

HPLC法同时测定荨麻疹丸中3种有效成分的含量

雷琪*, 田蜜(重庆广播电视大学文法学院农医教研室, 重庆 400052)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3437-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.39

摘要 目的:建立同时测定荨麻疹丸中芍药苷、黄芩苷和欧前胡素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Alltima C₁₈,流动相为甲醇-水-磷酸(55:45:0.2, V/V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm(芍药苷)、280 nm(黄芩苷)、300 nm(欧前胡素),柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:芍药苷、黄芩苷和欧前胡素的检测质量浓度线性范围为5.40~54.0 μg/ml($r=0.9998$)、11.29~112.9 μg/ml($r=0.9997$)、24.95~249.5 μg/ml($r=0.9999$);定量限分别为5.4、11.2、30.0 ng,检测限分别为1.8、2.8、7.5 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为95.88%~98.33%(RSD=0.95%, $n=6$)、96.86%~99.96%(RSD=1.20%, $n=6$)、98.07%~100.55%(RSD=0.92%, $n=6$)。结论:该方法简便、准确、专属性强、重复性好,可用于测定荨麻疹丸中黄芩苷、芍药苷和欧前胡素的含量。

关键词 荨麻疹丸;高效液相色谱法;芍药苷;黄芩苷;欧前胡素;含量测定

Simultaneous Determination of Three Components in Urticaria Pill by HPLC

LEI Qi, TIAN Mi (Dept. of Agriculture and Medicine, College of Humanities and Law, Chongqing Radio and Television University, Chongqing 400052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin, baicalin and imperatorin in Urticaria pill. METHODS: HPLC was performed on the column of Alltima C₁₈ with mobile phase of methanol-water-Phosphoric acid (55:45:0.2, V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 230 nm for paeoniflorin, 280 nm for baicalin and 300 nm for imperatorin, column temperature was 30 ℃, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range was 5.40-54.0 μg/ml for paeoniflorin ($r=0.9998$), 11.29-112.9 μg/ml for baicalin ($r=0.9997$) and 24.95-249.5 μg/ml for imperatorin ($r=0.9999$), respectively; the limit of quantitation were 5.4, 11.2, 30.0 ng, the limit of detection were 1.8, 2.8, 7.5 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 95.88%-98.33% (RSD=0.95%, $n=6$), 96.86%-99.96% (RSD=1.20%, $n=6$) and 98.07%-100.55% (RSD=0.92%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate with strong specificity and good reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of paeoniflorin, baicalin and imperatorin in Urticaria pill.

KEYWORDS Urticaria pill; HPLC; Paeoniflorin; Baicalin; Imperatorin; Content determination

荨麻疹丸为卫生部颁布标准中药成方制剂第10册(WS3-B-1976-95)收录的中药复方制剂,由赤芍、黄芩、白芷、防风、白鲜皮、薄荷、川芎等多味中药材组成,具有清热祛风、除湿止痒的功效,临床上用于风、湿、热而致的荨麻疹、湿疹、皮肤瘙痒等疾病的治疗^[1]。其中,黄芩有清热燥湿、泻火解毒的功能;赤芍具有清热凉血、活血祛瘀的功效。黄芩苷和芍药苷为该药的主要活性成分,原标准尚未建立该制剂中芍药苷、黄芩苷和欧前胡素的含量测定方法^[2];且目前也仅有对荨麻疹丸中芍药苷单独进行含量检测的文献,尚未有同时测定芍药苷和黄芩苷的研究。为了更好地控制该制剂质量,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定荨麻疹丸芍药苷、黄芩苷和欧前胡素的含量。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括紫外检测器、Empower色谱工作站(美国Agilent公司);KQ-300型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);AE-240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);1852D型超纯水机(重庆摩尔多制水设备有限公司)。

* 讲师,硕士。研究方向:药理学与药物分析。E-mail: 345746479@qq.com

1.2 药品与试剂

荨麻疹丸(吉林龙泰制药股份有限公司,批号:140204、131006、131101,规格:10 g/袋);芍药苷对照品(批号:110736-201336,纯度:98%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201216,纯度:94%)、欧前胡素对照品(批号:110826-201310,纯度:98%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(55:45:0.2, V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm(芍药苷)、280 nm(黄芩苷)、300 nm(欧前胡素);柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芍药苷对照品10.80 mg、黄芩苷对照品22.59 mg、欧前胡素对照品49.91 mg,分别各置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为单一对照品贮备液。精密吸取上述单一对照品贮备液各10 ml,置于20 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得芍药苷、黄芩苷、欧前胡素质量浓度分别为0.108 0、0.225 9、0.499 1 mg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,研细,取细粉约5 g,精密称定,取样品粉末适量,置于50 ml具塞锥形瓶中,精密加入甲醇

25 ml,称定质量,超声处理30 min,放至室温,再次称定质量,用甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方工艺和配方比例制备缺芍药、黄芩和白芷的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>5.6,理论板数分别以芍药苷、黄芩苷和欧前胡素峰计均≥6 000,保留时间分别为11、15.8、17 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

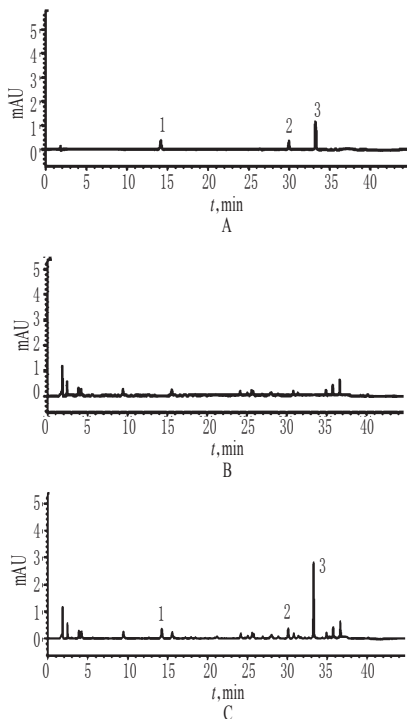


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品; B.阴性对照; C.供试品; 1.芍药苷; 2.黄芩苷; 3.欧前胡素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.negative control; C.test sample; 1.paeoniflorin; 2.baicalin; 3.imperatorin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品液各0、0.5、1、2.5、5 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇制成黄芩苷(质量浓度分别为0、5.40、10.80、27.0、54.0 μg/ml)、芍药苷(质量浓度分别为0、11.29、22.58、56.45、112.9 μg/ml)、欧前胡素(质量浓度分别为0、24.95、49.9、124.75、249.5 μg/ml)系列对照品溶液。分别吸取上述系列对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下方法进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表1。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),详见表2。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
芍药苷	y=14.672x+4.959 6	0.999 8	5.40~54.0
黄芩苷	y=10.523x+7.561 9	0.999 7	11.29~112.9
欧前胡素	y=458.90x+21.323	0.999 9	24.95~249.5

表2 定量限与检测限

Tab 2 Quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ,ng	LOD,ng
芍药苷	5.4	1.8
黄芩苷	11.2	2.8
欧前胡素	30.0	7.5

2.6 精密度试验

取“2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,芍药苷、黄芩苷和欧前胡素峰面积的RSD分别为0.49%、0.55%、1.22%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:140204)适量,分别于室温下放置0、2、4、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,芍药苷、黄芩苷和欧前胡素峰面积的RSD分别为0.95%、1.24%、1.31%(n=6),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:140204)适量,共6份,研细,精密称定,置于50 ml量瓶中,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,记录峰面积并按外标法计算芍药苷、黄芩苷和欧前胡素的含量,详见表3。由表3可知,本方法重复性良好。

表3 重复性试验结果(n=6)

Tab 3 Results of reproducibility test(n=6)

待测成分	平均含量,mg/g	RSD,%
芍药苷	0.028 1	1.01
黄芩苷	0.042 1	1.45
欧前胡素	0.091 5	0.97

2.9 加样回收率试验

取已知含量的同一批样品(批号:140204)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再分别加入一定量的待测成分对照品适量,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4。

2.10 样品含量测定

分别取3批样品各适量,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,记录峰面积并按外标法计算芍药苷、黄芩苷和欧前胡素的含量,结果见表5。

3 讨论

3.1 检测指标的确定

现行质量标准中荨麻疹丸的鉴别和含量测定项,不能全面地反映该药品的质量。2015年版《中国药典》(一部)将黄芩苷、芍药苷和欧前胡素分别作为黄芩、赤芍和白芷药材的质量控制指标^[2]。因此,本研究选择黄芩苷、芍药苷和欧前胡素作

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Result of recovery test(n=6)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芍药苷	19.8	1.422 7	1.080 7	2.468 5	96.77	96.68	0.95
	19.8	1.423 6	1.080 7	2.460 1	95.91		
	19.8	1.430 1	1.080 7	2.470 1	96.23		
	19.8	1.422 9	1.080 7	2.470 8	96.96		
	19.8	1.422 9	1.080 7	2.459 1	95.88		
	19.8	1.419 9	1.080 7	2.482 6	98.33		
黄芩苷	19.8	2.106 1	2.260 5	4.365 8	99.96	98.15	1.20
	19.8	2.112 5	2.260 5	4.370 1	99.87		
	19.8	2.110 4	2.260 5	4.350 9	99.12		
	19.8	2.107 8	2.260 5	4.326 2	98.14		
	19.8	2.112 6	2.260 5	4.358 8	99.37		
	19.8	2.116 3	2.260 5	4.305 8	96.86		
欧前胡素	19.8	4.987 2	4.989 1	9.989 1	100.26	99.71	0.92
	19.8	5.021 3	4.989 1	10.002 5	99.84		
	19.8	5.010 9	4.989 1	9.964 4	99.28		
	19.8	4.989 6	4.989 1	9.991 2	100.25		
	19.8	5.012 0	4.989 1	10.028 5	100.55		
	19.8	4.975 3	4.989 1	9.867 9	98.07		

表5 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 5 Results of contents determination of samples(n=3, mg/g)

样品批号	芍药苷	黄芩苷	欧前胡素
140204	0.028 1	0.042 1	0.091 5
131006	0.027 7	0.042 5	0.090 7
131101	0.027 5	0.042 0	0.092 2
平均含量	0.027 8	0.042 2	0.091 5

为荨麻疹丸的质量控制指标,采用HPLC波长切换检测的方法,同时对样品中黄芩、赤芍和白芷的主要有效成分黄芩苷、芍药苷和欧前胡素进行定量分析。

3.2 检测波长的选择^[9-11]

笔者将黄芩苷、芍药苷和欧前胡素的单一对照品溶液分别在200~400 nm波长范围内进行扫描,结果黄芩苷在280 nm波长处有最大吸收,芍药苷在230 nm波长处有最大吸收,欧前胡素在300 nm波长处有最大吸收。为保证各成分均有适宜的灵敏度,并减少干扰,本研究最终选择切换波长检测各成分。

3.3 供试品溶液提取方法的选择

在供试品溶液的制备过程中,笔者考察了甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇等溶液作为提取溶剂,并对超声提取时间(10、20、30、40 min)进行优选^[6-7]。结果显示,甲醇提取率最高,且超声30 min后芍药苷、黄芩苷和欧前胡素已基本提取完全,故将样品提取方法确定为甲醇溶解后,超声提取30 min。

3.4 流动相的选择

有不少文献报道了芍药苷、黄芩苷和欧前胡素含量测量的流动相^[8-13],笔者参考2015年版《中国药典》(一部)中赤芍、黄芩和白芷项下芍药苷、黄芩苷和欧前胡素的含量测定方法,对流动相进行了探索,比较了甲醇-水-冰醋酸(50:19:1, V/V/V)、甲醇-水-磷酸(55:45:0.2, V/V/V)和乙腈-水-磷酸(55:45:0.2, V/V/V)

等多组流动相。结果显示,甲醇-水-磷酸(55:45:0.2, V/V/V)为流动相时,3种成分的色谱峰分离均较好,出峰时间适宜,分离度好,色谱对称性较好。

3.5 色谱柱的选择

本试验同时考察了4种品牌色谱柱 Waters SunFire™ C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent HC C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamonsil™ C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)的分离效果,根据图谱的分离效果,最终选择色谱柱 Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为本试验的色谱柱。

综上所述,本方法简便、准确、专属性强、重复性好,可用于测定荨麻疹丸中黄芩苷、芍药苷和欧前胡素的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂: 第十册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 106.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 147.
- [3] 潘浪胜, 吕秀阳, 平东. 赤芍中芍药苷提取工艺的优化[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 105.
- [4] 张桂英, 范广才. 高效液相色谱法测定蒲公英口服液中药苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(1): 98.
- [5] 张捷, 谭生建, 王欢, 等. 高效液相色谱法测定小二润肺止咳口服液中橙皮苷和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1 454.
- [6] 张诚贤, 徐陆忠, 朱佳茜, 等. 高效液相色谱法测定荨麻疹丸中黄芩苷的含量[J]. 医药导报, 2013, 32(12): 1 649.
- [7] 张薇, 朱智甲, 张晗, 等. 液相色谱-串联质谱法测定白芷中3种香豆素[J]. 分析实验室, 2012, 31(5): 104.
- [8] 费超, 陈然, 曹杰, 等. HPLC法测定芩翘抗感颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 63.
- [9] 彭其胜, 穆瑶, 陈欢. HPLC法测定黄芩免煎颗粒和饮片中的黄芩苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(9): 1 259.
- [10] 张小博, 曹恒涛, 王小艳. 黄连上清片中黄芩苷与欧前胡素的含量测定方法研究[J]. 中国执业药师, 2015, 12(9): 32.
- [11] 王连国, 王欣, 孟宪杰, 等. 高效液相色谱法测定白芷中欧前胡素和异欧前胡素含量[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(22): 2 816.
- [12] 戴红锋, 尹庆锋, 谢彤. UPLC法测定复方虎黄喷剂中虎杖苷、黄芩苷、欧前胡素[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(1): 88.
- [13] 朱冠华, 顾圣莹, 康雷, 等. HPLC法同时测定参芍胃安颗粒中芍药苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2 533.

(收稿日期: 2016-03-21 修回日期: 2016-06-06)

(编辑: 刘 柳)