

RP-HPLC法同时测定维血宁颗粒中芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇的含量

朱鸿敏, 金艺, 李晶, 鲁樱, 赵怀清*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC法同时测定维血宁颗粒中芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇 4种成分的含量。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈 - 0.1% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 303 nm。结果: 芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇 4种成分浓度分别在 22.3~223, 61.1~611, 6.38~63.8, 4.88~48.8 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r > 0.9995$); 方法平均回收率 ($n = 9$) 分别为 99.5%, 98.6%, 101.5%, 100.2%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可用于维血宁颗粒的质量控制。

关键词: 维血宁颗粒; 芍药苷; 虎杖苷; 麦角甾苷; 白藜芦醇; RP-HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0905-04

RP-HPLC simultaneous determination of paeoniflorin, verbascoside, polydatin and resveratrol in Weixuening granules

ZHU Hong-min, JIN Yi, LI Jing, LU Ying, ZHAO Huai-qing*

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin, polydatin, verbascoside and resveratrol in Weixuening granules by RP-HPLC. **Methods** The analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution in gradient elution mode with a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 35 °C and the UV detection wavelength was 303 nm. **Results** The linear ranges of paeoniflorin, polydatin, verbascoside and resveratrol were 22.3–223, 61.1–611, 6.38–63.8, 4.88–48.8 μg · mL⁻¹ ($r > 0.9995$), respectively. The average recoveries ($n = 9$) of paeoniflorin, polydatin, verbascoside and resveratrol were 99.5%, 98.6%, 101.5% and 100.2%, respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate and reproducible which can be used for the quality control of Weixuening granules.

Key words Weixuening granules; paeoniflorin; polydatin; verbascoside; resveratrol; RP-HPLC

维血宁颗粒收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第五册中, 以虎杖、白芍(炒)、仙鹤草、地黄、鸡血藤、熟地黄、墨旱莲、太子参 8味中药材水提醇沉精制而成。用于血小板减少症及血热所致的出血。现行质量标准中仅对该制剂的性状及颗粒剂通则进行检验, 而含量测定项有文献报道的大黄素、芍药苷及白藜芦醇的单项含量测定^[1-5], 有待进一步完善。

维血宁颗粒方中鸡血藤既补血又活血, 为君药; 熟地黄、生地黄、白芍滋阴补血, 兼清血热, 虎杖清热

凉血, 化瘀散滞, 以上药扶正气益阴血, 凉血热, 能止出血, 共为臣药; 仙鹤草收敛止血, 墨旱莲凉血止血, 太子参益气生血, 三者共为佐使药。本方诸药协同, 有补血活血, 清热凉血, 滋补肝肾, 凉血清热之效。本文选取了臣药: 白芍主要有效成分芍药苷; 熟地黄、生地黄共有的有效成分之一麦角甾苷; 虎杖主要有效成分虎杖苷和白藜芦醇, 对此 4种化学成分进行同时含量测定。结果表明, 本法简便, 专属性强, 重复性好, 可为更好控制维血宁颗粒质量提供科学依据。

* 通讯作者 Tel: (024) 23986250 E-mail: zhaohq1953@126.com

1 仪器与试剂

LC-10AT型高效液相输液泵(日本 Shimadzu 公司), SPD-10A型紫外检测器(日本 Shimadzu 公司), Anastar 色谱工作站(天津科贝尔公司), BS-124S 电子分析天平(北京 Sartorius 仪器系统有限公司), KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), RE-85Z 型旋转蒸发器(上海青浦沪西科学仪器厂), HH-4 电热恒温水浴锅(国华科学仪器厂)。

对照品芍药苷(批号 110736-200630)、虎杖苷(批号 111575-200502)、麦角甾苷(批号 111530-200706)和白藜芦醇(批号 111535-200502)均购自中国药品生物制品检定所;维血宁颗粒(江苏健民制药有限公司,规格:每袋 8 g 批号分别为 061127, 061213, 061248);水为二次重蒸水(自制),乙腈为色谱纯(天津市康科德科技有限公司),磷酸为分析纯(沈阳市东兴试剂厂),乙酸乙酯为分析纯(天津市大茂化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 分别称取对照品芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为 1860, 1910, 290, 370 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照

品储备液。

2.1.2 供试品溶液 取维血宁颗粒混匀研细,取细粉 1.0 g 精密称定,置圆底烧瓶中,加 20 mL 水充分震荡溶解。加入乙酸乙酯 100 mL,振摇 3 min 萃取后,超声 2 min 并轻轻摇晃破乳,分取有机层。水层同法再以 100 mL, 150 mL 乙酸乙酯提取 2 次。合并乙酸乙酯层,减压旋转蒸干,残渣以甲醇溶解并稀释至 5 mL,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方比例分别称取除白芍以外的其余药味,以制备工艺制成相应的阴性样品,按“2.1.2”项下方法操作,制成缺白芍阴性样品溶液;同法制备缺虎杖阴性样品溶液及缺地黄和熟地黄阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸(B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10:90[→] 15.5:84.5; 10~25 min, 15.5:84.5[→] 16:84; 25~35 min, 16:84[→] 17:83; 35~60 min, 17:83[→] 26:74); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 303 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL 。在上述色谱条件下,对照品、样品和阴性对照样品的色谱图见图 1。

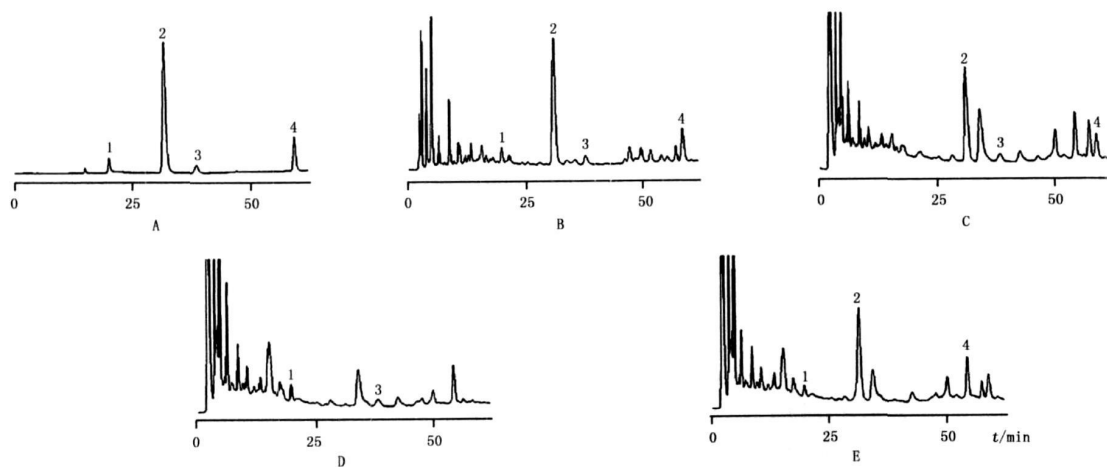


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 对照品 (reference substances) B. 样品 (sample) C. 缺白芍阴性样品 (negative sample without Radix Paeoniae Alba) D. 缺虎杖阴性样品 (negative sample without Rhizoma et Radix Polygoni cuspidati) E. 缺地黄和熟地黄阴性样品 (negative sample without Radix Rehmanniae and Radix Rehmanniae Praeparata)

1. 芍药苷 (paeoniflorin) 2. 虎杖苷 (polydatin) 3. 麦角甾苷 (verbascoide) 4. 白藜芦醇 (resveratrol)

2.3 系统适用性 在上述色谱条件下,芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇的保留时间分别为 19.7, 30.8, 37.7, 58.5 min, 4 种成分色谱峰与相邻

峰的分离度均大于 1.5 理论塔板数按麦角甾苷峰计算不低于 5000 四组分色谱峰对称因子均在 0.95 ~ 1.05 之间,样品中其他成分对芍药苷、虎杖苷、麦

角甾苷和白藜芦醇的测定无干扰。结果见图 1。

2.4 线性关系 精密吸取芍药苷储备液 6.0 mL、虎杖苷储备液 5.0 mL、麦角甾苷储备液 8.0 mL、白藜芦醇储备液 3.3 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品混合溶液 VI (4 种成分浓度分别为: 芍药苷 $223 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 虎杖苷 $611 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 麦角甾苷 $63.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 白藜芦醇 $48.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。分别精密吸取对照品混合溶液 VI 1, 2, 4, 6, 8 mL, 分置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列浓度的对照品混合溶液 I、II、III、IV、V。分别精密吸取上述对照品混合溶液 I ~ VI 各 20 μL 注入色谱仪, 记录色谱图。以色谱峰面积 Y 对对照品浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归。求得芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷、白藜芦醇回归方程分别为:

$$Y = 1.342 \times 10^3 X + 42.13 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 7.832 \times 10^3 X - 17.55 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 4.557 \times 10^3 X - 35.06 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2.042 \times 10^4 X + 119.3 \quad r = 0.9996$$

结果表明, 芍药苷浓度在 $22.3 \sim 223 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 虎杖苷浓度在 $61.1 \sim 611 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 麦角甾苷浓度在 $6.38 \sim 63.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 白藜芦醇浓度在 $4.88 \sim 48.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取对照品混合溶液 III (芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇的浓度分别为 $89.2, 244, 25.5, 19.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在上述色谱条件下重复进样 6 次。计算芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 0.45% , 0.65% , 1.2% , 0.71% 。

2.6 重复性试验 取批号为 061248 的样品, 按“2.1.2”项下方法操作, 平行制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下进样分析。芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇含量的平均值 ($n = 6$) 分别为 $0.317, 0.801, 0.135, 0.0667 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.3% , 0.79% , 1.3% , 1.7% 。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温静置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析。芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 1.4% , 1.2% , 0.8% , 1.3% 。结果表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

2.8 回收率试验 取已知含量的样品 (批号 061213) 约 0.5 g 共 9 份, 精密称定。平均分为 3 组。各组分别按样品中成分含有量与加入分量比

例为 $1:0.5, 1:1, 1:1.5$ 分别精密加入“2.4”项下对照品混合溶液 VI (4 成分浓度分别为: 芍药苷 $223 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 虎杖苷 $611 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 麦角甾苷 $63.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 白藜芦醇 $48.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 各 1, 2, 3 mL, 挥干后, 照“2.1.2”项下方法操作, 在上述色谱条件下进样分析。芍药苷低、中、高 3 种浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 99.8% (RSD = 1.7%), 100.2% (RSD = 1.6%), 99.0% (RSD = 0.67%); 平均值 ($n = 9$) 为 99.7% 。虎杖苷低、中、高 3 种浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 99.3% (RSD = 1.3%), 100.6% (RSD = 1.3%), 98.5% (RSD = 0.48%); 平均值 ($n = 9$) 为 99.5% 。麦角甾苷低、中、高 3 种浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 97.9% (RSD = 2.3%), 98.7% (RSD = 1.3%), 98.5% (RSD = 1.1%); 平均值 ($n = 9$) 为 98.4% 。白藜芦醇低、中、高 3 种浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 98.7% (RSD = 0.75%), 101.0% (RSD = 0.86%), 101.1% (RSD = 2.8%); 平均值 ($n = 9$) 为 100.3% 。

2.9 样品含量测定 取 3 批样品, 每批取 3 份, 按“2.1.2”项方法制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液及对照品混合溶液 III 各 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 外标一点法计算含量。结果见表 1。

表 1 含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

Tab 1 Determination results

批号 (Lot No)	芍药苷 (paeoniflorin)	虎杖苷 (polydatin)	麦角甾苷 (verbascoide)	白藜芦醇 (resveratrol)
061227	0.379(0.52)	0.826(0.59)	0.139(2.6)	0.0685(0.33)
061223	0.373(1.6)	0.828(0.66)	0.137(1.0)	0.0677(0.78)
061248	0.374(0.78)	0.831(0.21)	0.137(1.1)	0.0679(0.50)

注 (note): 括号内为 RSD (RSD in the parenthesis %)

3 讨论

3.1 测定波长的选择 分别用乙腈配制芍药苷、虎杖苷、麦角甾苷和白藜芦醇对照品溶液, 进行紫外扫描。扫描结果显示, 芍药苷在 230 nm 左右有最大吸收, 且随波长增大迅速下降; 麦角甾苷在 330 nm 左右有最大吸收; 而虎杖苷、白藜芦醇的最大吸收波长均为 303 nm 。为兼顾 4 个待测成分使其均有较强吸收, 选择中间波长 303 nm 。

3.2 流动相系统考察 有机相选择甲醇或乙腈; 因待测物均为弱酸性物质, 水相中加入少量酸可调节 pH, 减少拖尾提高灵敏度^[6], 故选择醋酸水溶液 (1% , 2%) 或磷酸水溶液 (0.05% , 0.1% , 0.15%), 进行双相组合筛选。结果显示, 有机相为乙腈时峰

形好,理论塔板数高;而水相为磷酸水溶液时峰形更佳,尤以麦角甾苷最为明显。磷酸水溶液 0.05% 浓度效果较后两者为差,而 0.1% 与 0.15% 浓度效果无明显差异。考虑色谱柱的保护,最终流动相选择乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液系统。

3.3 供试品溶液制备方法的确定 由于白藜芦醇的热稳定性不佳,首选快速高效的超声法^[7]。分别选择不同浓度甲醇水溶液(60%, 80%, 100%)进行不同时间(20 30 40 min)的超声提取。结果显示水 - 甲醇提取效果优于甲醇提取,但颗粒剂型辅料含量大,水 - 甲醇提取所得样品杂质多。因此考虑选择极性相似,且与水不相混溶的有机溶剂萃取去除水溶性杂质。考察了正丁醇、乙酸乙酯、氯仿进行萃取,最后确定乙酸乙酯效果最佳。而进一步试验表明,经甲醇水溶液提取后以乙酸乙酯萃取的供试品溶液制备方法,需经超声、除醇、萃取、浓缩多步,操作复杂,损失较大。由于本待测药品为颗粒剂,可与水形成均匀溶液(除少量混悬物外)。综合考虑,最终将提取方法改进为:样品直接水溶后,以共 12.5 倍体积的乙酸乙酯进行 3 次萃取,合并浓缩乙酸乙酯层得供试品溶液。提取完全,且杂质干扰低。

3.4 破乳方法的选择 乙酸乙酯与水易乳化,本实验水溶液有少量混悬物使此情况较为明显。乳化现象严重降低萃取率且引入杂质。实验考察了冰冻法、温水浴法、超声法、破乳剂法(饱和硫酸钠溶液,异丙醇,乙醇)进行破乳。结果显示,超声法简便效率高、效果好。最后确定样品超声 2 min 并辅以轻轻摇晃破乳,达到良好的分离效果。

3.5 结论 本实验操作简便,分析效率高,同时测定维血宁颗粒中 4 种主要成分的含量,用于控制该制剂质量的同时,可为进一步研究提供依据。

参考文献

- 1 GU Zheng-rong(顾峥嵘), CHENG Chen(承晨). Determination of emodin in Weixuening granule by HPLC(HPLC 法测定维血宁颗粒中大黄素的含量). *Jiangsu Pharm Clin Res*(江苏药学与临床研究), 2005, 13(4): 27
- 2 LI Jian-zhong(李建忠), ZHU Wen-xue(朱文学). Study on the quality standard for Weixuening granule(维血宁颗粒的质量标准研究). *China Pharm*(中国药业), 2005, 14(5): 41
- 3 HUA Xin-nong(华新农), WU Wen-ying(吴文英). Study on the quality standard for Weixuening syrup(维血宁糖浆的质量标准研究). *Int J Tradit Chin Med*(国际中医中药杂志), 2006, 28(3): 159
- 4 ZHENG Jin-hui(郑锦辉), ZHANG Wei-juan(张伟娟). Determination of paeoniflorin in Weixuening by HPLC(HPLC 法测定维血宁中芍药苷的含量). *Strait Pharm J*(海峡药学), 2008, 20(6): 80
- 5 YANG Xiao-yue(杨小月), ZHOU Xi(周熙). Determination of paeoniflorin in Weixuening syrup by RP-HPLC(RP-HPLC 法测定维血宁糖浆中芍药苷的含量). *Chin Magaz Clin Med Prof Res*(中华临床医学研究杂志), 2008, 14(6): 737
- 6 GU Man-cang(谷满仓), QIAN Ya-fang(钱亚芳), LÜ Gui-yuan(吕圭元). Advance study on Radix Paeoniae Alba(白芍的化学成分及质量控制方法研究进展). *Bull Sci Technol*(科技通报), 2006, 22(3): 337
- 7 CHEN Yi-bin(陈易彬), SUN Bao-xiang(孙宝祥), CHEN Jia-xi(陈佳希). Study on the stability in resveratrol in Rhizoma Polygoni Cuspidati(虎杖中白藜芦醇的稳定性研究). *J Chin Med Mater*(中药材), 2007, 30(7): 805

(本文于 2008 年 7 月 23 日收到)