

HPLC法测定当归芍药散中芍药苷的含量^Δ

周 璐^{1*},王 登^{2,3},张 黎¹,张 锦^{1,2},李茂星¹,张汝学^{1,2},贾正平^{1#}(1.兰州军区兰州总医院全军高原环境损伤防治重点实验室/国家中医药管理局临床中药学重点学科,兰州 730050;2.甘肃中医学院药学院,兰州 730000;3.西安大兴医院药剂科,西安 710016)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4255-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.25

摘要 目的:建立测定当归芍药散中芍药苷含量的方法,以期控制该制剂的质量提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Symmetry C₁₈,流动相为乙腈-水(含0.1%磷酸)(14:86, V/V),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 230 nm,柱温为 20 ℃,进样量为 20 μl。结果:芍药苷检测质量浓度线性范围为 10~80 μg/ml($r=0.999\ 3$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;加样回收率为 98.3%~104.9%(RSD=2.0%, $n=9$)。结论:该方法简便、准确、专属性强,可用于测定当归芍药散中芍药苷的含量。

关键词 当归芍药散;芍药苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Peoniflorin in Danggui Shaoyao Powder by HPLC

ZHOU Jun¹, WANG Deng^{2,3}, ZHANG Li¹, ZHANG Jin^{1,2}, LI Maoxing¹, ZHANG Ruxue^{1,2}, JIA Zhengping¹(1.Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region/Key Disciplines of Clinical Chinese Materia Medica, State Administration of TCM, Lanzhou 730050, China;2.College of Pharmacy, GanSu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;3. Dept. of Pharmacy, Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of peoniflorin in Danggui shaoyao powder, and provide a reference for controlling the quality of the preparation. METHODS: HPLC was performed on the column of Symmetry C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water(containing 0.1% phosphoric acid)(14:86, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 230 nm, column temperature was 20 ℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of peoniflorin was 10-80 μg/ml($r=0.999\ 3$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 98.3%-104.9%(RSD=2.0%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and can be used for the content determination of peoniflorin in Danggui shaoyao powder.

KEYWORDS Danggui shaoyao powder; Peoniflorin; HPLC; Content determination

当归芍药散出自《金匮要略》,由当归、白芍、川芎、泽泻、茯苓和白术等 6 味中药材组成^[1]。方中重用芍药敛养肝血、缓急止痛,当归助芍药补养肝血,川芎行血中之气滞,三药共以调肝;泽泻用量亦较重,意在渗利湿浊,白术、茯苓健脾除湿,三者合以治脾^[2]。诸药合用,肝血足而气条达,脾运健则湿邪除,肝脾调和而诸证自愈^[3]。目前,当归芍药散在临床广泛用于消化系统、神经系统、泌尿系统、内分泌系统疾病的治疗^[4]。芍药苷为白芍中含量最高的有效成分之一,具有类似于当归芍药散的抗神经炎症、抗氧化等作用,除此外还具有调节血脂、血压等作用,可用于治疗神经退行性疾病、心血管疾病、糖尿病并发症等多种疾病^[5-9];且目前尚未有测定当归芍药散中芍药苷含量的报道。因此,本课题组采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定该制剂中芍药苷含量的方法,以期控制该制剂的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

JYT-5020 型多功能动态提取浓缩机组(上海矩源机械设

备有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);BPZ-6033LC 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);600-966 型 HPLC 仪,包括 600 型二元梯度泵、996 型二极管阵列紫外检测器、Millennium32 色谱工作站(美国 Waters 公司);BP210S 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);LY10-300A 型超声波清洗机(上海兰仪实业有限公司,功率:200 W,频率:40 Hz)。

1.2 试剂

芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110736-200933,纯度>98.1%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为灭菌注射用水。

1.3 药材

当归(批号:20140601)、白芍(批号:20140601)、泽泻(批号:20140701)、川芎(批号:20140603)、白术(批号:20140101)、茯苓(批号:20130701)均购自亳州市远光中药饮片厂,经兰州军区兰州总医院药材科主任药师李茂星鉴定,分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia laciflora* Pall. 的干燥根、泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep 的干燥块茎、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wol 的干燥菌核。

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173620)

* 药师,硕士。研究方向:天然药物化学。电话:0931-8994676。

E-mail:zhoujunh@163.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:天然药物化学。E-mail:

121189539@qq.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(含0.1% 磷酸)(14:86, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 20 °C, 进样量: 20 μl。

2.2 样品和溶液的制备

2.2.1 当归芍药散 按《金匱要略》记载的各药材配比(当归:白芍:泽泻:川芎:白术:茯苓=3:16:8:8:4:4), 精密称取当归粉末 14.0 g、白芍粉末 74.7 g、茯苓粉末 18.7 g、白术粉末 18.7 g、泽泻粉末 37.3 g 和川芎粉末 37.3 g, 混匀, 置于 2 L 圆底烧瓶中。用相当于药材粉末总体积 8 倍量的蒸馏水浸泡 1.5 h, 加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h; 静置后纱布过滤, 合并滤液, 水浴浓缩, 减压干燥, 粉碎得浸膏粉(其浸膏得率为 27.97%, 为干燥粉末)。共制备了 3 个编号(S1、S2、S3)的样品。

2.2.2 对照品溶液 精密称取干燥至恒质量的芍药苷对照品 2.5 mg, 置于 25 ml 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并定容, 摇匀, 即得质量浓度为 100 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密称取“2.2.1”项下制备的干燥样品粉末 0.25 g, 置于 25 ml 量瓶中, 精密加入 50% 乙醇 20 ml, 超声处理 30 min, 冷却至室温后, 加 50% 乙醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺制备不含芍药的阴性对照品, 再按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量, 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 > 1.5; 理论板数以芍药苷峰计 > 2 000, 保留时间为 9.71 min。结果表明, 其他成分对测定无干扰。

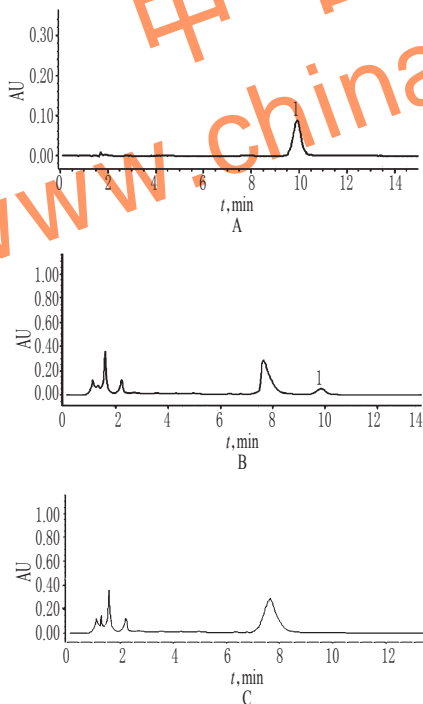


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 芍药苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. peoniflorin

2.4 线性关系考察

取“2.2.2”项下对照品溶液 4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、

0.5 ml, 分别置于 5 ml 量瓶中, 加 50% 乙醇定容, 摇匀, 即得系列线性溶液。取上述溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(x , μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得芍药苷的回归方程为 $y = 24\ 721x + 238.98$ ($r = 0.999\ 3$)。结果表明, 芍药苷的检测质量浓度线性范围为 10~80 μg/ml。

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 芍药苷峰面积的 RSD = 1.16% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密量取“2.2.3”项下供试品溶液适量, 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, 芍药苷峰面积的 RSD = 1.21% ($n = 6$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取“2.2.1”项下干燥样品粉末适量, 按“2.2.3”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, 芍药苷峰面积的 RSD = 1.18% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取“2.2.1”项下干燥样品粉末适量, 共 9 份, 每份约 250 mg, 精密称定, 置于 25 ml 量瓶中, 分别精密加入芍药苷对照品 810.0、1 015.0、1 215.0 μg, 各 3 份, 按“2.2.3”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。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 9$)

Tab 1 Results of recovery test ($n = 9$)

| 取样量, g | 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, % |
|---------|----------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 0.250 2 | 1 017.9 | 810.0 | 1 837.3 | 101.2 | | |
| 0.250 5 | 1 012.8 | 810.0 | 1 842.5 | 102.4 | | |
| 0.250 4 | 1 027.6 | 810.0 | 1 832.6 | 99.4 | | |
| 0.250 1 | 1 017.9 | 1 015.0 | 2 033.1 | 100.0 | | |
| 0.250 2 | 1 012.8 | 1 015.0 | 2 025.4 | 99.8 | 100.5 | 2.0 |
| 0.250 3 | 1 027.6 | 1 015.0 | 2 031.4 | 98.9 | | |
| 0.250 5 | 1 017.9 | 1 215.0 | 2 212.2 | 98.3 | | |
| 0.250 0 | 1 012.8 | 1 215.0 | 2 225.6 | 99.8 | | |
| 0.250 4 | 1 027.6 | 1 215.0 | 2 301.9 | 104.9 | | |

2.9 样品含量测定

分别取 3 个编号的干燥样品粉末各适量, 按“2.2.3”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, 记录峰面积并计算芍药苷的含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n = 3$, μg/mg)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n = 3$, μg/mg)

| 样品编号 | 含量 | 平均含量 | RSD, % |
|------|------|------|--------|
| S1 | 4.01 | | 1.03 |
| S2 | 4.05 | 4.05 | 0.43 |
| S3 | 4.10 | | 2.09 |

3 讨论

《金匱要略》中记载当归芍药散作为散剂以酒调服^[2], 而现代临床用药及药理研究中该方常以水煎剂入药^[7]。白芍为当归芍药散方中主药, 芍药苷为其主要活性物质之一, 芍药苷属蒽萜单萜苷类, 熔点为 196 °C, 易溶于水、甲醇、乙醇, 在 pH2~6 条件下稳定, 在碱性条件下不稳定^[8]。2015 年版《中国药典》(一部)将乙醇作为芍药苷含量测定的提取溶剂^[9]。路小平^[10]分

HPLC法同时测定参菊洗剂中4种成分的含量^Δ

谭璐*,张广求#,刘文(黄冈市中心医院药剂科,湖北黄冈 438000)

中图分类号 R282.71;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4257-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.26

摘要 目的:建立同时测定参菊洗剂中苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Dionex C₁₈,流动相为乙腈-0.1%三乙胺水溶液(用磷酸调节pH至7.2)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素检测进样量线性范围分别为1.400~8.400 μg($r=0.999\ 4$)、0.152~0.912 μg($r=0.999\ 6$)、0.248~1.488 μg($r=0.999\ 9$)、0.128~0.768 μg($r=0.999\ 4$);定量限分别为84.85、3.15、15.03、7.76 ng,检测限分别为24.13、0.89、4.27、2.20 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为96.29%~99.06%(RSD=1.10%, $n=9$)、96.49%~98.27%(RSD=0.69%, $n=9$)、99.26%~101.13%(RSD=0.62%, $n=9$)、96.27%~98.64%(RSD=0.89%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于同时测定参菊洗剂中苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素的含量。

关键词 参菊洗剂;苦参碱;蒙花苷;盐酸小檗碱;蛇床子素;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of Four Components in Shenju Lotion by HPLC

TAN Lu, ZHANG Guangqiu, LIU Wen (Dept. of Pharmacy, Huanggang Central Hospital, Hubei Huanggang 438000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of matrine, linarin, berberine hydrochloride and osthole in Shenju lotion. METHODS: HPLC was performed on the column of Dionex C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.1% triethylamine (pH was adjusted to 7.2 with phosphoric) (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 210 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 1.400-8.400 μg for matrine ($r=0.999\ 4$), 0.152-0.912 μg for linarin ($r=0.999\ 6$), 0.248-1.488 μg for berberine hydrochloride ($r=0.999\ 9$) and 0.128-0.768 μg for osthole ($r=0.999\ 4$); limit of quantitation was 84.85, 3.15, 15.03, 7.76 ng, limit of detection was 24.13, 0.89, 4.27, 2.20 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 96.29%-99.06% (RSD=1.10%, $n=9$), 96.49%-98.27% (RSD=0.69%, $n=9$), 99.26%-101.13% (RSD=0.62%, $n=9$) and 96.27%-98.64% (RSD=0.89%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of matrine, linarin, berberine hydrochloride and osthole in Shenju lotion.

KEYWORDS Shenju lotion; Matrine; Linarin; Berberine hydrochloride; Osthole; HPLC; Content determination

别用甲醇、乙醇、重蒸馏水提取芍药苷以探讨最佳提取溶剂,提取率分别为3.01%、3.09%、3.07%,表明使用这3种提取溶剂结果无明显差异。因此,本研究基于临床用药多以水煎剂入药,同时考虑到经济、环保、安全性等方面的因素,最终确定水为本试验的提取溶剂。

综上所述,本方法简便、准确、专属性强,可用于测定当归芍药散中芍药苷的含量。

参考文献

- [1] 张家礼.金匱要略[M].北京:中国中医药出版社,2010:419.
- [2] 段富津,李飞,康广盛.金匱要略方义[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1984:341.
- [3] 李佳曦.当归芍药散组方配伍规律及其方证相关性研究[D].南京:南京中医药大学,2014.

- [4] Zhou K, Jia N, Jiang N, *et al.* Beneficial effect of Danggui-Shaoyao-San, a traditional Chinese medicine, on drowsiness induced by chronic restraint stress[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597:26.
- [5] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等.芍药苷药理作用研究新进展[J].中国药物警戒,2012,9(2):100.
- [6] 王登,周珺,张锦,等.开心散和当归芍药散对高脂饲料喂养的慢性应激大鼠糖脂代谢的影响及HPA轴相关机制[J].中药材,2015,38(9):1919.
- [7] 贾家丽,卞俊.芍药苷提取与分离纯化的研究进展[J].中国药房,2014,25(31):2969.
- [8] 金利泰.天然药物提取分离工艺学[M].杭州:浙江大学出版社,2011:266.
- [9] 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,2015:462.
- [10] 路小平.芍药苷提取溶剂的选择[J].时珍国医国药,2006,17(6):1016.

^Δ基金项目:黄冈市科技计划项目(No.黄科[字2013]76号)

*主管药师,硕士。研究方向:医院药学、药物分析。电话:0713-8625312。E-mail:tanlu05@126.com

#通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学、药物分析。E-mail:ccnpa@163.com

(收稿日期:2015-11-02 修回日期:2016-07-21)

(编辑:刘柳)