品, 2023(5): 432-435.
- [12] 欧贝丽, 邹燕, 龚秋翼, 施文禧. 基于阿魏酸和羟基红花黄色素 A 含量的肤痒颗粒质量评估[J]. 中国医药导刊, 2023(8): 842-846.