

HPLC法同时测定参芍胃安颗粒中芍药苷和黄芩苷的含量^Δ

朱冠华*, 顾圣莹, 康 雷, 杨秋娅, 王玉珠, 李晓宇, 刘皋林[#](上海交通大学附属第一人民医院, 上海 200080)

中图分类号 R283.627;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2533-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.12

摘要 目的:建立同时测定参芍胃安颗粒中芍药苷、黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.2%乙酸溶液-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为244 nm,柱温为30 ℃。结果:芍药苷和黄芩苷的质量浓度分别在20~400、12.5~250 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*均为0.999 9);平均加样回收率分别为97.27%、98.34%,RSD分别为1.34%、0.64%(*n*均为6)。3批样品中芍药苷、黄芩苷的平均含量均分别不低于1.0 mg/g和2.0 mg/g。结论:该方法简便、快速、准确、灵敏度高、专属性强,可用于参芍胃安颗粒的质量控制。

关键词 参芍胃安颗粒;芍药苷;黄芩苷;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of Peoniflorin and Baicalin in Shenshao Weian Granules by HPLC

ZHU Guan-hua, GU Sheng-ying, KANG Lei, YANG Qiu-ya, WANG Yu-zhu, LI Xiao-yu, LIU Gao-lin (The Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of peoniflorin and baicalin in Shenshao weian granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetic acid solution-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 244 nm and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges were 20-400 μg/ml for peoniflorin and 12.5-250 μg/ml for baicalin (both *r*=0.999 9). Average recoveries of them were 97.27% (RSD=1.34%, *n*=6) and 98.34% (RSD=0.64%, *n*=6). The average contents of them were not less than 1.0 mg/g and 2.0 mg/g in 3 batches of samples. CONCLUSIONS: The method is proved to be simple, rapid, accurate, sensitive and specific, and can be used for the quality control of Shenshao weian granules.

KEYWORDS Shenshao weian granules; Paeoniflorin; Baicalin; HPLC; Content determination

参芍胃安颗粒是我院经多年研究制成的中药复方制剂(批准文号:沪药制字Z05050787),由赤芍、白芍、黄芩、太子参等11味中药组成,具有配伍寒热并用、消补合参、温和同施、调和气血、益气活血的功效,临床上用于治疗慢性萎缩性胃炎,取得了良好的疗效^[1]。赤芍、白芍、黄芩是参芍胃安颗粒的主药。为了更好地控制该制剂质量,笔者建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定主药中有效成分芍药苷和黄芩苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD型HPLC仪,包括CBM-20A系统控制器、DGU-20A3真空脱气机、LC-20AD溶液传输单元、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、SPD-M20A检测器、LC solution工作站(日本岛津公司);B25000S-MT型台式超声清洗机(美国Branson公司);G-560E型涡旋振荡器(德国Scientific Industries

公司);Centrifuge5417C型高速离心机(德国Eppendorf公司);AL-104型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);SC-276型低温冰箱(海尔集团)。

1.2 药品与试剂

参芍胃安颗粒(上海交通大学附属第一人民医院制剂,委托上海练塘药业有限公司生产,规格:15 g/袋,批号:20120301、20120701、20121201);芍药苷、黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-201136、110715-201117);甲醇、乙酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2%乙酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~10 min, 35% B; >10~15 min, 35%→50% B; >15~25 min, 50% B);流速:1.0 ml/min;测定波长:244 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品贮备液 精密称取真空干燥至恒质量的芍药苷、黄芩苷对照品各适量,置于同一10 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,涡旋混匀,制成芍药苷、黄芩苷质量浓度分别为0.40、0.25 mg/ml的混合对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液 取本品1袋,研成细粉,精密称定0.5 g,置

^Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项子课题(No. 2011ZX09302-007-02);上海市科委科研项目课题(No.09dZ1974600)

* 药师, 硕士。研究方向:医院药学。电话:021-37798731。E-mail:zghlxqx@163.com

通信作者:教授,主任药师,博士研究生导师,博士。研究方向:临床药理学。电话:021-63240090-4408。E-mail:gaolinliu@aliyun.com

具塞锥形瓶中,加入60%甲醇15 ml,称定质量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理15 min,放冷,再次称定质量,用60%甲醇补足减失的质量,混匀后取适量经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方工艺制备不含赤芍、白芍、黄芩的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取阴性对照溶液、混合对照品贮备液和供试品溶液各10 μl,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果表明,供试品色谱中,芍药苷、黄芩苷的保留时间分别为7.5、21.0 min,与对照品的保留时间一致;阴性对照溶液在该色谱条件下对供试品测定无干扰;各峰分离度良好。色谱见图1。

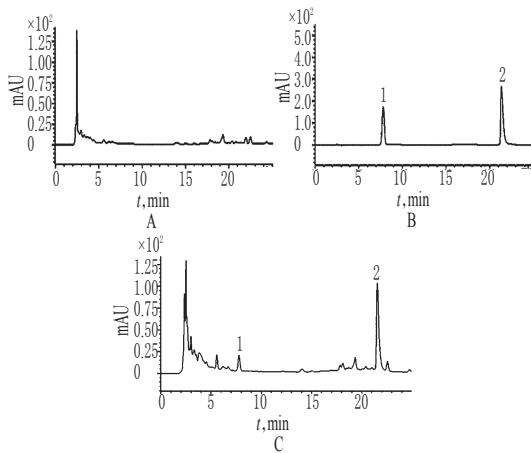


图1 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 混合对照品; C. 供试品; 1. 芍药苷; 2. 黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative control; B. mixed control; C. test sample; 1. paeoniflorin; 2. baicalin

2.4 线性关系考察

分别精密量取混合对照品贮备液0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,制得系列混合对照品溶液。取各溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)对峰面积积分值(y)进行线性回归,得芍药苷、黄芩苷的回归方程分别为 $y=8\ 091.069x+24\ 175.64$ ($r=0.999\ 9, n=6$)、 $y=22\ 205.58x+33\ 687.83$ ($r=0.999\ 9, n=6$)。结果表明,芍药苷和黄芩苷的质量浓度分别在20~400、12.5~250 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取混合对照品贮备液,在上述色谱条件下连续重复进样6次,每次10 μl,记录峰面积。结果,芍药苷和黄芩苷的RSD分别为0.16%、0.05% (n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品(批号:20120701)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,每次10 μl,记录峰面积。结果,样品中芍药苷和黄芩苷的平均含量分别为1.063、2.051 mg/g, RSD分别为0.54%、1.26% (n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,室温下放置,分别于0、2、4、8、

12、24 h在上述色谱条件下进样10 μl,记录峰面积。结果,芍药苷和黄芩苷的RSD分别为0.57%、0.64% (n 均为6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知芍药苷和黄芩苷含量的同一批样品适量,共6份,分别加入一定量的芍药苷对照品和黄芩苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样10 μl,记录峰面积,计算加样回收率,结果分别见表1、表2。

表1 芍药苷的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test of paeoniflorin ($n=6$)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
0.555 4	0.503 0	1.044 3	97.20		
0.556 0	0.503 0	1.041 0	96.42		
0.556 2	0.503 0	1.046 8	97.53	97.27	1.34
0.554 4	0.503 0	1.049 7	98.47		
0.554 8	0.503 0	1.051 4	98.73		
0.555 3	0.503 0	1.034 4	95.25		

表2 黄芩苷的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery test of baicalin ($n=6$)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1.080 2	1.001 5	2.074 0	99.23		
1.081 5	1.001 5	2.070 3	98.73		
1.081 7	1.001 5	2.060 4	97.72	98.34	0.64
1.078 2	1.001 5	2.065 6	98.59		
1.079 1	1.001 5	2.062 7	98.21		
1.080 0	1.001 5	2.057 2	97.57		

2.9 样品含量测定

取3批参芩胃安颗粒各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中芍药苷和黄芩苷的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Content determination of samples ($n=3$)

批号	芍药苷,mg/g	黄芩苷,mg/g
20120301	1.107	2.153
20120701	1.063	2.051
20121201	1.037	2.092

3 讨论

本试验选择了参芩胃安颗粒中起药效作用的两个主要苷类成分作为测定指标,其中黄芩苷极性小,并具有一定的脂溶性,而芍药苷极性较大,且受热不稳定,故采用超声提取法,避免了加热回流提取和煎煮提取由于过高的温度对样品中芍药苷的破坏,且该方法操作简单,便于操作^[2]。

本试验对提取溶剂(甲醇、80%甲醇、60%甲醇、30%甲醇、超纯水)和超声提取时间(15、30、45 min)进行了筛选优化。结果发现,以60%甲醇为提取溶剂超声提取15 min,所得芍药苷和黄芩苷总含量最高,故选其作为提取条件。

根据芍药苷和黄芩苷的二极管阵列全光谱扫描结果和文献资料显示,二者最佳吸收波长分别为230 nm和280 nm^[3-5]。由于芍药苷在本方中含量较少,除在230 nm和末端波长处有紫外吸收外,其他地方吸收较少。经过试验,笔者发现在244 nm波长处芍药苷和黄芩苷都有吸收且共同吸收最大,同时还可以排除杂质干扰,故选择244 nm为检测波长。

本试验对多种流动相进行了筛选^[6-9]。结果表明,在用0.2%乙酸溶液-甲醇进行梯度洗脱时,可以改善黄芩苷的拖尾现象和峰形,色谱峰基线分离效果好。

泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的HPLC指纹图谱比较^Δ

林文津*, 徐榕青, 张亚敏, 李主泉, 张园秀 (福建省医学科学研究院/福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2535-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.13

摘要 目的:建立并比较泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的高效液相色谱指纹图谱。方法:色谱柱为Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(80:20, V/V),检测波长为208 nm,流速为0.4 ml/min。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对10批样品的相似度进行评价。结果:泽泻醇提取物指纹图谱的共有峰有13个,最大峰为14号峰;泽泻超临界CO₂萃取物指纹图谱的共有峰有16个,最大峰为12号峰(23-乙酰泽泻醇B)。10批样品的相似度均>0.900。结论:该方法稳定性、精密性、重复性较好,可为泽泻醇提取物与超临界CO₂萃取物的鉴别及质量控制提供依据。

关键词 泽泻;醇提取物;超临界CO₂萃取物;高效液相色谱法;指纹图谱

Comparison of HPLC Fingerprints of Ethanol Extract Versus Supercritical CO₂ Extract from *Alisma orientalis*
LIN Wen-jin, XU Rong-qing, ZHANG Ya-min, LI Zhu-quan, ZHANG Yuan-xiu (Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Medical Measurement, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop and compare HPLC fingerprints of ethanol extract vs. supercritical CO₂ extract from *Alisma orientalis*. METHODS: The separation was performed on Inertsil ODS-SP column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase composed of acetonitrile-water (80:20, V/V) at flow rate of 0.4 ml/min. The detection wavelength was set at 208 nm. The similarity of 10 batches of samples was evaluated by using *TCM Fingerprints Similarity Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: There were 13 common peaks in fingerprints of ethanol extract from *A. orientalis*, and the largest peak in the fingerprint was No.14; there were 16 common peak in the fingerprints of supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*, and the largest peak in the fingerprint was No.12 (which identified as 23-acetate alisol B). The similarity of 10 batches of samples was more than 0.900. CONCLUSIONS: The method is stable, accurate and reproducible, which provide reference for the identification and quality control of ethanol extract vs. supercritical CO₂ extract from *A. orientalis*.

KEYWORDS *Alisma orientalis*; Ethanol extract; Supercritical CO₂ extract; HPLC; Fingerprint

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎,性寒,味甘、淡,入肾、膀胱经,具有利水渗湿、泄热、

化浊降脂的功效,临床用于治疗小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、痰饮眩晕、热淋涩痛、高脂血症^[1]。现代医学研究表明,泽

综上所述,采用HPLC法同时测定参芎胃安颗粒中芍药苷和黄芩苷的含量,既比分开测定缩短了分析时间,提高了工作效率,还节约了流动相,减少了污染。本方法简便、快速、准确、灵敏度高、专属性强,可用于参芎胃安颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 王松坡,张存钧,蒋勇,等.“萎胃安”对慢性萎缩性胃炎PCNA、P21ras表达的影响[J].上海中医药杂志,2006,40(9):35.
- [2] 李向阳,屠万倩,张留记.RP-HPLC法测定不同产地的牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J].中药新药与临床药理,2011,22(5):563.
- [3] 凌明,马安宇.HPLC测定胃肠合剂中芍药苷和黄芩苷的含量[J].中成药,2008,30(9):1311.

- [4] 周桂芳,夏建洪,凌明.HPLC法同时测定肠肛舒口服液中药药苷和黄芩苷的含量[J].中国药房,2007,18(24):1876.
- [5] 何建雄,赖小平,魏刚,等.HPLC测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):48.
- [6] 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,2010:282.
- [7] 滕宇,卢静华.RP-HPLC法同时测定地榆槐角丸中芍药苷、橙皮苷和黄芩苷[J].中成药,2013,35(9):1929.
- [8] 刘阿静,齐广才,刘珍叶,等.RP-HPLC法测定防风通圣丸中芍药苷、栀子苷、黄芩苷和连翘苷的含量[J].西北药学杂志,2012,27(5):415.
- [9] 杨燕飞.RP-HPLC同时测定坤泰胶囊中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量[J].中成药,2010,32(6):958.

Δ 基金项目:国家自然科学基金(青年科学基金)资助项目(No.81102875);福建省科技计划项目(No.2013R0034-3)

* 副研究员。研究方向:中药资源开发利用与新药研发。电话:0591-87514999。E-mail:lwj680@139.com

(收稿日期:2013-07-03 修回日期:2014-01-06)