

# UPLC法测定新生脉散液中紫丁香苷的含量<sup>Δ</sup>

刘建海<sup>1\*</sup>, 崔维利<sup>2#</sup>, 陈涛<sup>2</sup>, 孟萌<sup>2</sup>(1.天津中医药大学研究生院, 天津 300193; 2.天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1236-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.29

**摘要** 目的:建立测定新生脉散液中紫丁香苷含量的方法。方法:采用超高效液相色谱(UPLC)法。色谱柱为 ACQUITY UPLC BEN C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(5:95, V/V), 流速为 0.2 ml/min, 检测波长为 265 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 1 μl。结果:紫丁香苷的进样量在 0.019 7~0.197 0 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ ); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均 < 2%; 平均加样回收率为 99.01%, RSD=1.27% ( $n=6$ )。结论:该方法结果准确、重复性好, 可作为新生脉散液中紫丁香苷的含量测定方法。

**关键词** 新生脉散液; 超高效液相色谱法; 紫丁香苷; 含量测定

## Content Determination of Syringin in New Shengmaisan Liquid by UPLC

LIU Jian-hai<sup>1</sup>, CUI Wei-li<sup>2</sup>, CHEN Tao<sup>2</sup>, MENG Meng<sup>2</sup>(1. Graduate School, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 2. The First Hospital Affiliated to Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for content determination of syringin in New Shengmaisan liquid. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on ACQUITY UPLC BEN C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (5:95, V/V) at the flow rate of 0.2 ml/min. The detection wavelength was 265 nm, the column temperature was 30 ℃ and the sampling volume was 1 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the amount of syringin and peak area in the range of 0.019 7-0.197 0 μg ( $r=0.999\ 9$ ); the RSDs of precision, stability and repeatability tests was less than 2%; the average recovery was 99.01% (RSD=1.27%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is accurate and reproducible. It can be used for content determination of syringin in New Shengmaisan liquid.

**KEYWORDS** New Shengmaisan Liquid; UPLC; Syringin; Content determination

新生脉散液是天津中医药大学第一附属医院自制制剂, 由刺五加、黄芪、丹参、党参等多味中药材提取加工制成, 具有益气、活血、利水之功效, 临床用于治疗心力衰竭(气虚血瘀水停证), 疗效显著。刺五加为方中君药之一, 具有益气健脾、补肾安神的功效<sup>[1]</sup>。药理学研究表明, 刺五加能增强机体免疫调节功能, 提高抗疲劳、抗衰老能力, 还具有显著的扩血管、降血压作用, 对心脑血管系统疾病有良好的治疗效果<sup>[2-3]</sup>。紫丁香苷是刺五加中的主要有效成分之一, 也是刺五加及其复方制剂质量控制的指标成分。近年来, 超高效液相色谱(UPLC)由于在分离度、灵敏度和溶剂用量等方面具有明显优势, 已经在中药质量控制和制剂分析等领域发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。本研究尝试采用 UPLC 法测定新生脉散液中紫丁香苷的含量, 以为提高新生脉散液的质量控制标准提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-Class 型 UPLC 仪, 包括四元溶剂管理器、自动进样恒温管理器、ACQUITY PDA 二极管阵列检测器、Empower III 色谱工作站和柱温箱(美国 Waters 公司); AG135

型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ-250E 型台式超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司); DZKW-S-6 型电热恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

新生脉散液(天津中医药大学第一附属医院制剂室自制, 批号: 120301、120401、120501); 紫丁香苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111574-200603); 乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEN C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈-0.4%磷酸水溶液(5:95, V/V); 流速: 0.2 ml/min; 检测波长: 265 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 1 μl。色谱见图 1。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取紫丁香苷对照品适量, 置于 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度为 197.0 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取新生脉散液 10.0 ml, 用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次, 每次 20 ml, 合并提取液, 置于 100 ml 量瓶中, 加水饱和的正丁醇至刻度, 摇匀。精密量取 40 ml, 置于水浴上蒸干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照处方工艺制成缺刺五加的阴性样

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家科技重大专项课题(No.2010ZX09102-202)

\* 硕士。研究方向: 中药质量控制与分析。E-mail: manlyzhongyao@163.com

# 通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 中药炮制与中药新药研发。电话: 022-83969661。E-mail: cuiweili@shitian.com

品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

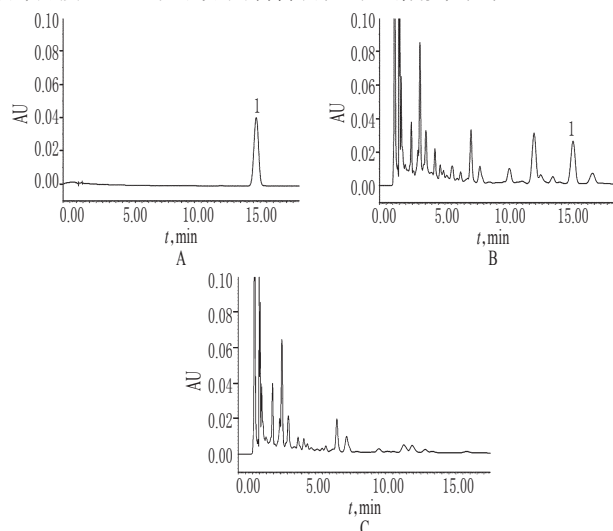


图1 超高效液相色谱图

A.紫丁香苷对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.紫丁香苷

Fig 1 UPLC chromatograms

A. syringin reference; B. test sample; C. negative control; 1. syringin

### 2.3 线性关系考察

分别精密量取对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液各1 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、对照品的进样量(x, μg)为横坐标,绘制标准曲线,得紫丁香苷的回归方程为 $y=1.4 \times 10^5 x - 45\ 990$  ( $r=0.999\ 9, n=6$ )。结果表明,紫丁香苷的进样量在0.019 7~0.197 0 μg范围内与各自峰面积呈良好线性关系。

### 2.4 精密度试验

精密吸取紫丁香苷对照品溶液1 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,  $RSD=0.33\%$  ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.5 重复性试验

精密量取同一批样品(批号:120301)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,  $RSD=0.82\%$  ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.6 稳定性试验

精密吸取同一批样品(批号:120301)制备的供试品溶液适量,分别于制备0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,  $RSD=1.15\%$  ( $n=7$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.7 加样回收率试验

精密量取已知含量的同一批样品(批号:120301)5 ml,共6份,分别精密加入适量的紫丁香苷对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

### 2.8 样品含量测定

取3批新生豚散液样品(批号:120301、120401、120501)各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品的质量浓度。结

果,3批样品中紫丁香苷的质量浓度分别为80.22、78.73、81.14 μg/ml,平均值为80.03 μg/ml( $n=3$ )。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

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

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
401.1	394.0	790.13	98.74	99.01	1.27
401.1	394.0	784.41	97.29		
401.1	394.0	788.76	98.39		
401.1	394.0	799.26	101.06		
401.1	394.0	791.39	99.06		
401.1	394.0	793.16	99.51		

## 3 讨论

### 3.1 提取条件的考察

本研究考察了水饱和的正丁醇、乙酸乙酯两种提取溶剂。结果,水饱和的正丁醇去除杂质的效果较好。又采用氨试液洗涤水饱和正丁醇提取液,对氨试液去除杂质的效果进行考察。结果,样品中紫丁香苷的质量浓度明显降低,故提取液不采用氨试液洗涤。又分别考察了提取溶剂的用量和提取次数。结果,采用2倍量水饱和正丁醇提取4次,对紫丁香苷的提取较为完全,且可除去其他水溶性杂质、排除干扰、改善峰形。故最终采用水饱和的正丁醇提取4次的方法。

### 3.2 色谱条件的考察

笔者参考相关文献<sup>[5-10]</sup>,分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.4%冰乙酸水溶液、乙腈-0.4%磷酸水溶液4种流动相系统,并采用不同的配比进行试验。结果,采用乙腈-0.4%磷酸水(5:95, V/V)为流动相,紫丁香苷色谱峰的峰形及分离效果最好。

笔者又考察了ACQUITY UPLC BEN C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC BEN Shield RP<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)3种色谱柱。结果,采用ACQUITY UPLC BEN C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱,紫丁香苷色谱峰的分离效果较好。

笔者还考察了不同柱温(25、30、35 ℃)、流速(0.6、0.4、0.3、0.2 ml/min)对测定结果的影响。结果,柱温为30 ℃、流速为0.2 ml/min时有利于色谱峰的分离,同时可减少溶剂用量。

综上所述,本试验所建立的方法结果准确、重复性好,可作为新生豚散液中紫丁香苷的含量测定方法。

## 参考文献

- [1] 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, 2010:192.
- [2] 王志睿, 林敬明, 张忠义, 等. 刺五加化学成分与药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(8):603.
- [3] 张旭东, 马杰, 张淑慧, 等. 刺五加制剂的临床应用进展[J]. 中国药房, 2008, 19(3):231.
- [4] 金高娃, 章飞芳, 薛兴亚, 等. 超高效液相色谱在复杂体系中药分离分析中的应用[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2006, 8(3):106.
- [5] 车勇. 高效液相色谱法测定刺五加中紫丁香苷含量的研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2):115.
- [6] 张炜煜. RP-HPLC法测定升白康口服液中紫丁香苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9):1473.
- [7] 李向阳, 屠万倩, 李振国. HPLC测定强力宁片中紫丁香苷和甜菜碱的含量[J]. 中成药, 2007, 29(5):700.

# RP-HPLC法测定去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体的包封率<sup>△</sup>

何文生<sup>1\*</sup>, 冷静<sup>2</sup>, 尚京川<sup>3</sup>(1.重庆市大足区人民医院药剂科, 重庆 402360; 2.重庆市中医院药剂科, 重庆 400021; 3.重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1238-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.30

**摘要** 目的: 建立测定去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体包封率的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Sycronis C<sub>18</sub>, 流动相为磷酸水溶液(pH=3.2)-甲醇(梯度洗脱), 流速为 1.0~1.7 ml/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 50 μl。结果: 去甲斑蝥素、齐墩果酸的质量浓度分别在 20~300、10~150 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系( $r=0.999\ 8$ 、 $0.999\ 7$ ); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD≤5.89%; 去甲斑蝥素的平均回收率为 99.15%~100.11%, RSD≤3.20% ( $n=5$ ), 齐墩果酸的回收率为 99.22%~100.30%, RSD≤3.34% ( $n=5$ ); 去甲斑蝥素、齐墩果酸平均包封率分别为  $(48.01 \pm 2.34)\%$ 、 $(87.31 \pm 0.56)\%$  ( $n=5$ )。结论: 该方法简便、快速、可靠, 可用于去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体包封率的测定。

**关键词** 反相高效液相色谱法; 脂质体; 去甲斑蝥素; 齐墩果酸; 包封率

## Determination of Encapsulation Efficiency of Norcantharidin and Oleanolic Acid Liposome by RP-HPLC

HE Wen-sheng<sup>1</sup>, LENG Jing<sup>2</sup>, SHANG Jing-chuan<sup>3</sup>(1.Dept of Pharmacy, Chongqing Dazu District People's Hospital, Chongqing 402360, China; 2.Dept. of Pharmacy, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; 3.College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of encapsulation efficiency of Norcantharidin and oleanolic acid liposome. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The column was Thermo Sycronis C<sub>18</sub> and the mobile phase was phosphoric acid (pH=3.2)-methanol (gradient elution) with the flow rate of 1.0-1.7 ml/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 30 ℃, the volume was 50 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of norcantharidin and the peak area in the range of 20-300 μg/ml ( $r=0.999\ 8$ ) and oleanolic acid was in the range of 10-150 μg/ml ( $r=0.999\ 7$ ); the RSDs of precision, stability and repeatability tests was no more than 5.89%; the average recovery of oleanolic acid was in the range of 99.15%-100.11% (RSD≤3.20%,  $n=5$ ), that of norcantharidin was 99.22%-100.30% (RSD≤3.34%,  $n=5$ ); the average encapsulation efficiency of norcantharidin and oleanolic acid were  $(48.01 \pm 2.34)\%$ ,  $(87.31 \pm 0.56)\%$  ( $n=5$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, fast and reliable to determine the encapsulation efficiency of Norcantharidin and oleanolic acid liposome.

**KEYWORDS** RP-HPLC; Liposome; Norcantharidin; Oleanolic acid; Entrapment efficiency

去甲斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)是由马来酐和呋喃反应后制得的一种人工全合成化合物, 具有较强的抑制肝癌等多种癌细胞生长的作用, 对泌尿系统、胃肠道、骨髓的毒副作用较低<sup>[1-2]</sup>。齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)为五环三萜类天然化合物, 对肝癌细胞具有明显的抑制作用, 且呈时间和浓度依赖性<sup>[3]</sup>, 同时还具有抗炎、抗病毒等作用<sup>[4]</sup>。脂质体是由磷脂分散在水中形成的具有双分子层的超微球状粒子, 其进入体内后, 主要被网状内皮系统摄取, 具有肝靶向性, 载药脂质体可

用于治疗肝肿瘤及防止淋巴系统肿瘤等的扩散和转移。结合三者优点, 制得去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体。为控制其质量, 笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定了该复合脂质体的包封率。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型 HPLC 仪, 包括 G1312C 型二元泵、G1314F 型紫外检测器、G1329B 型自动进样器及 Chemstation 化学工作站(美

[8] 孔华丽, 胡琳, 宁萌, 等. 高效液相色谱法测定复方刺五加片中紫丁香苷的含量[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(4): 347.

△ 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(No.CSTC, 2010BB5347); 重庆市卫生局中医药科技项目(No.2011-2-161)

\* 副主任中药师。研究方向: 中药化学与药事管理。电话: 023-43780213

[9] 姜文红, 刘静, 仲昭庆, 等. HPLC法同时测定刺五加浸膏3种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1145.

[10] 彭敏, 谭洁. 高效液相色谱法测定五加参颗粒中紫丁香苷含量[J]. 中国药业, 2012, 21(4): 39.

(收稿日期: 2014-02-16 修回日期: 2014-09-04)

(编辑: 孙冰)