

文章编号: 1006 - 2858(2010)03 - 0216 - 04

RP - HPLC 法同时测定桂枝茯苓胶囊中 3 种成分的含量

马婷婷¹, 陈晓辉¹, 林湘云¹, 果德安², 毕开顺¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海中药现代化研究中心, 上海 201203)

摘要: 目的 建立 RP - HPLC 法同时测定桂枝茯苓胶囊中没食子酸、白芍苷和芍药苷含量。方法 色谱柱: 大连中汇达 C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 - 体积分数为 0.1% 的磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 230 nm, 柱温: 40 °C。结果 没食子酸、白芍苷和芍药苷的线性分别为 0.69 ~ 6.87 mg · L⁻¹ (r = 0.999 6)、0.88 ~ 8.80 mg · L⁻¹ (r = 0.999 6) 和 2.00 ~ 20.00 mg · L⁻¹ (r = 0.999 5)。平均回收率: 没食子酸为 99.7% (RSD = 1.0%, n = 9)、白芍苷为 101.5% (RSD = 1.5%, n = 9)、芍药苷为 100.0% (RSD = 0.7%, n = 9)。结论 此方法可为桂枝茯苓胶囊的质量控制提供方法。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

桂枝茯苓胶囊系汉代张仲景《金匱要略》古方桂枝茯苓丸的改进剂型, 经现代制造工艺精制而成为纯中药制剂, 由桂枝、牡丹皮、桃仁、赤芍和茯苓组成。桂枝温通血脉, 茯苓渗利下行而益心脾之气, 共为君药。丹皮、赤芍合桃仁以化瘀血, 并能清瘀热, 为臣药、佐药。主要药效试验表明, 本品具有抑制血小板聚集, 降低血粘度, 缓解子宫痉挛、镇痛等作用, 能活血化瘀, 缓消症块, 用于治疗妇科血瘀证。现代医学临床广泛用于子宫肌

瘤、慢性盆腔炎及其包块、子宫内膜不规则剥脱之功效, 子宫内膜异位症, 卵巢囊肿、痛经等。《中华人民共和国药典》2005 年版 (一部)^[1] 中收载的桂枝茯苓胶囊, 含量测定项下仅采用气相色谱法对丹皮酚进行了测定, 目前对该制剂质量控制方面的报道^[2-3] 较少。本文作者对桂枝茯苓胶囊中没食子酸、白芍苷和芍药苷 3 个成分进行了同时含量测定 (结构式见图 1), 为完善该制剂的质量控制方法提供参考。

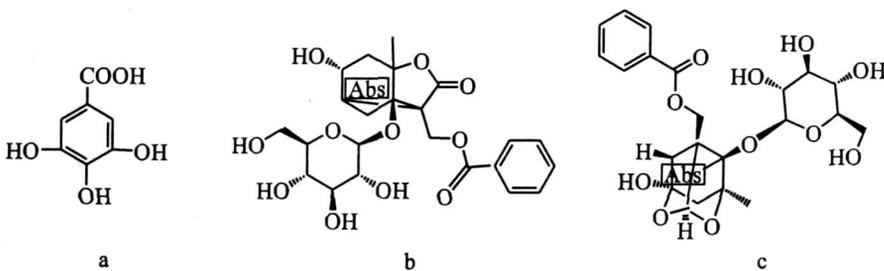


Fig 1 The structure of gallic acid (a), albiflorin (b) and paeoniflorin (c)

1 仪器与材料

LC - 10AT 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 株式会社), SPD - 10A 紫外检测器 (日本 Shimadzu 株式会社), ANASTAR Chromatography Data

System 色谱工作站 (日本 Shimadzu 株式会社), AB135 - S 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 有限公司)。

桂枝茯苓胶囊为市售品 (江苏康缘药业股份有限公司, 批号: 061102, 070121, 080617), 没食子

收稿日期: 2009 - 04 - 27

作者简介: 马婷婷 (1983 -), 女 (汉族), 宁夏银川人, 硕士研究生, E-mail bikaishun@yahoo.com; 毕开顺 (1956 -), 男 (汉族), 河北唐山人, 教授, 主要从事中药质量标准化、中药药效物质基础、药物代谢动力学等方面的研究, Tel 024 - 23986016, E-mail ksbi@mail.sy.ln.cn.

酸、白芍苷和芍药苷(实验室自制,纯度:质量分数大于 98%),甲醇、乙腈(色谱纯),磷酸(分析纯),重蒸馏水自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:大连中汇达 C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相:乙腈-体积分数为 0.1% 的磷酸溶液,梯度洗脱:0~5 min 乙腈由体积分数为 5% 线性增加至 10%、5~15 min 乙腈由

体积分数为 10% 线性增加至 22%、15~30 min 乙腈由体积分数为 22% 线性增加至 30%,流速:1.0 mL·min⁻¹,柱温:40 °C;检测波长:230 nm。

在上述色谱条件下分别取阴性对照溶液、混合对照溶液和供试溶液各 20 μL 进样分析,结果表明理论塔板数按芍药苷计算,不低于 5 000。没食子酸、白芍苷和芍药苷色谱峰分离度良好,与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5,拖尾因子均在 0.95~1.05 之间。阴性对照、混合对照及供试溶液色谱图见图 2。

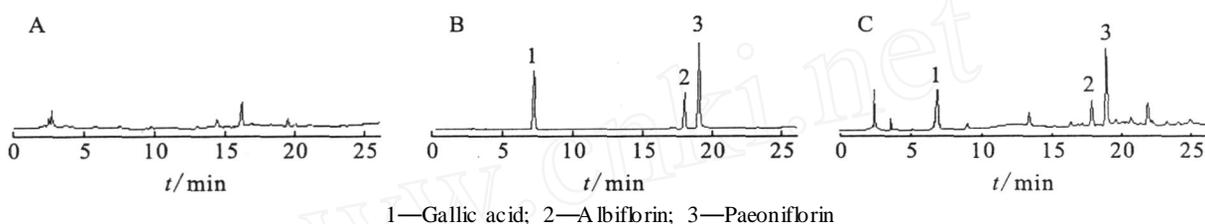


Fig 2 RP-HPLC chromatograms of negative sample(A), reference substance(B) and sample(C)

2.2 对照溶液制备

分别取没食子酸、白芍苷和芍药苷对照适量,精密称定,分置 0.01 L 量瓶中,用体积分数为 70% 的甲醇溶解并稀释至刻度,制成质量浓度分别为没食子酸 0.458、白芍苷 0.440、芍药苷 1.000 g·L⁻¹ 的对照溶液。再分别精密量取各单组分对照溶液适量置于同一 50 mL 量瓶中,加体积分数为 70% 的甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为没食子酸 6.87、白芍苷 8.80、芍药苷 20.00 mg·L⁻¹ 的混合对照溶液。

2.3 供试溶液制备

取桂枝茯苓胶囊 10 粒,将内容物置研钵中研匀。取细粉约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入体积分数为 70% 的甲醇溶液 15 mL,超声 30 min,过滤,用体积分数为 70% 的甲醇溶液洗净残渣,合并滤液,定量转移至 0.1 L 量瓶中,用体积分数为 70% 的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,备用。

2.4 阴性对照溶液制备

按照处方^[1]比例称取除桂枝、牡丹皮和赤芍之外的其它两味药材,制备方法同“2.3”条,作为阴性对照液。

2.5 标准曲线绘制与线性关系

精密量取混合对照溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL,分置 10 mL 量瓶中,用体积分数为 70% 的甲醇溶液稀释至刻度,摇匀。分别取以上溶液各 10 μL,在上述色谱条件下进样分析。以

各成分质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。没食子酸、白芍苷和芍药苷分别在 0.69~6.87、0.88~8.80、2.00~20.00 mg·L⁻¹ 内,Y 与 X 呈良好线性关系。所得回归曲线方程如下:

$$\text{没食子酸 } Y = 4.739 \times 10^4 X - 3.532 \times 10^4, r = 0.9996,$$

$$\text{白芍苷 } Y = 1.754 \times 10^4 X - 1.652 \times 10^3, r = 0.9996,$$

$$\text{芍药苷 } Y = 1.913 \times 10^3 X - 3.225 \times 10^4, r = 0.9995.$$

2.6 精密度试验

取混合对照溶液在上述色谱条件下连续进样 6 次,计算峰面积 RSD,得没食子酸、白芍苷和芍药苷的 RSD 分别为 1.6%、1.8% 和 1.6%,结果表明精密度良好。

取同一批号的桂枝茯苓胶囊(批号 080617)6 份,每份取粉末约 0.1 g,精密称定,按“2.3”条方法操作。在上述色谱条件下进样分析,计算没食子酸、白芍苷和芍药苷含量的 RSD,分别为 0.9%、1.5% 和 1.5%,结果表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试溶液,室温下放置,分别于 0、1、2、4、8、12 h 在上述色谱条件下进样分析,计算没食子酸、白芍苷和芍药苷各时间点峰面积的 RSD,分别为 1.9%、1.0% 和 1.5%,结果表明供试溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验

取已知含量的桂枝茯苓胶囊(批号 080617)9 份,每份取粉末约 0.05 g,精密称定,分别精密加入低、中、高 3 种质量浓度的混合对照溶液,按

“2.3 条方法操作,在上述色谱条件下进样分析,计算平均回收率。各成分加样回收率测定结果见表 1。

Table 1 Results of recoveries(n =9)

Compound	$m_{\text{original}}/\text{mg}$	$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery/%	Mean Recovery/%	RSD/%
Gallic acid	0.251 0	0.156 0	0.406 0	99.4	100.6	1.8
	0.243 1	0.155 6	0.401 3	101.8		
	0.265 2	0.155 3	0.421 7	100.8		
	0.251 8	0.328 1	0.581 1	100.4		
	0.251 6	0.328 6	0.581 2	100.3		
	0.250 6	0.312 0	0.576 4	104.4		
	0.253 2	0.509 3	0.755 1	98.5		
	0.254 0	0.509 8	0.758 4	98.9		
	0.252 8	0.507 2	0.764 5	100.9		
Albiflorin	0.285 5	0.205 1	0.487 4	98.5	100.4	1.4
	0.282 3	0.201 3	0.482 6	99.5		
	0.286 3	0.214 9	0.503 5	101.1		
	0.287 2	0.409 8	0.695 4	99.6		
	0.287 0	0.415 7	0.704 5	100.4		
	0.285 8	0.408 1	0.701 5	101.9		
	0.306 7	0.622 1	0.937 1	101.3		
	0.319 4	0.615 7	0.930 1	99.2		
	0.313 6	0.601 3	0.930 2	102.6		
Paeoniflorin	0.768 5	0.463 6	1.22 2	98.0	99.8	1.6
	0.767 1	0.435 2	1.19 9	99.4		
	0.772 0	0.475 7	1.25 6	101.8		
	0.767 7	0.964 0	1.73 7	100.6		
	0.767 1	0.962 6	1.73 6	100.7		
	0.764 0	0.954 5	1.73 0	101.2		
	0.794 0	1.458 3	2.21 1	97.2		
	0.798 9	1.437 6	2.21 7	98.7		
0.795 2	1.436 7	2.23 8	100.5			

2.9 样品测定

取桂枝茯苓胶囊内容物约 0.1 g,精密称定,

按“2.3 条方法操作,在上述色谱条件下对 3 批桂枝茯苓胶囊进行分析,计算含量,结果见表 2。

Table 2 Contents of gallic acid, albiflorin and paeoniflorin

No	w (gallic acid) /%	w (albiflorin) /%	w (paeoniflorin) /%
080617	0.495 3	0.597 5	1.550
061102	0.516 0	0.602 0	1.456
070121	0.512 4	0.593 0	1.457

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本文作者分别考察了 210、230、242、282 nm 吸收波长图谱,结果表明 230 nm 波长各峰的吸收均较强,图谱特征性强,故选择 230 nm 为检测波长。分别对甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸-水和乙腈-磷酸-水系统进行考察,结果表明乙腈-磷酸-水系统所得的色谱峰峰形好,柱效高,可达到理想的分离度。

3.2 提取溶剂的选择

分别考察了乙醇和甲醇,结果表明甲醇的提取效率较高;并对不同体积分数(20%、50%、70%、100%)的甲醇溶液进行考察,结果表明体积分数为 70% 的甲醇溶液提取效率较高,故采用体积分数为 70% 的甲醇溶液为提取溶剂。

3.3 提取方法的选择

分别考察了超声法与加热回流法,结果表明 2 种方法没有显著差异,故选择简便的超声法提取;并对超声时间(20、30、40 min)进行了考察,结果表明 30 min 即可基本提取完全。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 559.
- [2] 廖正根,凌娅,仲艳,等. HPLC 同时测定精制桂枝茯苓胶囊中 3 种活性成分 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (16): 1252 - 1254.
- [3] 牛筛龙,郭益磊,刘新,等. 高效液相色谱法测定桂枝茯苓胶囊中芍药苷的含量 [J]. 医药导报, 2004, 23 (11): 863.

Simultaneous determination of gallic acid, albiflorin and paeoniflorin in Guizhi Fuling capsules by RP-HPLC

MA Ting-ting¹, CHEN Xiao-hui¹, LIN Xiang-yun¹, GUO De-an², BIKai-shun¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shanghai Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin in Guizhi Fuling capsules (traditional Chinese medicines). **Methods** The separation was carried out on a Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column with a mobile phase of acetonitrile - 0.1% (V/V) phosphoric acid solution under gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was 40 °C. The detection wavelength was set at 230 nm. **Results** The calibration curve was linear within the range of 0.69 - 6.87 mg · L⁻¹ (r = 0.999 6), 0.88 - 8.80 mg · L⁻¹ (r = 0.999 6) and 2.00 - 20.00 mg · L⁻¹ (r = 0.999 5) for gallic acid, albiflorin and paeoniflorin, respectively. The average recoveries were 99.7% (RSD = 1.0%, n = 9), 101.5% (RSD = 1.5%, n = 9) and 100.0% (RSD = 0.7%, n = 9) for gallic acid, albiflorin and paeoniflorin, respectively. **Conclusions** This method is convenient, accurate and reproducible for the determination of gallic acid, albiflorin and paeoniflorin in Guizhi Fuling capsules.

Key words: Guizhi Fuling capsule; quantitative analysis; RP-HPLC