

引用本文:王世信,杨美娜,崔友祥,等.超高效液相色谱波长切换法同时测定芪参还五胶囊中4种成分含量[J].安徽医药,2023,27(10):1941-1944.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.10.008.

◇ 药物分析 ◇



超高效液相色谱波长切换法同时测定芪参还五胶囊中4种成分含量

王世信,杨美娜,崔友祥,闫国强,丁洪青,张树旺

作者单位:河北省沧州中西医结合医院中药药理学部,河北 沧州 061001

基金项目:河北省中医药管理局科研项目(2019267)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱(UPLC)波长切换法同时测定芪参还五胶囊中羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷4种化学成分含量。**方法** 2021年5月至2022年1月,采用UPLC,色谱柱为WATERS ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-0.2%甲酸水,梯度洗脱,流速0.3 mL/min,柱温35℃,进样量1 μL,检测波长分别为检测波长为400 nm(羟基红花黄色素A)、230 nm(芍药苷)、320 nm(阿魏酸)和260 nm(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)。**结果** 羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性范围分别为1.34~26.80 mg/L($r=0.999\ 8$)、2.46~49.20 mg/L($r=0.999\ 9$)、0.582~11.64 mg/L($r=0.999\ 9$)、0.62~12.40 mg/L($r=0.999\ 9$);平均加样回收率分别为101.11%(RSD=1.64%)、99.62%(RSD=0.79%)、100.66%(RSD=2.13%)、101.93%(RSD=1.08%)。**结论** 该方法简便、快速、准确性好,可为全面控制芪参还五胶囊的质量提供参考。**关键词:** 主成分分析; 色谱法,高压液相; 芪参还五胶囊; 羟基红花黄色素A; 芍药苷; 阿魏酸; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

Simultaneous determination of four components in *Qishen Huanwu* capsules by UPLC with wavelength switching method

WANG Shixin, YANG Meina, CUI Youxiang, YAN Guoqiang, DING Hongqing, ZHANG Shuwang

Author Affiliation: Chinese Materia Medica Department, Cangzhou Hospital of Integrated TCM-WM, Cangzhou, Hebei 061001, China

Abstract: **Objective** To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) combined with switching wavelength method for simultaneous determination of four components in *Qishen Huanwu* capsules including hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid and calycosin-7-glucoside. **Methods** From May 2021 to January 2022, UPLC was performed on the column of WATERS ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% formic acid with gradient elution at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 35℃, the injection volume was 1 μL, and the detection wavelengths were 400 nm (hydroxysafflor yellow A), 230 nm (paeoniflorin), 320 nm (ferulic acid) and 260 nm (calycosin-7-glucoside). **Results** The linear ranges of hydroxysafflor yellow A, ferulic acid, paeoniflorin and calycosin-7-glucoside were 1.34~26.80 mg/L ($r=0.999\ 8$), 2.46~49.20 mg/L ($r=0.999\ 9$), 0.582~11.64 mg/L ($r=0.999\ 9$), 0.62~12.40 mg/L ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries of the four components were 101.1% (RSD=1.6%), 99.6% (RSD=0.79%), 100.7% (RSD=2.1%), 101.9% (RSD=1.1%), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, which can be used for quality control of *Qishen Huanwu* capsules.

Key words: Principal component analysis; Chromatography, high pressure liquid; *Qishen Huanwu* capsules; Hydroxysafflor yellow A; Paeoniflorin; Ferulic acid; Calycosin-7-glucoside

芪参还五胶囊以清代《医林改错》中的经典方剂补阳还五汤为基础方,由黄芪、太子参、当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、地龙、全蝎等19味中药组成,具有益气活血,化瘀通络和清热养阴的功效^[1-2],用于气虚血瘀或痰瘀互结所致的冠心病、眩晕、脑卒中及卒中后遗症^[3-6]。方中黄芪补气行血通痹,为君药;太子参益气养阴,当归活血通络,为臣药;川芎、赤芍、桃仁和红花助当归活血祛瘀,为佐药;地龙和全蝎通经活络,引诸药之力直达络中,为佐使药。

中药复方多成分多靶点协同作用的特点,决定了多种有效成分同时定量分析能更好的从整体上控制中成药的内在质量^[7-9]。因此,本研究在前期工作基础上^[10],于2021年5月至2022年1月建立了超高效液相色谱(UPLC)波长切换法,同时测定芪参还五胶囊中羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷4种化学成分含量,并进行系统的方法学考察,为进一步提高芪参还五胶囊质量标准提供更全面的依据,以保证临床用药的安全有效。

1 材料与方法

1.1 仪器 Vanquish Flex UPLC 超高效液相色谱仪 (Thermo Fisher 公司); 电子天平 (QSP, 赛多利斯科学仪器有限公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 芍药苷对照品 (批号 110736-201943)、阿魏酸对照品 (批号 110773-201915) 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 (批号 111920-201907) 均购自中国食品药品检定研究院; 羟基红花黄色素 A 对照品 (批号 PS0325-0025) 购自成都普思生物科技有限公司, 纯度均 >98%。芪参还五胶囊为河北省沧州中西医结合医院制剂室自制 (批号 20200611, 20200624, 20200706, 2020729, 20200810)。乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 水为超纯水 (实验室自制), 余试剂为分析纯。

1.3 色谱条件 WATERS ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.2% 甲酸水 (B) 梯度洗脱 (0~2 min, 10% A; 2 min~3.5 min, 10%~28% A; 4 min~8 min, 28% A→54% A); 流速 0.3 mL/min, 检测波长为 400 nm (0~2 min)、230 nm (2~4 min)、320 nm (4~5.5 min) (阿魏酸) 和 260 nm (5.5~8 min), 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 1 μ L。

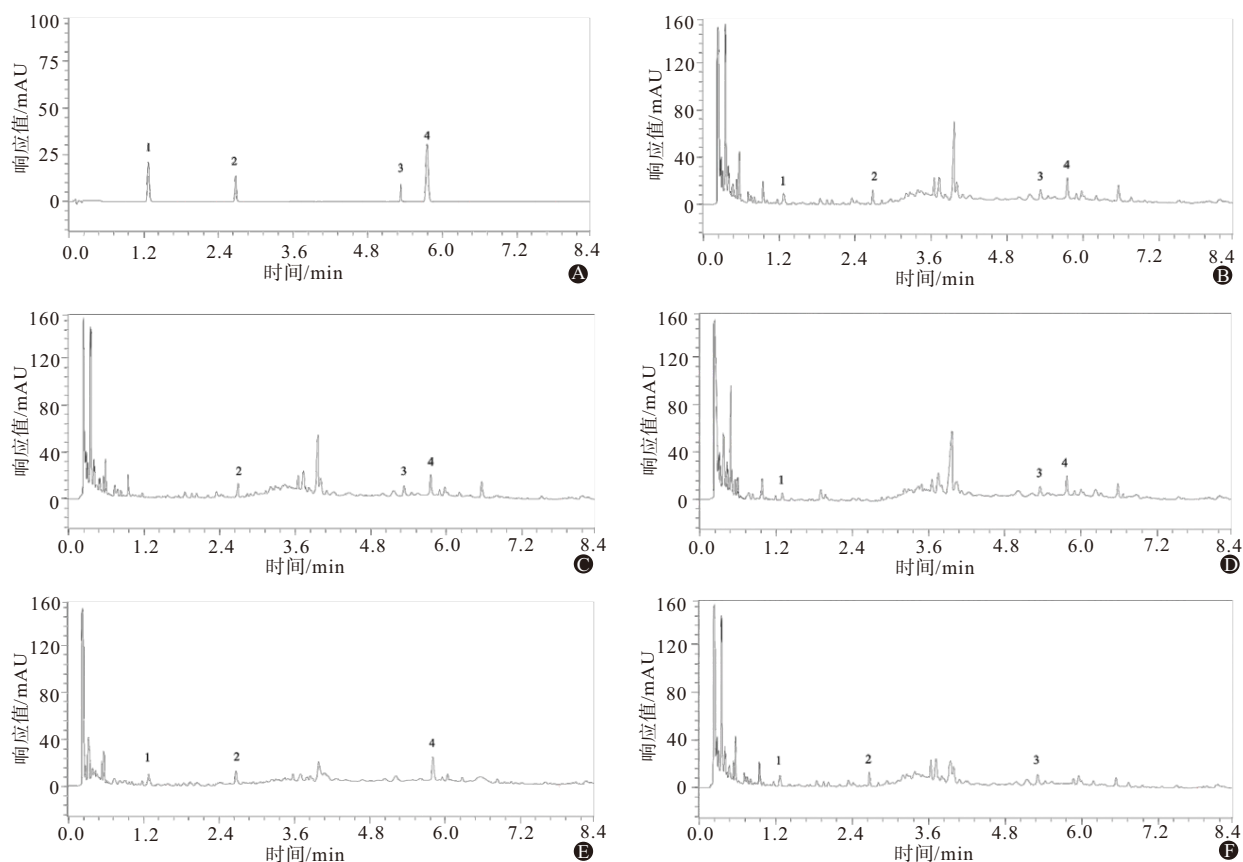
1.4 对照品溶液制备 精密称取羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量, 置于 20 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容, 得混合对照品溶液 (羟基红花黄色素 A 0.134 g/L、芍药苷 0.246 g/L、阿魏酸 0.058 2 g/L 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.062 g/L)。精密吸取混合对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、4.0 mL, 分别置于 20 mL 容量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 即得系列浓度的混合对照品溶液。

1.5 供试品溶液制备 取芪参还五胶囊内容物, 精密称取约 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定, 超声处理 30 min 后放置室温, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取续滤液, 即得。

1.6 阴性对照溶液 依照处方, 按“1.5”项下方法, 分别制备缺红花阴性对照溶液、缺赤芍阴性对照溶液、缺当归川芎阴性对照溶液和缺黄芪阴性对照溶液。

1.7 专属性试验 取混合对照品、供试品、阴性对照的溶液, 按“1.5”项色谱条件进样, 各待测成分的色谱峰无干扰, 说明该色谱系统专属性好, 见图 1。

1.8 线性关系考察 精密吸取“1.4”项下系列浓度的混合对照品溶液, 按“1.5”项下色谱条件测定各成分的峰面积。以质量浓度 X (mg/L) 对峰面积 Y 进行线性回归, 标准曲线见图 2, 回归方程及线性范围见表 1。



注: 1—羟基红花黄色素 A; 2—芍药苷; 3—阿魏酸; 4—毛蕊异黄酮苷。

图 1 对照品、供试品和阴性样品溶液 UPLC 图: A 为混合对照品溶液; B 为供试品溶液; C 为红花阴性样品溶液; D 为赤芍阴性样品溶液; E 为当归、川芎阴性样品溶液; F 为黄芪阴性样品溶液

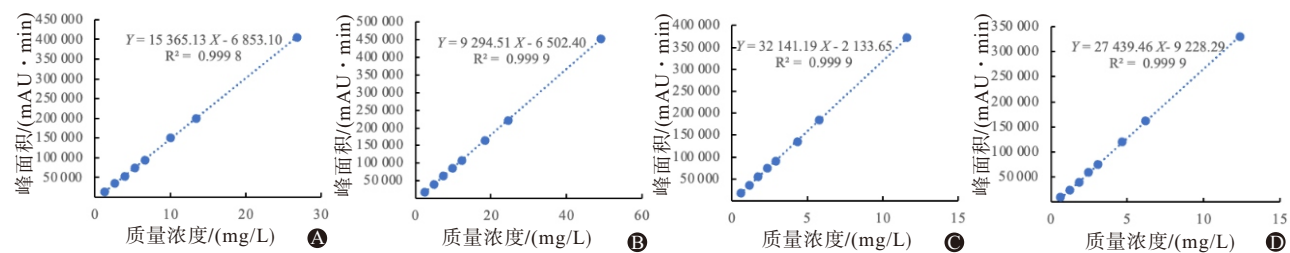


图2 芪参还五胶囊4种成分的标准曲线图:A为羟基红花黄色素A;B为芍药苷;C为阿魏酸;D为毛蕊异黄酮苷

表1 芪参还五胶囊4种成分的回归方程、相关系数和线性范围(n=8)

成分	回归方程	r 值	线性范围/(mg/L)
羟基红花黄色素 A	$Y=15\,365.13X-6\,853.10$	0.999 8	1.34~26.80
芍药苷	$Y=9\,294.51X-6\,502.40$	0.999 9	2.46~49.20
阿魏酸	$Y=32\,141.19X-2\,133.65$	0.999 9	0.58~11.64
毛蕊异黄酮苷	$Y=27\,439.46X-9\,228.29$	0.999 9	0.62~12.40

2 结果

2.1 精密度试验 取同一份芪参还五胶囊(批号20200611)供试品溶液,按“1.3”项下色谱条件连续进样6次,测定羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮苷的峰面积,计算RSD。结果各待测成分峰面积的RSD分别为0.18%,0.35%,0.16%和0.84%,结果表明仪器的精密度良好。

2.2 稳定性试验 取同一份芪参还五胶囊(批号20200611)供试品溶液,粉末约0.2 g,精密称定,按“1.5”项下方法制备供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h进样,测定供试品溶液中的羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮苷的峰面积并计算RSD。结果上述4种待测成分峰面积的RSD分别为0.95%,0.84%,1.23%和0.83%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3 重复性试验 取同一份芪参还五胶囊(批号20200611)粉末约0.2 g,精密称定,平行6份,按“1.5”项下方法制备供试品溶液,分别测定羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮苷的峰面积,计算含量及RSD。结果芪参还五胶囊中上述4种待测成分的平均质量分数分别为0.383、2.724、0.181、0.086 mg/g, , RSD 分别为0.47%,1.09%,1.30%和0.73%,结果表明该方法的重复性良好。

2.4 加样回收率试验 取已知含量的芪参还五胶囊(批号20200611)粉末约0.1 g,精密称定,分别按样品含量-对照品大约1:1加入一定量的对照品溶液,按“1.5”项方法制备供试品溶液,测定并计算羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮苷的加样回收率及RSD。结果表明该方法准确度良好,见表2。

表2 加样回收率试验结果

待测成分	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
羟基红花黄色素 A	0.100 5	0.038 5	0.040 2	0.078 9	100.44	101.11	1.64
	0.100 8	0.038 6	0.040 2	0.078 4	98.98		
	0.100 4	0.038 5	0.040 2	0.079 1	101.10		
	0.100 5	0.038 5	0.040 2	0.080 2	103.75		
	0.100 8	0.038 6	0.040 2	0.078 9	100.23		
	0.100 6	0.038 5	0.040 2	0.079 6	102.16		
芍药苷	0.100 5	0.273 7	0.254 0	0.527 3	99.83	99.62	0.79
	0.100 8	0.274 5	0.254 0	0.526 5	99.20		
	0.100 4	0.273 4	0.254 0	0.523 1	98.29		
	0.100 5	0.273 7	0.254 0	0.528 2	100.19		
	0.100 8	0.274 5	0.254 0	0.527 9	99.75		
	0.100 6	0.274 0	0.254 0	0.529 2	100.48		
阿魏酸	0.100 5	0.018 2	0.018 4	0.036 5	99.31	100.66	2.13
	0.100 8	0.018 3	0.018 4	0.037 2	102.82		
	0.100 4	0.018 2	0.018 4	0.036 8	101.04		
	0.100 5	0.018 2	0.018 4	0.036 9	101.49		
	0.100 8	0.018 3	0.018 4	0.037 1	102.28		
	0.100 6	0.018 2	0.018 4	0.036 1	97.04		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.100 5	0.008 6	0.009 0	0.017 86	102.71	101.93	1.08
	0.100 8	0.008 6	0.009 0	0.017 65	100.10		
	0.100 4	0.008 6	0.009 0	0.017 73	101.37		
	0.100 5	0.008 6	0.009 0	0.017 78	101.83		
	0.100 8	0.008 6	0.009 0	0.017 86	102.43		
	0.100 6	0.008 6	0.009 0	0.017 91	103.17		

2.5 样品含量测定 取5批芪参还五胶囊样品,分别按照“1.5”项下条件制备供试品溶液,按“1.3”项下的色谱条件平行进样2针,记录峰面积,外标法计算各成分的含量,结果见表3。

3 讨论

芪参还五胶囊作为我院院内制剂已在临床应用多年,其显著的临床疗效是多种成分共同作用的结果,因此对其进行多种有效成分同时定量分析是十分重要的。本研究针对芪参还五胶囊活血化瘀的主要功效,以君臣佐使为原则选择典型指标成分对其进行质量控制。君药黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷能保护血管内皮细胞,保护局部缺血器管损伤,抑制动脉粥样硬化^[11-12]。臣药当归和佐药川芎

表3 不同批次芪参还五胶囊中4种成分的含量(n=2)/(mg/g)

批号	羟基红花黄色素A	芍药苷	阿魏酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
20200611	0.383	2.724	0.181	0.086
20200624	0.392	2.732	0.174	0.094
20200706	0.394	2.741	0.178	0.093
20200729	0.386	2.719	0.184	0.089
20200810	0.383	2.733	0.179	0.088

中的阿魏酸可抗血小板聚集、抗血栓和抗动脉粥样硬化,缓解血管痉挛并保护脑神经^[13-16]。佐药赤芍中芍药苷可降低血液中总胆固醇和三酰甘油含量^[17],红花中羟基红花黄色素A具有抗凝血和抗血栓的作用,能有效改善神经功能缺损程度^[18-19],因此,选择以上四种化合物作为指标成分对其进行质量控制方法研究非常必要,有利于保证临床疗效。

流动相方面,分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液和乙腈-0.2%甲酸水溶液3种流动相系统,并对不同的梯度洗脱条件下待测成分色谱峰在分离度、纯度和峰形等方面进行综合比较,最终确定了乙腈-0.2%甲酸水系统为流动相梯度洗脱。

检测波长方面,采用二极管阵列检测器进行在200~400 nm进行全波长扫描,结果发现羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的最大吸收波长分别为400、230、320、260 nm。在单一波长下,较难兼顾各成分的有效检测。故采用多波长切换在各自最大吸收波长处分别检验。

本研究建立UPLC波长切换法测定芪参还五胶囊中羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷4种化学成分含量,大大缩短了分析时间,且简便、快速、准确性好,可为全面控制芪参还五胶囊的质量提供参考。

参考文献

[1] 陈蕊肖. 芪参还五胶囊对冠心病大鼠血脂水平影响的实验研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

[2] 杨龙, 李兴琼, 晏四斤. 芪参还五胶囊配合针灸对大面积脑梗死术后早期干预的临床研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2020,

29(10):1119-1122.

[3] 陈蕊肖, 王立新, 王庆海. 芪参还五胶囊对冠心病大鼠血脂水平的影响[J]. 河北中医, 2017, 39(12): 1857-1861.

[4] 张红霞, 邓海峰, 侯献兵, 等. 芪参还五胶囊联合针灸治疗气虚血瘀型青年颈性眩晕的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(17):3008-3011.

[5] 夏清岫, 苗志凯, 王立胜, 等. 芪参还五胶囊结合立体定向引流术对出血性中风患者神经功能的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(3): 454-458.

[6] 卢越, 刘丽, 刘国华, 等. 芪参还五胶囊配合穴位贴敷治疗脑梗死恢复期患者痰瘀互结证的疗效分析[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(12):57-62.

[7] 孔凡鑫, 王恒珍, 周俊梅. 高效液相色谱法检测尿毒清颗粒(无糖型)中芍药苷、大车前苷和丹参酮ⅡA成分的含量[J]. 安徽医药, 2021, 25(11):2178-2181.

[8] 陈韶彬, 曹玲, 张莉, 等. 功劳去火胶囊中多种指标性成分的同时测定[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11):1994-2000.

[9] 张鑫, 任莹, 王云霞, 等. 高效液相色谱波长切换法同时测定银花感冒颗粒中绿原酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 安徽医药, 2018, 22(7):1252-1255.

[10] 王世信, 杨美娜, 崔友祥, 等. 芪参还五胶囊的制备工艺及质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(3):357-362.

[11] 苏优拉, 陈贵林. 黄芪中黄酮类成分的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3): 849-857.

[12] 李晶晶, 崔国祯, 王亮, 等. 毛蕊异黄酮对H9c2细胞缺氧缺氧损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5):32-35.

[13] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(1):138-147.

[14] 李曦, 张丽宏, 李宝栋, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(6):1023-1028.

[15] 周时. 中药川芎有效成分的药理作用研究[J]. 内蒙古中医药, 2015, 34(5):157,170.

[16] 邓榕榕, 姚亮元, 向大雄. 阿魏酸咳嗽药理作用研究进展[J]. 中南药学, 2018, 16(11):1575-1578.

[17] 吴玲芳, 王子墨, 赫柯芊, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18):198-206.

[18] 唐红, 鲁道旺, 杨詹詹, 等. 羟基红花黄色素A的药理学研究进展[J]. 广州化工, 2017, 45(14):20-22.

[19] 刘环环, 李瑞青, 高静, 等. 羟基红花黄色素A对缺血性脑卒中神经保护作用及机制的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(10): 773-778.

(收稿日期:2022-08-14,修回日期:2022-09-21)

◇编读往来◇

《安徽医药》杂志关于书写论文作者单位名称的要求

单位名称书写不规范,将影响编辑部与作者、读者与作者之间的联系及文稿发表后文献计量学的统计等工作。为此,本刊就作者单位名称的书写要求如下:(1)作者在投稿时,应列出单位名称的全称,具体到所在科室,并且写明单位所在城市名及邮编。(2)单位的英文名称应根据所在单位统一的英文名称书写。(3)“论文投送介绍信及授权书”的公章内容,须与文稿中所书写的单位名称一致。(4)由不同单位共同撰写的文稿,各个单位的名称均须分别列出,由论文的资料提供单位(一般即为第一作者所在单位)开具“论文投送介绍信及授权书”。(5)如文稿作者为集体作者,英文摘要的作者项中,应列出本文稿第一整理者(即第一执笔者)的姓名及工作单位。(6)通信作者必须注明性别、职称、研究方向和电子信箱(Email)。