

· 论著 ·

用高效液相色谱法测定安坤颗粒中栀子苷和芍药苷的含量

张丽萍 (温州市药品检验所, 浙江 温州 325028)

[摘要] 目的 建立 HPLC 法同时测定安坤颗粒中栀子苷和芍药苷的含量。方法 采用安捷伦 Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水 (14:86), 检测波长: 230 nm, 柱温: 35 °C。结果 栀子苷在 0.071 52 ~ 0.357 6 μg 范围内线性关系良好 ($r = 0.999 8$), 平均回收率为 98.22%, RSD = 1.25%。芍药苷在 0.071 97 ~ 0.359 85 μg 范围内线性关系良好 ($r = 0.999 2$), 平均回收率为 98.40%, RSD = 0.68%。结论 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于安坤颗粒的质量控制。

[关键词] 安坤颗粒; 高效液相色谱法; 栀子苷; 芍药苷

[中图分类号] R927.2, R28

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2014)02-0121-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.02.012

Determination of gardenoside and paeoniflorin in Ankun granule by HPLC

ZHANG Liping (Wenzhou Institute for Drug Control, Wenzhou 325028, China)

[Abstract] **Objective** To establish the HPLC method for the determination of gardenoside and paeoniflorin in Ankun granule. **Methods** The column was Agilent Eclipse XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the acetonitrile-water (14:86) was used as the mobile phase. The detective wavelength was set at 230 nm. **Results** For the gardenoside, the linear range was 0.0715 2 - 0.357 6 μg, $r = 0.999 8$ and the average recovery was 98.22% with RSD of 1.25%. For the Paeoniflorin, the linear range was 0.071 97 - 0.359 85 μg, $r = 0.999 2$ and the average recovery was 98.40% with RSD of 0.68%. **Conclusion** The method was simple, reliable, and accurate which could be applied to the quality control of the drug.

[Key words] Ankun granule; HPLC; gardenoside; paeoniflorin

安坤颗粒是由牡丹皮、栀子、白术、白芍、当归、茯苓等中药组成的中药制剂, 具有滋阴清热, 健脾养血的功效, 主要用于放环后引起的出血, 月经提前、量多或月经紊乱, 腰酸酸痛, 下腹坠痛, 心烦易怒, 手足心热^[1]。其执行质量标准为我国卫生部颁布的标准中药成分制剂第十九册, 除了几个鉴别及常规的检查项目之外, 没有含量测定一项对样品进行量的控制。虽然目前国内已有文献报道了 HPLC 法测定安坤颗粒中栀子苷或芍药苷的含量, 但都是对单一组分的测定, 同时测定安坤颗粒中的栀子苷和芍药苷的含量的方法尚未见报道。

本实验参考有关文献, 用高效液相色谱 (HPLC) 法同时测定主药栀子和白芍中的有效成分栀子苷和芍药苷含量。本方法简便易行, 结果准确可靠, 可用于安坤颗粒的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器 安捷伦高效液相色谱仪 Agilent1200 (包括自动进样器、二极管阵列检测器、柱温箱);

Mettler TOLEDO XS205DU 电子天平。

1.2 试药 栀子苷 (批号: 110749-200714, 用前在五氧化二磷减压器中减压干燥 12 h 以上) 和芍药苷对照品 (批号: 110736-201035, 含量 96.5%, 使用前无须干燥) 均由中国药品生物制品检定所提供; 安坤颗粒 (西安自力中药集团有限公司, 批号: 20111017、20120205、20120305); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 水为超纯水。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 安捷伦 Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (14:86), 检测波长: 230 nm, 流速: 1.0 ml/min, 柱温: 35 °C。

2.2 溶液的制备 对照品溶液: 精密称取栀子苷对照品 11.92 mg、芍药苷对照品 12.43 mg, 分别置于 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述两种对照品溶液各 1 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即制成含栀子苷和芍药苷分别为 23.84、23.99 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.1 供试品溶液 取安坤颗粒适量, 研细, 精密称

[作者简介] 张丽萍, 女, 副主任中药师。Tel: (0577) 88513970, E-mail: 620wz@163.com.

取细粉 1.0 g, 置 50 ml 容量瓶中, 加甲醇适量, 用超声波处理 30 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 阴性样品溶液 按处方比例分别称取除白芍和栀子以外的其余药味, 按制备工艺制成相应的阴性样品, 按“2.2.2”项下操作, 制成不含栀子和白

芍的阴性样品溶液。

2.3 系统适用性实验 取供试品, 在上述色谱条件下进样 10 μl , 栀子苷、芍药苷的保留时间分别为 9.5、15.6 min, 理论塔板数均 > 5 000, 两色谱峰的分度为 4.85, 达到较好的分离效果, 且阴性对照无干扰, 结果见图 1。

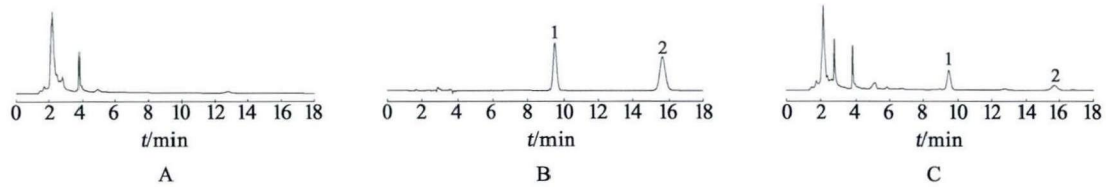


图 1 安坤颗粒 HPLC 色谱图

A. 阴性样品溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 栀子苷; 2. 芍药苷

2.4 线性关系考察 分别吸取浓度为 0.238 4 mg/ml 的栀子苷对照品溶液 0.50、0.75、1.25、2.00、2.50、3.75 ml, 浓度为 0.239 9 mg/ml 的芍药苷对照品溶液 0.50、0.75、1.25、2.00、2.50、3.75 ml, 置于同一 25 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 ml 含栀子苷分别为 4.768、7.152、11.920、19.072、23.840、35.760 μg , 含芍药苷分别为 4.798、7.197、11.995、19.192、23.990、35.985 μg 的对照品混合溶液。各取 10 μl 进样, 以上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。以栀子苷、芍药苷的进样量 X (μg) 为横坐标, 以相应的峰面积 Y 为纵坐标, 得到栀子苷的回归方程为: $Y = 899.08X + 35.677$, $r = 0.9998$, 芍药苷的回归方程为: $Y = 1143.8X + 20.426$, $r = 0.9992$ 。结果表明, 栀子苷、芍药苷分别在 0.071 52 ~ 0.357 6 μg , 0.071 97 ~ 0.359 85 μg 范围内, 与其峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度实验 精密吸取对照品溶液进样 10 μl , 重复进样 6 次, 按峰面积计算, 栀子苷的 RSD 为

0.65%, 芍药苷的 RSD 为 0.68%, 结果表明精密度良好。

2.6 重复性实验 取批号 20111017 的样品按照样品测定方法, 重复测定 6 次, 结果栀子苷的含量为 2.34 mg/g, RSD = 0.63%; 芍药苷含量为 0.82 mg/g, RSD = 1.01%。

2.7 稳定性实验 同一供试品溶液分别于 0、1、2、5、8、10 h 测定, 栀子苷的峰面积 RSD 为 0.86%, 芍药苷峰面积的 RSD = 1.05%, 表明供试品溶液在室温下放置 10 h 稳定。

2.8 加样回收率实验 分别称取已测知含量的样品 (批号: 20111017) 6 份, 研细, 各精密称定样品约 0.5 g, 置 50 ml 量瓶中, 分别精密加入浓度为 0.238 4 mg/ml 的栀子苷对照品溶液 5 ml 和浓度为 0.239 9 mg/ml 的芍药苷对照品溶液 1.7 ml, 加入甲醇适量, 用超声波处理 30 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按样品含量测定项下方法测定, 记录色谱图, 计算回收率, 见表 1。

表 1 安坤颗粒中栀子苷和芍药苷加样回收率实验结果

成分	取样量 (g)	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
栀子苷	0.508 2	1.190 7	1.192 0	1.155 1	96.90	98.22	1.25
	0.506 3	1.186 3	1.192 0	1.179 3	98.93		
	0.507 5	1.189 1	1.192 0	1.165 0	97.73		
	0.509 2	1.193 1	1.192 0	1.182 2	99.18		
	0.507 1	1.188 1	1.192 0	1.154 4	96.85		
	0.508 9	1.192 4	1.192 0	1.188 8	99.73		
芍药苷	0.508 2	0.414 2	0.407 8	0.399 3	97.92	98.40	0.68
	0.506 3	0.412 6	0.407 8	0.401 2	98.38		
	0.507 5	0.413 6	0.407 8	0.405 8	99.51		
	0.509 2	0.415 0	0.407 8	0.398 7	97.77		
	0.507 1	0.413 3	0.407 8	0.399 6	97.99		
	0.508 9	0.414 8	0.407 8	0.403 1	98.85		

2.9 样品的测定 取安坤颗粒样品,按照供试品溶液的制备方法,进样测定,每批平行测定2份,分别按外标法计算栀子苷及芍药苷的含量,结果见表2。

表2 安坤颗粒中栀子苷和芍药苷含量(mg/g, n=3)

批号	栀子苷	芍药苷
20111017	2.34	0.82
20120205	2.42	0.79
20120305	2.37	0.81

3 讨论

3.1 优化提取方法 本实验在优化样品的前处理方法时,比较了索氏提取、加热回流提取和超声提取3种方法。结果显示,回流提取法样品液相色谱中杂质干扰较多、提取时间较长,而索氏提取所得样品虽然杂质干扰少,但提取时间长,提取效率不高,唯有用超声波提取效率最高,可以在较短的时间内使得所测成分提取完全,虽有杂质,但对被测成分的检出无干扰,故而选择用超声波提取方式来对样品进行前处理。

3.2 流动相的选择 对甲醇-水-冰醋酸^[2]、甲醇-1%冰醋酸水溶液-四氢呋喃^[3]以及乙腈-1%磷酸^[4]

等系统进行了比较,结果表明,乙腈-水^[5]两者比例为14:86时,安坤颗粒中栀子苷和芍药苷的分离完全,峰形对称,其他成分不干扰。

本法测定了安坤颗粒中栀子和白芍中栀子苷和芍药苷的含量,结果准确,测定过程样品处理操作简便,仅为甲醇超声溶解,且样品取样量少,精密度与重现性较好,流动相组分简单,适用于安坤颗粒的质量控制。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂:第十九册[S]. 1998:72.
- [2] 吴毅,张文惠,王永刚. HPLC法测定安坤颗粒中芍药苷的含量[J]. 江西中医学院学报, 2002, 14(1):42.
- [3] 汤浩,封士兰,闵光涛,等. HPLC同时测定赤栀黄胶囊中栀子苷和芍药苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(5):361-364.
- [4] 李卫华. HPLC法测定丹栀逍遥丸中芍药苷的含量[J]. 海峡药学, 2001, 13(2):38.
- [5] 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):415-417.

[收稿日期] 2013-09-05 [修回日期] 2013-11-07
[本文编辑] 李睿旻

(上接第109页)

剂的阈剂量;再将供试品10、5、1、0.5、0.25 μmol/L的DMSO溶液,加入到含200 PRP的比色管中,37℃温孵10 min,搅拌40 s后,加入阈剂量的ADP,搅拌下观察5 min内血小板的最大聚集程度,计算血小板聚集的抑制百分率并用回归法求出IC₅₀。结果见表2。

表2 目标化合物的生物活性数据(μmol/L)

化合物	IC ₅₀	化合物	IC ₅₀
9a	0.2	9g	0.9
9b	0.5	9h	1.4
9c	0.1	9i	0.2
9d	2.0	MCI-154	2.5
9e	0.05	CCI-17810	3.3
9f	0.5		

3 讨论

所合成的9个目标化合物均未见文献报道,其结构经元素分析、红外光谱和核磁共振谱所证实,数据见表1。在以乙酰苯胺制备中间体6-(4-氨基苯基)-4,5-二氢-3(2H)吡嗪酮时,反应中间产物可不经精制,直接投入下步反应,简化了操作。在目标化合物制备过程中,把反应液直接倾入到水中,过滤即得目标化合物,避免了文献报道的柱层析等复杂的操作。初步的体外药理结果表明(表2),所有目标化合物都有不同程度的体外抑制ADP诱导的新西兰大白兔血小板聚集作用,且都强于对照化合物MCI-154和CCI-17810。其中化合物9e的活性最

强,IC₅₀为MCI-154的50倍,是CCI-17810的66倍,此外,化合物9a、9c、9i也显示了较强的活性。化合物9e等的作用机制及其他药理作用还有待进一步研究。从上面的药理活性数据来看,R基团引入取代胺基可以增强其血小板聚集的抑制作用,但由于目标化合物的数目有限,难以得出具体的构效关系的结论,有待进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Bristol JA, Sircar L, Moos WH, et al. Cardiotoxic agents 1. 4, 5-dihydro-6-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-3(2H)-pyridazinones: novel positive inotropic agents for the treatment of congestive heart failure[J]. J Med Chem, 1984, 27(9): 1099.
- [2] Yang GM, Liu LM, Xu J. Effects of MIC-154 on vascular reactivity and its mechanisms after hemorrhagic shock in rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 47(6): 751.
- [3] Mikashima H, Nakao T, Goto K. Y-590 (a new pyridazinone derivative), a potent anti-thrombotic agent-I. Effect on platelet function[J]. Thromb Res, 1983, 31(4): 599.
- [4] 王曙东,陈兴东,赵庆杰,等. 吡嗪酮类新衍生物的合成及其对血小板聚集的抑制作用[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5):362.
- [5] 章杰兵,柴晓云,俞世冲,等. 吡嗪酮类新衍生物的合成及其对血小板聚集的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(7):821.
- [6] 王恩思,沈家聪. 新型强心药匹莫苯的合成[J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7(3):185.
- [7] Bom GVR. Aggregation of bloodplatelets by adenosine diphosphate and its reversal[J]. Nature, 1962, 194(4832):927.

[收稿日期] 2013-06-11 [修回日期] 2013-10-16
[本文编辑] 李春德