

# RP-HPLC法测定气滞胃痛颗粒中 4种成分的含量\*

吴赛伟, 水文波, 葛志伟, 王书芳\*\*

(浙江大学 药物信息学研究所, 杭州 310058)

**摘要** 目的: 建立同时测定气滞胃痛颗粒中白芍药苷、芍药苷、柚皮苷和甘草酸含量的高效液相色谱法。方法: 采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃; 流动相为水 (0.2% 醋酸) - 乙腈 (0.2% 醋酸), 线性梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长为 230 nm (0~15 min), 284 nm (15~20 min), 254 nm (20~35 min)。结果: 白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸浓度分别在 15.1~226 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998), 25.6~383 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998), 27.7~277 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998), 9.43~47.2 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998) 范围内线性关系良好。低、中、高 3 个浓度的平均加样回收率分别为 97.4% ~ 101% (RSD 为 0.8% ~ 1.7%), 96.8% ~ 99.7% (RSD 为 1.4% ~ 2.6%), 97.3% ~ 100% (RSD 为 1.9% ~ 2.4%)。结论: 本方法简便、准确、重复性好, 可以为气滞胃痛颗粒的质量控制提供依据。

**关键词:** 气滞胃痛颗粒; 白芍药苷; 芍药苷; 柚皮苷; 甘草酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)08-1301-04

# HPLC determination of four components in Qizhiweitong granules\*

WU Sai-wei, SHU Wen-bo, GE Zhi-wei, WANG Shu-fang\*\*

(Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract Objective** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of albiflorin, paeoniflorin, naringin and glycyrrhizic acid in Qizhiweitong granules. **Method** The chromatography was performed on a Zorbax SB-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of water (containing 0.2% acetic acid) - acetonitrile (containing 0.2% acetic acid) and linear gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was 230 nm from 0 to 15 min, 284 nm from 15 to 20 min and 254 nm from 20 to 35 min. **Results** The calibration curves of albiflorin, paeoniflorin, naringin and glycyrrhizic acid were linear in the ranges of 15.1~226 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998), 25.6~383 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998), 27.7~277 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998) and 9.43~47.2 μg · mL<sup>-1</sup> (*r* = 0.9998) respectively. The mean recoveries of low, middle and high concentrations of the four components were 97.4% - 101% (RSD = 0.8% - 1.7%), 96.8% - 99.7% (RSD = 1.4% - 2.6%), 97.3% - 100% (RSD = 1.9% - 2.4%). **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be adopted in the quality control of Qizhiweitong granules.

**Key words** Qizhiweitong granules; albiflorin; paeoniflorin; naringin; glycyrrhizic acid; HPLC

气滞胃痛颗粒是由柴胡、白芍、枳壳、炙甘草、香附(炙)、延胡索(炙)组成, 具有舒肝理气、和胃止痛的功效<sup>[1]</sup>。方中柴胡和解少阳, 疏达肝气; 枳壳理气宽中, 行滞消胀; 白芍养血柔肝, 缓急舒挛; 香附行气解郁。柴胡配以枳壳、香附可达舒肝理气、行气解郁的功效, 白芍配伍甘草可达缓急止痛、和血养阴的功效, 加之延胡索以增强止痛功效。整方配伍用于治疗肝郁气滞, 胸痞胀满, 胃脘疼痛。

虽然此药广泛应用于临床<sup>[2]</sup>, 但迄今为止, 测定其中活性成分的仪器分析方法尚未见报道。白芍药苷、芍药苷、柚皮苷和甘草酸是颗粒中含量较高, 药效活性较为明确的 4 种成分, 本文建立高效液相色谱法对这几种成分进行含量测定, 可以为该制剂的质量控制提供依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配自动进样器,

\* 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2005CB523402) 及柴胡与白芍配伍组效学研究课题 (2006Z014) 资助

\*\* 通讯作者 Tel: (0571) 88208426 E-mail: wangsf@zju.edu.cn

G1314A 紫外检测器 (Agilent 1100 色谱工作站); METTLER AE-240 电子天平; KQ-250B 超声波清洗器; TGL-16C 离心机。

气滞胃痛颗粒购于杭州市开心大药房 (北京医药集团辽宁本溪三药有限公司生产); 对照品白芍药苷和甘草酸均由浙江大学药物信息学研究所制得 (经面积归一化法测定, 白芍药苷和甘草酸含量大于 98%), 芍药苷 (批号 110736-200629)、柚皮苷 (批号 110722-200309) 购于中国药品生物制品检定所; 乙腈、醋酸为色谱纯; 水为 Milli-Q 纯水; 中药饮片柴胡 (批号 080707, 产地 内蒙古)、白芍 (批号 050621, 产地 浙江)、枳壳 (批号 060506, 产地 浙江)、制延胡索 (批号 060905, 产地 浙江)、制香附 (批号 061122, 产地 河南)、甘草 (批号 080906, 产地 新疆) 购于杭州中药饮片厂。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 水 (0.2% 醋酸) - 乙腈 (0.2% 醋酸), 线性梯度洗脱 (水相比乙腈相为: 0 min, 90:10; 20 min, 70:30; 30 min, 50:50; 35 min, 10:90); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 230 nm (0~15 min), 284 nm (15~20 min), 254 nm (20~35 min); 进样量: 10 μL。在上述色谱条件下白芍药苷、芍药苷、柚皮苷和甘草酸的分离度都符合含量测定要求。

**2.2 供试品溶液制备** 精密称取气滞胃痛颗粒 0.2 g 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 超声 (250 W, 40 kHz) 1 h, 放冷至室温, 补甲醇至刻度线, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.3 阴性试验** 照中国药典所示工艺制成分别缺白芍、枳壳、甘草的 3 份阴性样品, 再按“2.2”项下方法制备 3 份阴性样品溶液, 在上述色谱条件下吸取 10 μL 进样。结果表明, 阴性样品图谱中, 在与样品图谱中 4 种被测成分相同位置上无峰出现, 表明无阴性干扰。对照品、样品及阴性样品色谱图见图 1。

**2.4 线性关系考察** 分别取对照品白芍药苷约 7.5 mg、芍药苷约 12.5 mg、柚皮苷约 7 mg 和甘草酸约 4 mg 精密称定, 置于不同的 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成含白芍药苷 0.302 mg · mL<sup>-1</sup>、芍药苷 0.511 mg · mL<sup>-1</sup>、柚皮苷 0.277 mg · mL<sup>-1</sup>、甘草酸 0.157 mg · mL<sup>-1</sup> 的单一对照品溶液。对上述的对照品溶液进行稀释, 制备系列浓度的对照品溶液: 白芍药苷为 15.1, 30.2, 60.4, 90.6, 121.15, 151.5

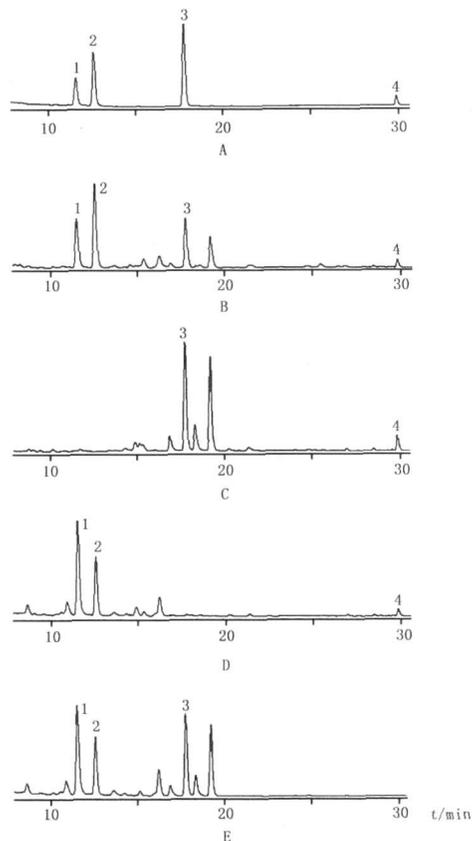


图 1 对照品 (A)、气滞胃痛颗粒 (B)、缺白芍 (C)、缺枳壳 (D)、缺甘草 (E) 阴性样品色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances (A), Qizhi胃痛 granules (B), negative samples without *Paeonia lactiflora* Pall (C), *Citrus aurantium* L (D), and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (E) respectively. 1. 白芍药苷 (albiflorin) 2. 芍药苷 (paeoniflorin) 3. 柚皮苷 (naringin) 4. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)

226 μg · mL<sup>-1</sup>; 芍药苷为 25.6, 51.1, 102, 153, 204, 256, 383 μg · mL<sup>-1</sup>; 柚皮苷为 27.7, 55.4, 83.1, 111, 138, 208, 277 μg · mL<sup>-1</sup>; 甘草酸为 9.43, 14.1, 18.9, 23.6, 28.3, 37.7, 47.2 μg · mL<sup>-1</sup>。在上述色谱条件下进行 HPLC 分析。以峰面积  $Y$  为纵坐标, 浓度  $X$  (μg · mL<sup>-1</sup>) 为横坐标, 进行回归分析, 得白芍药苷、芍药苷、柚皮苷和甘草酸的回归方程依次为:

$$Y = 12.19X - 17.08 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 13.45X - 5.389 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 16.84X + 0.3885 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 65.27X + 3.502 \quad r = 0.9998$$

线性范围依次为 15.1~226, 25.6~383, 27.7~277, 9.43~47.2 μg · mL<sup>-1</sup>。

**2.5 检测限与定量限考察** 配制白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸浓度分别为 1.51, 2.84, 2.77,

1.33  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品混合溶液, 再用甲醇稀释 2 倍, 8 倍, 40 倍, 得 3 份混合溶液, 在上述色谱条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$ 。结果白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸的检测限 ( $SN = 3$ ) 依次为 8.71, 8.50, 0.297, 1.85 ng。定量限 ( $SN = 10$ ) 依次为 29.0, 28.4, 0.989, 6.16 ng。

### 2.6 精密密度试验

**2.6.1 仪器精密密度试验** 取供试品溶液 (批号 20070911), 在上述色谱条件下重复进样分析 6 次, 白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸含量的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.2%, 1.5%, 0.7%, 2.1%。

**2.6.2 日内精密密度试验** 取同一批次气滞胃痛颗粒 (批号 20071006) 6 份, 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 1 d 之内每隔 4 h 取 1 份供试品溶液, 在上述色谱条件下进行分析。白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸含量的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.5%, 1.4%, 1.8%, 2.3%。

**2.6.3 日间精密密度试验** 取同一批次气滞胃痛颗

粒 (批号 20071006), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续 6 d 每天制备 1 份, 在上述色谱条件下进行分析。白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸含量的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.6%, 1.6%, 2.1%, 1.1%。

**2.7 稳定性试验** 取供试品溶液 (样品批号 20070911), 室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定。白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸含量的 RSD ( $n = 7$ ) 分别为 1.3%, 0.4%, 1.3%, 2.5%, 结果表明供试品溶液中白芍药苷、芍药苷、柚皮苷、甘草酸在室温下 24 h 内稳定。

**2.8 回收率试验** 精密称取已知含量的气滞胃痛颗粒 (批号 20071006) 适量, 共 18 份, 按对照品加入量为样品中相应成分含有量的 80%, 100%, 120% 分别准确加入白芍药苷为 0.257  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芍药苷为 0.324  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、柚皮苷为 0.259  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草酸为 0.0888  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品混合溶液适量 (每个浓度水平 6 份)。按“2.2”项下方法制成溶液, 在上述条件下进行分析。回收率结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ( $n = 6$ )

Tab 1 Results of recovery

加样量 (added)	白芍药苷 (albiflorin)		芍药苷 (paeoniflorin)		柚皮苷 (naringin)		甘草酸 (glycyrrhizic acid)	
	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery) %	RSD %
80%	97.4	1.7	101	1.0	100	0.8	101	1.1
100%	99.3	2.0	99.7	2.4	98.5	2.6	96.8	1.4
120%	97.5	1.9	98.9	2.4	100	2.2	97.3	2.1

**2.9 样品含量分析** 精密称取 3 批次气滞胃痛颗粒各 3 份, 按“2.2”项下方法制成溶液, 在上述条件

下进行分析, 根据标准曲线回归方程计算颗粒中 4 种成分的含量, 结果见表 2。

表 2 含量测定结果 ( $n = 3$ )

Tab 2 Results of content

批号 (Lot No.)	白芍药苷 (albiflorin)		芍药苷 (paeoniflorin)		柚皮苷 (naringin)		甘草酸 (glycyrrhizic acid)	
	含量 (content) %	RSD %	含量 (content) %	RSD %	含量 (content) %	RSD %	含量 (content) %	RSD %
20070911	0.225	2.8	0.344	1.8	0.326	0.8	0.0882	1.4
20071006	0.256	2.1	0.325	1.2	0.259	1.0	0.0896	2.4
20071208	0.322	0.7	0.485	2.0	0.218	1.0	0.0791	2.9

## 3 讨论

**3.1 气滞胃痛颗粒复方中含有 6 种药材, 为四逆散 (柴胡、白芍、枳壳、甘草) 的基础上加入延胡索和香附而成, 经试验分析, 柴胡、延胡索及香附中的成分如柴胡皂苷、延胡索乙素等在制剂中含量很低, 不能被有效检测, 而白芍、枳壳和甘草中有效成分具有药**

象, 理论可行, 操作简便。可为气滞胃痛颗粒的质量控制提供依据。

**3.2 中药化学成分极其复杂, 且性质各异。不同的物质具有不同的最大紫外吸收波长, 因此在同一波长下难以对不同成分进行有效检测。白芍药苷和芍药苷在 230 nm 处具有最大紫外吸收<sup>[3,4]</sup>, 而柚皮苷和甘草酸的最大紫外吸收波长分别在 284 nm 和 254 nm<sup>[5,6]</sup>。本研究采用变波长检测法, 对各成分**

在最大紫外吸收波长下进行含量测定,大大提高了检测灵敏度。

3.3 甘草酸为酸性物质,实验表明,流动相中不加酸则甘草酸峰会出现拖尾现象,0.2%的醋酸能明显改善分离效果,对称因子达到0.9,符合含量测定要求。

3.4 实验对提取方法、提取溶剂、溶剂倍量和提取时间进行了考察。选用水和甲醇作为提取溶剂进行比较,采用加热回流提取和超声提取进行比较,并比较了不同溶剂倍量和提取时间的提取效果,结果表明采用50倍量甲醇超声提取1h效果最好,方法简便。

3.5 研究表明不同批次的气滞胃痛颗粒中4种成分的含量存在一定差异,可能与药材来源及生产工艺有关。

#### 参考文献

1 *ChP*(中国药典). 2005. Vol I (一部): 389

- 2 HAN Jing(韩晶). Clinical application of "Qizhi Weitong Granule" (气滞胃痛颗粒临证应用体会). *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2005, 39(12): 28
- 3 YANG Liu(杨柳), XU Shun-jun(许舜军), TIAN Run-tao(田润涛), et al HPLC fingerprinting of Radix Paeoniae Alba(白芍的高效液相色谱指纹图谱研究). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, 42(1): 71
- 4 MENG Ling-dan(孟令丹), CHEN Xiao-hui(陈晓辉), YAO Yan(姚燕), et al RP-HPLC simultaneous determination of contents of paeoniflorin and ferulic acid in Siwu compound preparation (RP-HPLC法同时测定四物合剂中芍药苷和阿魏酸的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(10): 1398
- 5 MA Ling(马玲), LIU Yu(陆宇), ZHAO Jie(赵杰). Determination of naringin in Kangerling granule by HPLC (高效液相色谱测定康儿灵颗粒中柚皮苷的含量). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16(5): 383
- 6 LI Li(李丽), SHI Yong-qing(师永清). Determination of glycyrrhizic acid in Jiawei Huoxiangzhengqi pill by HPLC (HPLC法测定加味藿香正气丸中甘草酸的含量). *China Pharm* (中国药房), 2007, 18(33): 2605

(本文于2009年1月4日修改回)

## 《药物残留溶剂分析》一书出版

胡昌勤 编著 978-7-122-03619-3 16开精装 45.00元 2009-01出版

特点:药品残留溶剂分析是当今药物分析的热点之一,已经成为药品质量控制的重要组成部分,是药品检验实验室的常规检测项目。本书在总结实践经验的基础上,针对药品残留溶剂分析中的常见问题,从理论和实践两方面探讨解决方案。书中简要介绍了残留溶剂控制标准的沿革和残留溶剂分析方法的沿革;较系统地介绍了顶空气相色谱法的原理及其在残留溶剂分析中的应用现状;重点探讨了在药品生产工艺复杂的情况下,如何实现对药品中的残留溶剂进行准确定性问题,以及残留溶剂分析中的快速定量问题;总结了药品残留溶剂测定中的各类常见问题,并提出解决方案;介绍了如何利用计算机辅助优化药品残留溶剂测定中色谱柱、色谱条件的选择等问题;最后探讨了如何制定药典各论品种的残留溶剂检测方法。

读者:本书对从事药物分析,特别是从事药品检验、新药研发等方面的科研工作者有参考和实用价值,亦可作为大专院校高年级学生和研究生色谱分析、药物分析课的参考书。

(摘自化学工业出版社)