

高效液相色谱法测定妇科千金胶囊中 芒柄花素含量的价值

周曙光, 潘洪平

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院药学部(周曙光), 《中国临床新医学》杂志编辑部(潘洪平)
作者简介: 周曙光(1984-), 女, 医学硕士, 主管药师, 研究方向: 医院药学。E-mail: 25469230@qq.com
通讯作者: 潘洪平(1968-), 男, 医学博士, 主任药师, 研究方向: 临床药学和医学期刊编辑学。E-mail: php88@126.com

[摘要] **目的** 建立测定妇科千金胶囊中芒柄花素含量的方法。**方法** 采用高效液相色谱法, 以 70% 甲醇溶液提取芒柄花素, 流动相采用乙腈-水(45:55), 检测波长为 254 nm。**结果** 在 3.042~7.098 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的浓度范围内芒柄花素的进样量与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$), 回收率为 98.4%, 相对标准偏差(RSD)3.03% ($n=5$)。**结论** 该测定方法准确、快速、简便, 可对妇科千金胶囊进行质量控制。

[关键词] 妇科千金胶囊; 芒柄花素; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R 917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)11-1059-03
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.11.10

Quantitative determination of formononetin in Fukeqianjin capsules ZHOU Shu-guang, PAN Hong-ping. Department of Pharmacy, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To establish a method of quantitative determination of formononetin in Fukeqianjin capsules. **Methods** Formononetin was extracted by 70% methanol solution and the content of formononetin in Fukeqianjin capsules was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). N2000 chromatographic work station was used with the mobile phase of acetonitrile-water (45:55) and the UV detecting wavelength being at 254 nm. **Results** Within the scope of the concentration of formononetin from 3.042 to 7.098 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, the amount of samples and its peak areas had a good linear relationship ($r=0.999\ 9$), with a recovery rate of 98.4% and a relative standard deviation (RSD) of 3.03% ($n=5$). **Conclusion** The method is accurate, simple and fast, and suitable for the quality control of Fukeqianjin capsules.

[Key words] Fukeqianjin capsules; Formononetin; Content determination; High-performance liquid chromatography (HPLC)

妇科千金胶囊的处方主要由鸡血藤、党参、金樱根、功劳木、单面针、穿心莲、千斤拔、当归等 8 味中药材组成, 具有益气、化瘀、清热、除湿等功效^[1]。其中鸡血藤通过舒筋活血起着君药的作用^[2]。妇科千金胶囊的现版质量标准未对鸡血藤主要有效成分芒柄花素进行定量和控制, 本文建立该制剂中芒柄花素的含量测定方法, 为建立妇科千金胶囊有效成分含量检测标准提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters515 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司产品), N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所研制), BP211D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司生产)。

1.2 药品与试剂 妇科千金胶囊(0.4 g/粒, 湖南千金药业有限公司生产, 批号 20140901、20150518、20160522), 芒柄花素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111703-201601), 乙腈(色谱纯)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(45:55); 检测波长为 254 nm; 流量为 1.0 ml · min⁻¹; 灵敏度为 AUFS 1.000; 进样量为 10 μl ; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 理论板数不低于 4 000(以芒柄花素色谱峰计算)。

1.3.2 对照品溶液制备 精密称定 5.07 mg 芒柄花素对照品, 以甲醇溶解制得 50.70 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的对照品储备液, 取 10 ml 对照品储备液加入甲醇制得

5. 07 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的对照品溶液。

1. 3. 3 供试品溶液制备 精密称定 4. 8 g 样品, 以 70% 的甲醇溶液提取, 过滤后置于 25 ml 的容量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 充分摇匀, 滤过即得供试品溶液。

1. 3. 4 阴性对照液制备 按处方用量称取各药材鸡血藤除外, 按照处方比例和制备工艺制得缺鸡血藤的阴性制剂, 再按 1. 3. 3 项下规定进行操作即制

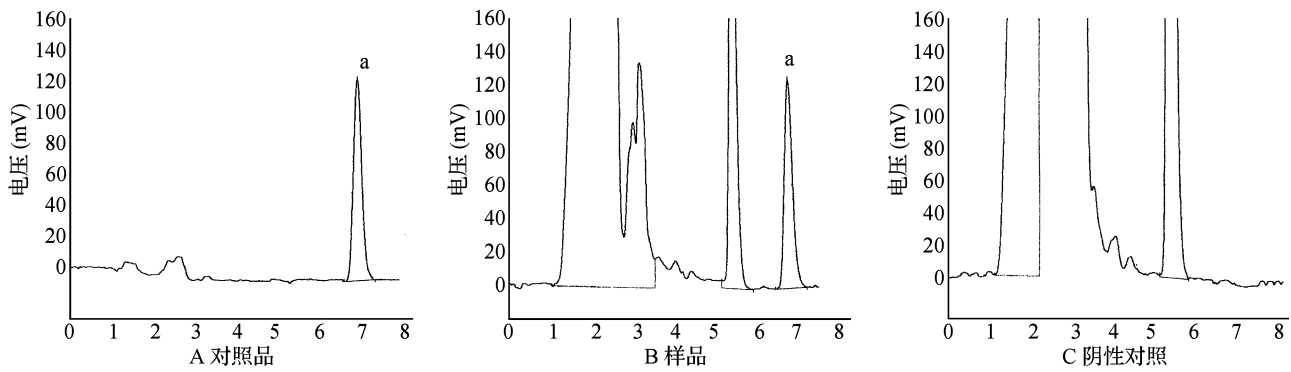


图 1 高效液相色谱图(a: 芒柄花素色谱峰)

2. 2 线性关系考察结果 精密吸取芒柄花素对照品储备液各 0. 6、0. 8、1. 0、1. 2、1. 4 ml, 分别放置 10 ml 的容量瓶中稀释后得到系列对照品溶液, 各进样 10 μl , 按照 1. 3. 1 项下规定的色谱条件测定峰面积, 以进样量为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y)行线性回归分析, 得到回归方程: $Y = 14132937. 445X - 8918. 011$, $r = 0. 999\ 9$ ($n = 5$), 线性关系考察的结果表明, 在 3. 042 ~ 7. 098 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的浓度范围芒柄花素的进样量与其峰面积呈良好的线性关系。

2. 3 精密度试验结果 精密吸取 10 μl 芒柄花素对照品溶液, 按 1. 3. 1 项下规定的色谱条件连续进样 5 次, 测定各次的峰面积, 结果峰面积的相对标准偏差 (RSD) = 0. 53% ($n = 5$), 结果提示仪器精密度符合要求。

2. 4 重复性试验结果 取同批号 (20160522) 的样品共 5 份, 按照 1. 3. 1 项下规定的色谱条件对芒柄花素进行测定, 平均含量为 22. 02 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{RSD} = 1. 85\%$, 提示该方法重复性好。

2. 5 加样回收率试验结果 对已知含量的样品进行适量采样, 共 5 份, 精密称定, 并精密加入对照品溶液, 按照 1. 3. 3 项下规定的供试液制备方法配置成样品溶液, 按 1. 3. 1 项下规定的色谱条件进行依次进样和测定, 结果见表 1。

2. 6 样品含量测定结果 取三批样品 (批号 2014-0901、20150518、20160522), 各平行取三份样品依法处理后测定其平均含量, 结果分别为 19. 06 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、

得阴性对照液。

2 结果

2. 1 系统适应性试验结果 吸取供试品溶液和芒柄花素对照品溶液注入高效液相色谱仪, 按照 1. 3. 1 项下规定的色谱条件进行色谱分析, 结果芒柄花素的出峰时间为 6. 9 min, 峰形尖锐、对称、陡峭, 无明显杂质峰干扰。见图 1。

22. 02 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、21. 08 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 5$)

序 号	样品中含量 (μg)	对照品加入量 (μg)	测得总量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	16. 36	5. 05	21. 22	96. 2	98. 4	3. 03
2	15. 77	5. 05	20. 68	97. 2		
3	16. 91	5. 05	21. 75	95. 8		
4	15. 55	5. 05	20. 61	100. 2		
5	15. 34	5. 05	20. 53	102. 8		

3 讨论

3. 1 检测原理 物质分子和原子吸收入射光中特定波长的光能量后发生分子振动、能级跃迁和电子能级跃迁形成物质吸收光谱; 不同物质分子和原子分布的空间结构各异, 其吸收光能量的差异形成物质特有和固定的吸收光谱。根据待测物质吸收光谱上某些特定波长入射后所形成的吸光度值的大小可以定量分析其含量。色谱定量分析是依据待测试样中各组分检测响应讯号的大小来定量确定试样中各组分的相对含量, 即依据每个组分的量 (体积或重量) 与色谱检测器所产生检测的响应值 (峰面积或峰高) 成正比来计算试样中各组分的含量^[3]。

3. 2 检测波长的确定 具有多个波长的光源通过分光光度计的一系列分光装置后变成特定波长的光源。当光线透过测试样品后部分被吸收形成了测试品的吸光度值, 经计算后可转化为样品的浓度值^[4]。已有文献报道有关芒柄花素含量测定的方法学研究^[5~7], 其检测波长范围为 248 ~ 260 nm^[8~11]。本

研究将对照品溶液置于 200 ~ 300 nm 的波长范围进行扫描,结果发现芒柄花素在 254 nm 波长处出现最大吸收峰,说明 254 nm 为其最佳检测波长,因此选择了 254 nm 为芒柄花素的检测波长。

3.3 色谱柱的选择 色谱柱的选择原则是依据“相似相溶”原理^[12],一般可根据待分离组分的极性大小来选择合适的色谱柱。待分离组分的极性很小时选择非极性色谱柱(如 C₁₈ 色谱柱),对于极性较大的待分离组分则选择极性色谱柱(如氨基柱、氰基柱等)。芒柄花素为黄酮类有机弱极性小分子化合物^[13](化学式 C₁₆H₁₂O₄,分子量 268.26),故选择 Kromasil C₁₈ 色谱柱。

3.4 流动相的选择 高效液相色谱仪流动相选择的原则^[14]:一个理想的高效液相色谱流动相溶剂应具有低黏度、对样品的溶解度要适宜、与检测器匹配兼容性好、不改变填料的任何性质、易得到纯品、易回收和低毒性等特点。一般首选二相(有机相 + 非有机相)如乙腈 + 水或甲醇 + 水,有时还可能选择三相或四相,适当加酸加盐以改善分离效果。流动相的选择方法:(1)从强至弱。先以 90% 浓度的甲醇或乙腈/水(或缓冲液)作流动相试验可快速分离试样得到检测结果,再根据出峰情况适当改变上述流动相的比例。(2)三倍规则。有机溶剂(甲醇、乙腈等)每降低 10%,保留因子随之升高 3 倍,其关键点是调整过程中仔细分析各色谱峰的分离效果。(3)微调阶段。当达到一定分离效果后,把上述有机溶剂从 10% 的一次调整量变为 5% 的一次调整量,根据分离效果再逐步减少上述溶剂的调整率,以最终达到各组分的分离效果不再改变为止。本研究分别试验了甲醇-水、甲醇 - 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸、乙腈 - 1.0% 冰醋酸、乙腈-水等系统,结果提示乙腈-水(45:55)为最理想的条件,该条件下芒柄花素能与其他成分较好地分离,且峰形尖、较对称、不拖尾、

无阴性干扰。

综上所述,本检测方法简单、准确、重复性好、易于操作,是适合应用于妇科千金胶囊的质量控制方法。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准(修订)颁布件—妇科千金胶囊[J]. 中国药品标准,2012,13(3):223-225.
- 2 江苏新医学院主编. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1995:1206-1208.
- 3 Shurubor YI, D'Aurelio M, Clark-Matott J, et al. Determination of Coenzyme A and Acetyl-Coenzyme A in Biological Samples Using HPLC with UV Detection[J]. Molecules,2017,22(9):E1388.
- 4 Mochizuki K, Takayama K. Prediction of color changes using the time-temperature superposition principle in liquid formulations[J]. Chem Pharm Bull(Tokyo),2014,62(12):1225-1230.
- 5 刘逸,陆琳,黄瑞松. 瑶药鸭仔风中芒柄花素 HPLC 测定方法的建立[J]. 广西医科大学学报,2014,31(4):699-702.
- 6 金连峰,顾炜,冯敏,等. HPLC 法同时测定新止骨增生丸中麦角甾昔、柚皮昔和芒柄花素的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(5):366-369.
- 7 孙玉平,龚苏晓,曹煌,等. 不同加工方法的蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素定量分析[J]. 中草药,2015,46(11):1678-1681.
- 8 郭希庆. 鸡血藤糖浆中芒柄花素含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2013,24(11):2657-2658.
- 9 陈业光,黄梦娴. 高效液相色谱法测定安神养血口服液中药芒柄花素含量[J]. 中国药业,2014,23(6):38-39.
- 10 黄莉,张洪,李华荣. RP-HPLC 法测定鸡血藤合剂中芒柄花素的含量[J]. 中医药导报,2013,19(9):79-80.
- 11 陈红英,严萍,张敏,等. 不同产地鸡血藤药材高效液相指纹图谱及芒柄花素含量分析[J]. 广州中医药大学学报,2015,32(5):923-936.
- 12 刘亮,陈东林,丁丽娜,等. 相似相溶原理在中药化学技术中的应用[J]. 职业技术,2016,15(12):60-62.
- 13 代丽萍,刘孟奇,石任兵. HPLC 测定茛菪方有效部位中芒柄花素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):109-111.
- 14 孙毓庆,胡育筑,主编. 液相色谱溶剂系统的选择与优化[M]. 北京:化学工业出版社,2008:196.

[收稿日期 2017-08-31][本文编辑 杨光和]

《中国临床新医学》杂志编辑部启事

为了加强与市、县医疗单位的交流与合作,提高广大业务技术人员医学论文的写作水平,《中国临床新医学》杂志编辑部的有关专家将分期分批赴各市、县医疗卫生单位进行“医学论文写作”、“医学文献检索”和“医学统计学应用”等有关方面的学术讲课。各医疗卫生单位如有这方面的需求,敬请与编辑部联系。联系电话:0771-2186013。

• 本刊编辑部 •