

双波长HPLC法同时测定安乳散结丸中芍药苷与迷迭香酸的含量

王新娣*, 石晓峰#, 沈薇(甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050)

中图分类号 R283.64;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1795-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.24

摘要 目的:建立同时测定安乳散结丸中芍药苷与迷迭香酸含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水(20:80, V/V),检测波长为230 nm(芍药苷)和330 nm(迷迭香酸),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃。结果:芍药苷与迷迭香酸的质量浓度分别在4.20~42.00、4.10~41.00 ng/μl范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 均为0.999 9);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均<2%;平均加样回收率分别为98.82%和97.80%,RSD分别为1.90%和1.23%(n 均为9)。结论:本方法操作简便、结果可靠、重复性好,可用于安乳散结丸的质量控制。

关键词 安乳散结丸;芍药苷;迷迭香酸;含量测定;双波长高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Paeoniflorin and Rosmarinic Acid in Anru Sanjie Pill by Dual-wavelength HPLC

WANG Xin-di, SHI Xiao-feng, SHEN Wei(Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin and rosmarinic acid in Anru sanjie pill. METHODS: The dual-wavelength HPLC was adopted. The analytical column was Agilent Eclipse plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphonic acid (20:80, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 230 nm for paeoniflorin and 330 nm for rosmarinic acid. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of paeoniflorin and rosmarinic acid were 4.20-42.00 ng/μl and 4.10-41.00 ng/μl($r=0.999 9$). RSDs of precision test, reproducibility test and stability test were all lower than 2%. The average recoveries were 98.82% and 97.80%, and RSD were 1.90% and 1.23% ($n=9$), respectively. CONCLUSION: The method is simple, reliable and has good repeatability. It can be used for quality control of the product.

KEY WORDS Anru sanjie pill; Paeoniflorin; Rosmarinic acid; Content determination; Dual-wavelength HPLC

安乳散结丸是由柴胡、丹参、白芍、夏枯草、牡丹皮等13味中药材制成的水丸,具有疏肝解郁、化痰散结之功效,临床上主要用于乳腺炎、乳腺增生的治疗。在安乳散结丸处方中,白芍和牡丹皮共有的活性成分芍药苷具有多种生物作用,如抗菌消炎、调节免疫功能等^[1];夏枯草和丹参共有的活性成分迷迭香酸具有抗炎、抗氧化、免疫抑制、抗癌、抗血栓和抗血小板聚集等作用^[2]。为有效控制该制剂的内在质量,本试验采用双波长高效液相色谱(HPLC)法建立了同时测定消乳散结丸中

芍药苷和迷迭香酸含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪(美国Agilent公司);AE 260型万分之一电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);CP 225型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);SK3310HLC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

比例,既能最大增加延胡索中延胡索乙素的溶出,又能使毒性降到最小,这有待进一步的实验探讨。

参考文献

- [1] 于晓佳.金铃子散两种透皮贴剂新制剂的研究[D].天津:天津大学,2005.
- [2] 张玲,李涛,李秀娟,等. HPLC法测定元胡及配伍药对中原胡索乙素的含量[J].兰州大学学报,2007,33(2):50.

- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:130.
- [4] 陈德利,马霖,曹玉,等.HPLC法测定蒲元胃康胶囊中延胡索乙素的含量[J].中国药房,2009,20(9):690.
- [5] 林力,刘建勋,张颖,等.组分配伍对延胡索总生物碱中主要成分体外吸收的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):203.
- [6] 程蕾,雷勇,梁媛媛,等.川楝子不同提取部位药效及毒性的比较研究[J].中药材,2007,30(10):1 276.
- [7] 齐双岩,金若敏,周志兰,等.川楝子对大鼠肝毒性的时效和量效关系研究[J].毒理学杂志,2007,21(4):301.

(收稿日期:2012-08-02 修回日期:2013-02-22)

* 实习研究员,硕士。研究方向:天然产物分离分析。电话:0931-2614521-6110。E-mail:wxdi07@163.com

通信作者:主任药师,教授。研究方向:天然药物化学与中药质量标准。电话:0931-2615440。E-mail:shixiaofeng2005@sina.com

安乳散结丸(甘肃省医学科学研究所药物研究所,批号:20111201,20111202,20111203,20111204,20111205,20111206);芍药苷、迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号分别为110736-200424、111871-201102);乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别精密称取芍药苷、迷迭香酸对照品各适量,置于10 ml量瓶中,以甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成芍药苷、迷迭香酸的质量浓度分别为4.2、4.1 mg/ml的对照品贮备液。分别精密量取2种对照品贮备液1.0 ml,置于同一10 ml量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每1 ml含芍药苷0.42 mg和迷迭香酸0.41 mg的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取安乳散结丸适量,研细,精密称取1.0 g,加入60%乙醇30 ml,精密称质量,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz)1 h,静置放冷,再次精密称质量,以60%乙醇补足失质量,摇匀,离心,精密量取上清液5 ml,置10 ml量瓶中,以60%乙醇定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.3 阴性对照溶液 按安乳散结丸的制备工艺分别制备不含牡丹皮、白芍与不含夏枯草、丹参的阴性样品,再按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Eclipse plus C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水(20:80,V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm(芍药苷)、330 nm(迷迭香酸);柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各20 μl,注入HPLC仪,按上述色谱条件进行测定。结果,供试品中芍药苷、迷迭香酸与相邻色谱峰的分离度均>1.5,理论板数按芍药苷峰计算应不低于5 000。色谱见图1。

2.3 线性关系考察

依次精密量取混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,配制系列标准溶液。分别进样20 μl,以对照品的质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得芍药苷、迷迭香酸的回归方程分别为 $y=25.556 50x-4.521 60$ ($r=0.999 9, n=6$)、 $y=62.670 59x-11.749 83$ ($r=0.999 9, n=6$)。结果表明,芍药苷、迷迭香酸的质量浓度分别在4.20~42.00、4.10~41.00 ng/μl范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液20 μl,按上述色谱条件重复进样5次,测定峰面积。结果,芍药苷、迷迭香酸的RSD分别为0.99%、0.91%(n 均为5),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h进样20 μl,按

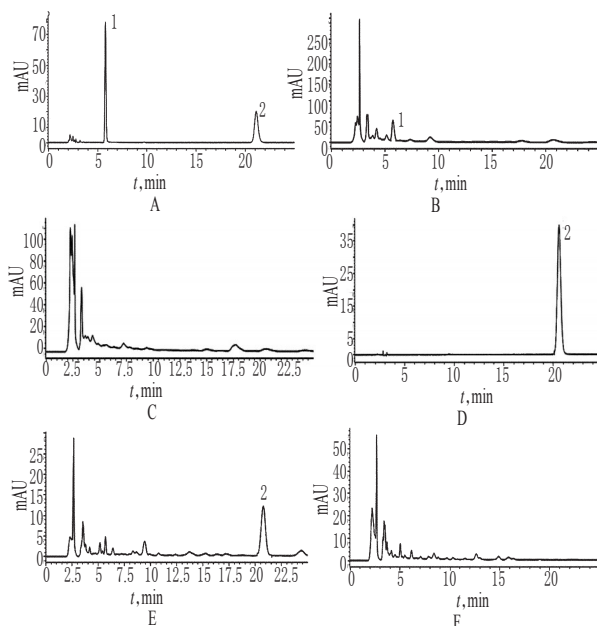


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品(230 nm);B.供试品(230 nm);C.缺牡丹皮和白芍的阴性对照(230 nm);D.混合对照品(330 nm);E.供试品(330 nm);F.缺丹参和夏枯草的阴性对照(330 nm);1.芍药苷;2.迷迭香酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control (230 nm); B. test sample (230 nm); C. negative sample without *Paeonia suffruticosa* and *Paeonia lactiflora* (230 nm); D. mixed control (330 nm); E. test sample (330 nm); F. negative sample without *Salvia miltiorrhiza* and *Prunella vulgaris* (330 nm); 1. paeoniflorin; 2. rosmarinic acid

上述色谱条件测定峰面积。结果,芍药苷、迷迭香酸的RSD分别为1.84%、1.05%(n 均为6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批安乳散结丸(批号:20111202)粉末1.0 g,按“2.1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,照上述色谱条件进样测定。结果,每1 g样品中平均含芍药苷、迷迭香酸0.801 2、0.431 4 mg,RSD分别为1.46%、1.59%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取芍药苷、迷迭香酸对照品各适量,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制备成每1 ml含芍药苷0.81 mg、迷迭香酸0.44 mg的混合对照品溶液。精密称取已知含量的同一批样品(批号:20111202)粉末9份,每份1.0 g,每3份为一组,分别加入上述对照品溶液0.8、1.0、1.2 ml,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,计算样品含量与加样回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定

精密称取6批安乳散结丸各适量,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,各3份,按拟定的含量测定方法测定样品中芍药苷与迷迭香酸的含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
芍药苷	0.801 4	0.648 0	1.455 6	100.96		
	0.801 6	0.648 0	1.447 2	99.62		
	0.801 4	0.648 0	1.441 1	98.71		
	0.801 5	0.810 0	1.614 5	100.37		
	0.801 2	0.810 0	1.599 6	98.56	98.82	1.90
	0.801 3	0.810 0	1.609 8	99.81		
	0.801 2	0.972 0	1.726 7	95.21		
	0.801 6	0.972 0	1.737 8	96.31		
	0.801 4	0.972 0	1.771 6	99.81		
	迷迭香酸	0.431 5	0.352 0	0.772 6	96.90	
0.431 6		0.352 0	0.774 6	97.44		
0.431 5		0.352 0	0.775 9	97.84		
0.431 5		0.440 0	0.855 1	96.36		
0.431 4		0.440 0	0.867 3	99.06	97.80	1.23
0.431 4		0.440 0	0.870 2	99.73		
0.431 5		0.528 0	0.953 7	98.90		
0.431 6		0.528 0	0.939 1	96.17		
0.431 5		0.528 0	0.948 0	97.82		

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

批号	芍药苷		迷迭香酸	
	平均含量,mg/g	RSD,%	平均含量,mg/g	RSD,%
20111201	0.758 6	1.87	0.368 1	0.60
20111202	0.804 1	1.98	0.431 4	1.84
20111203	0.766 8	1.91	0.365 0	1.51
20111204	0.786 8	1.76	0.428 4	1.34
20111205	0.750 1	1.57	0.368 6	0.90
20111206	0.797 8	1.85	0.426 3	1.25

取混合对照品溶液适量,采用紫外分光光度法对其进行全波长扫描,发现芍药苷在230 nm波长处有最大吸收,而迷迭香酸在230 nm和330 nm波长处均有吸收峰,后者明显为最大吸收峰。鉴于此,本试验选择了在230 nm波长处测定芍药苷、330 nm波长处测定迷迭香酸的双波长HPLC法。

3.2 流动相的选择

本试验考察了不同流动相[甲醇-0.1%甲酸溶液(40:60,

V/V)、甲醇-0.1%甲酸溶液(25:75,V/V)、乙腈-水(18:82,V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(12:82,V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80,V/V)]的分离效果。结果表明,在乙腈-水流动相体系中加入磷酸可以明显改善峰形,且使分离度好,故最终选用乙腈-0.1%磷酸水(20:80,V/V)作为流动相。

3.3 提取溶剂的选择

2010年版《中国药典》白芍项下用稀乙醇提取药材中的芍药苷^[3],而文献报道^[4]夏枯草中迷迭香酸以乙醇为溶剂进行提取,为此本试验对不同质量分数的乙醇作为提取溶剂的提取率进行了考察。结果发现,以60%乙醇作为提取溶剂时,样品中迷迭香酸和芍药苷的提取率均很高,而30%乙醇提取的样品黏度较大无法过滤,因此选择60%乙醇作为样品提取溶剂。

3.4 小结

在中药制剂中分别对芍药苷和迷迭香酸进行含量测定的方法已有文献报道^[5-6]。本试验采用双波长HPLC法方便、快速地对安乳散结丸中芍药苷和迷迭香酸2种有效成分同时进行测定,此法可更全面地控制该制剂的质量,也满足了中药多成分质量控制的要求。

参考文献

- [1] 华东,吴明媛,于晓红,等.赤芍总皂苷对荷瘤鼠细胞免疫功能的影响[J].中医药学报,2004,32(1):47.
- [2] 周丹,刘艾林,杜冠华.迷迭香酸的药理学研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(7):594.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:96.
- [4] 刘伟,丁海杰.HPLC测定夏枯草中熊果酸、齐墩果酸、迷迭香酸的含量[J].中成药,2008,30(4):577.
- [5] 宋宗华,文屏,焦健.RP-HPLC法测定三九胃泰颗粒中芍药苷的含量[J].中国药房,2011,22(44):4210.
- [6] 张丽丽,敬应春,彭崇胜.HPLC法测定不同产地傣药肾茶中的迷迭香酸[J].中成药,2011,33(8):1378.

(收稿日期:2012-06-05 修回日期:2012-08-27)

2013中国-东盟传统医药高峰论坛和第五届中国(玉林)中医药博览会在广西玉林举行

本刊讯 2013年4月12日,“2013中国-东盟传统医药高峰论坛和第五届中国(玉林)中医药博览会”在广西玉林举行。国家中医药管理局局长王国强,广西壮族自治区副主席李康,国家中医药管理局副局长于文明,东盟副秘书长艾丽西娅·巴拉,越南卫生部副部长阮氏川,老挝卫生部副部长宝康·赛哈翁,缅甸卫生部副部长温敏,以及柬埔寨、印尼、马来西亚、新加坡、泰国等东盟国家传统医学管理部门领导等出席了论坛并参观了中医药博览会展区。

高峰论坛以“健康·发展·合作·共赢”为主题,包括开幕式、政府论坛、分题论坛、专题展览、体验活动以及洽谈签约等内容。于文明主持了高峰论坛开幕式,王国强在开幕式上致

辞,并就促进中国·东盟传统医药交流与合作提出以下建议:第一,加强中国-东盟传统医学合作平台建设;第二,大力发展中国-东盟中医药服务贸易;第三,深入开展传统医学人才交流与培训。

“2013中国-东盟传统医药高峰论坛”政府论坛,由中方和各方嘉宾共同主持,包括东盟国家、港澳地区以及中国大陆在内的代表就传统医药区域合作和发展进行了主题演讲和讨论。4个主题分论坛与政府论坛同时进行,与会专家分别在“传统药材资源保护与利用”、“传统医疗保健、养生长寿和休闲旅游协调发展”、“传统医药人力资源培养”、“民族医药国际交流与合作”等领域进行了交流与研讨。