

# UPLC法测定同仁乌鸡白凤丸中芍药苷的含量

姚令文, 陈佳, 王钢力, 林瑞超

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 用超高效液相色谱法测定同仁乌鸡白凤丸中芍药苷的含量。方法: 参考已有文献方法对原高效液相色谱方法进行转换并优化为超高效液相色谱方法。色谱柱为 Waters ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相: 甲醇-水 (20:80); 流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 232 nm; 柱温: 35 °C。结果: 芍药苷的线性范围为 9.92~99.2 ng (r = 0.9999); 平均回收率 (n = 6) 为 102.0%, RSD 为 2.0%; 1个分析流程大约需要 5 min。结论: 与高效液相色谱法比较, 超高效液相色谱法测定同仁乌鸡白凤丸中芍药苷含量, 既加快了分析速度, 达到了提高分析效率, 节约分析时间的目的, 减少了有机溶剂的使用, 又得到了更高的分析灵敏度。

**关键词:** 超高效液相色谱; 芍药苷; 同仁乌鸡白凤丸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1522-03

## UPLC determination of paeoniflorin in Tongren Wuji Baifeng pills

YAO Ling-wen, CHEN Jia WANG Gang-li LN Rui-chao

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050 China)

**Abstract Objective** To develop an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for the determination of paeoniflorin in Tongren Wuji Baifeng pills. **Methods** A Waters ACQUITY UPLC<sup>TM</sup> BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was adopted with the mobile phase of methanol-water (20:80) at a flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. The detecting wavelength was set at 232 nm, and the column temperature was 35 °C. **Results** The calibration curve of paeoniflorin was linear in the range of 9.92~99.2 ng (r = 0.9999), the mean recovery (n = 6) was 102.0% with RSD 2.0%, the time for a analysis program was about 5 minutes. **Conclusion** Comparing with the HPLC method, the UPLC method for determination of paeoniflorin in Tongren Wuji Baifeng pills increases the analysis speed and efficiency, it can also increase the analysis sensitivity and save the solvents.

**Key words** UPLC; paeoniflorin; Tongren Wuji Baifeng pills

同仁乌鸡白凤丸由乌鸡、地黄、白芍、当归、黄芪等 19 味中药组成, 有补气养血、调经止带之功效, 用于气血两虚、身体瘦弱、腰膝酸软、月经不调、崩漏带下等症<sup>[1]</sup>。目前市售乌鸡白凤丸类产品主要分为药典方和北方方 (清宫秘方) 2 种, 其商品名分别为乌鸡白凤丸和同仁乌鸡白凤丸, 两者处方略有不同。同仁乌鸡白凤丸 (北方方) 是北京同仁堂股份有限公司北京同仁堂制药厂独家生产的国家保密品种, 为卫生部药品标准所收载。

中药的质量控制一直是中药现代化的一项重要内容, 国家和地方多次立项进行这方面的研究, 取得了良好的成果, 对中药的质量提高起到了积极的推

进作用, 同仁乌鸡白凤丸正是在这一背景下由北京市科委立项 (课题号: D0205004040721) 进行研究的, 课题组前期做了大量工作, 本文在已有工作的基础上<sup>[2]</sup>就超高效液相色谱在乌鸡白凤丸质量控制中的应用进行研究, 对原有 HPLC 色谱条件有所优化, 大大缩短了分析时间。笔者以期把这项技术应用到乌鸡白凤丸质量控制中, 提高分析效率, 保证产品质量。

### 1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC<sup>TM</sup> 超高效液相色谱仪: 二极阵列检测器 (PDA), 工作站为 Empower 2。对照品芍药苷由中国药品生物制品检定所提供。试验

所用甲醇为色谱纯,其他溶剂均为分析纯,水为纯净水,过 Millipore 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜。同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)由北京同仁堂股份有限公司北京同仁堂制药厂提供。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC™ BEH  $\text{C}_{18}$  柱 (2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-水 (20:80); 流速: 0.4 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长: 232 nm<sup>[2]</sup>; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 2  $\mu\text{L}$ 。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称芍药苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.06 mg 的溶液<sup>[2]</sup>; 精密吸取此溶液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得每 1 mL 含 0.012 mg 的溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸),研细,精密称取 1 g 精密加入甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,再称重,补足减失重量,滤过<sup>[2]</sup>,取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

**2.4 线性关系考察** 精密称取芍药苷对照品 6.20 mg 置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 含 0.12 mg 的对照品储备溶液。精密吸取对照品储备溶液 0.4 0.8 1.2 4 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取 2  $\mu\text{L}$  注入超高效液相色谱仪,以芍药苷进样量  $X$  (ng) 为横坐标,对相应峰面积  $Y$  为纵坐标进行线性回归处理,得回归方程为:

$$Y = -2.06 \times 10^4 + 7.55 \times 10^6 X \quad r = 0.9999$$

结果表明,芍药苷进样量在 9.92~99.2 ng 范围内线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 精密吸取 0.012 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,芍药苷峰面积的 RSD 为 0.28%。表明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取同一批次的样品 10 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定芍药苷的含量,其平均值为 0.0662%,RSD 为 1.9%。结果表明,本方法的重复性符合要求,适合于同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)中芍药苷的提取和 UPLC 分析。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液分别在 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 h 进样,按上述色谱条件测定峰面积,计算 RSD 为 1.5%,结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 回收率试验** 精密称取已知芍药苷含量 (0.0662%) 的同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)粉末约 0.5 g 共 6 份,分别精密加入 1.284 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 芍药苷对

照品溶液 0.1 mL,按“2.3”项下方法制备供试溶液并测定,计算回收率。结果平均回收率 ( $n=6$ ) 为 102.0%,RSD 为 2.0%。

**2.9 样品的测定** 取 10 批同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别吸取供试品溶液和对照品溶液 (0.012 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 各 2  $\mu\text{L}$ ,注入超高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积,按外标法计算含量,结果见表 1。同时采用 HPLC 法<sup>[2]</sup>测定上述 10 批次的样品,结果(见表 1)表明,UPLC 法和 HPLC 法所测得的同仁乌鸡白凤丸(水蜜丸)中芍药苷含量测定结果一致。色谱图见图 1。

表 1 UPLC 与 HPLC 仪测定同仁乌鸡白凤丸中芍药苷含量结果

Tab 1 Comparison of the determination results of paeoniflbrin in Tongren Wuji Baifeng pills by UPLC and HPLC

| 样品批号<br>(sample No.) | 含量 (content) % |       | 偏差 (deviation) |
|----------------------|----------------|-------|----------------|
|                      | UPLC           | HPLC  | %              |
| 1                    | 0.089          | 0.093 | 2.10           |
| 2                    | 0.091          | 0.094 | 1.62           |
| 3                    | 0.070          | 0.072 | 1.48           |
| 4                    | 0.059          | 0.060 | 0.84           |
| 5                    | 0.054          | 0.054 | 0              |
| 6                    | 0.084          | 0.089 | 2.89           |
| 7                    | 0.068          | 0.071 | 2.16           |
| 8                    | 0.086          | 0.090 | 2.23           |
| 9                    | 0.079          | 0.083 | 2.47           |
| 10                   | 0.080          | 0.084 | 1.25           |

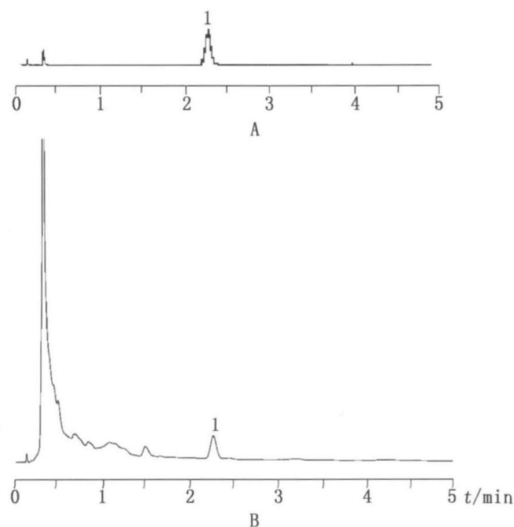


图 1 对照品 (A) 与样品 (B) 色谱图

Fig 1 UPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)  
1. 芍药苷 (paeoniflbrin)

### 3 讨论

**3.1 溶液浓度的选择** 以文献法<sup>[2]</sup>的对照品溶液及供试品溶液浓度为基础,在 UPLC 仪上考察了不同浓度的对照品溶液及供试品溶液,发现将 HPLC 法的对照品溶液及供试品溶液浓度稀释 5 倍,且进样体积为 2  $\mu$ L 时,峰形很好。

**3.2 流动相的选择** 考察了 UPLC 法不同比例的甲醇-水溶剂系统,结果表明将甲醇-水(30:70)<sup>[2]</sup>调整为甲醇-水(20:80)时,分离度很好,峰形也很好。

**3.3 柱温的选择** 考察了 UPLC 法柱温对芍药苷分离度和峰形的影响,结果表明柱温为 35  $^{\circ}$ C 时,芍药苷峰形较好,分离度达到满意。

**3.4 小结** 本试验中以 UPLC 法测定同仁乌鸡白凤丸中芍药苷的含量,按中国药典 2005 年版一部附录中“中药质量标准分析方法验证指导原则”进行了方法学研究,符合要求。本试验比较了 UPLC 仪与 HPLC 仪含量测定结果,可看出 UPLC 仪测定结

果与 HPLC 仪测定结果偏差在规定范围(不超过 3%)以内。将 HPLC 定量方法转换并优化为 UPLC 方法,在保证含量测定结果准确的前提下,与 HPLC 法测定芍药苷比较,样品分析时间从 20 min<sup>[2]</sup>缩短到 5 min,减少了溶剂损耗及废液处置费用,较大地提高了分析效率,节省分析时间和分析成本<sup>[3]</sup>。

### 参考文献

- 1 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China(卫生部药品标准). WS<sub>3</sub>-B-3185-98
- 2 NE Li-xing(聂黎行), WANG Gang-li(王钢力), LIXiang-ri(李向日), et al. HPLC determination of paeonin and denshensu in Tongren W uji Baifeng pills(HPLC 法测定同仁乌鸡白凤丸中芍药苷和丹参素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(3): 354
- 3 Wirth M J. Mass transport in sub-2- $\mu$ m high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2007, 1148(1): 128

(本文于 2009 年 3 月 4 日收到)

## 加拿大卫生部生物制品质量研究中心 (CBR) 主任 Alan Mortimer 博士一行访问中检所

2009 年 8 月 31 日,应中国药品生物制品检定所李云龙所长的邀请,加拿大卫生部生物制品质量研究中心 (CBR) 主任 Alan Mortimer 博士一行 3 人对中检所进行了为期 1 天的友好访问。欢迎大会在中检所多功能厅召开,会议由王军志副所长主持,李云龙所长致开幕词,对到访的 Mortimer 博士一行 3 人表示了热烈的欢迎。所长办公室主任杨昭鹏、国际合作处处长李玲、生检各处室负责人及全体生检体系工作人员参加了本次会议。Mortimer 博士向大家做了专题报告,简要介绍了 CBR 的部门结构、人员组成、职能、业务分工等基本情况。然后他以处理肝素钠污染事件、单克隆抗体不良反应事件、H1N1 疫苗评价和流感疫苗通用抗体检测方法的建立为例,介绍了 CBR 在处理应急事件和突发事件的工作经验,以及与其他实验室(包括中检所)开展合作的情况。会上,由李云龙所长和 Mortimer 主任签署了双方开展 2009-2011 年度合作的工作计划书。会后,在有关人员的陪同下,Mortimer 博士一行 3 人对中检所病毒三室、菌种室和重组技术产品室进行了参观访问。

下午,加拿大专家 Terry D. Cyr 和 Michel Girard 分别报告了应用质谱技术快速鉴别流感疫苗及残留宿主蛋白和应用高效分离技术分析流感疫苗和生物仿制药物。学术报告会就双方共同感兴趣的问题如疫苗、生物仿制药物质量控制展开交流。

详见: [www.nicpbp.org.cn](http://www.nicpbp.org.cn)