

多种中成药中芍药苷的含量测定

李捷玮¹, 金柔男¹, 李翔², 赵亮¹, 吕磊¹, 费扬¹

(1. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 建立多种中成药中芍药苷的含量测定方法, 为中国药典中含芍药苷的中成药提供一致的测定方法。方法: 采用控温 25℃ 超声处理, 50% 甲醇作为提取溶剂; 高效液相色谱法, 采用 Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (16:84) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 柱温 25℃, 对 5 种剂型 10 个中成药中芍药苷的含量进行测定。结果: 芍药苷浓度在 2.095~335.2 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$); 日内和日间 RSD ($n = 3$) 均 < 0.5%; 最低检测限为 67.02 ng·mL⁻¹; 10 个中成药艾附暖宫丸、复方黄连素片、胃康灵胶囊、加味逍遥丸、抗感颗粒、气滞胃痛颗粒、千金止带丸、十全大补丸、舒肝和胃丸、通天口服液方法重复性的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.0%, 0.69%, 0.76%, 0.37%, 0.63%, 0.57%, 0.65%, 0.33%, 0.62%, 0.60%; 加样回收率 ($n = 6$) 结果分别为 102.1%, 103.4%, 98.64%, 100.6%, 101.6%, 97.32%, 98.49%, 100.8%, 101.2%, 100.1%, RSD 分别为 0.23%, 0.21%, 0.22%, 0.24%, 0.32%, 0.53%, 0.87%, 0.39%, 0.51%, 0.13%。结论: 本法快速简便, 重复性好, 测定结果准确可靠, 能够用于中成药中芍药苷的含量测定。

关键词 高效液相色谱法; 芍药苷; 中成药; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1440-04

Determination of paeoniflorin in traditional Chinese medicine patent preparations

LI Jie-wei¹, JIN Rou-nan¹, LI Xiang², ZHAO Liang¹, LYU Lei¹, FEI Yang¹

(1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

2. College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective To establish and unify a method for the determination of paeoniflorin in traditional Chinese medicine patent preparations. **Methods** The samples were extracted by ultrasonic treatment at 25℃ with 50% methanol. HPLC condition: an Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase consisting of acetonitrile-water (16:84) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detecting wavelength was 230 nm, and the column temperature was 25℃. Ten samples of five dosage forms were determined by this method. **Results** The calibration curve was linear within the range of 2.095–335.2 μg·mL⁻¹ for paeoniflorin ($r = 0.9999$); RSDs of intra-day and inter-day precisions at low, middle and high concentration were all less than 0.5%; The limits of detection was 67.02 ng·mL⁻¹. The reproducibility (RSD, $n = 6$) of Aifu Nuangong pills, compound Huangliansu pills, Weikangling capsules, Jiawei Xiaoyao pills, Kanggan granules, Qizhi Weitong granules, Qianjin Zhidai pills, Shiruan Dabu pills, Shugan Hewei pills, Tongtian oral liquid are 1.0%, 0.69%, 0.76%, 0.37%, 0.63%, 0.57%, 0.65%, 0.33%, 0.62%, 0.60% respectively. The recoveries ($n = 6$) were 102.1%, 103.4%, 98.64%, 100.6%, 101.6%, 97.32%, 98.49%, 100.8%, 101.2%, 100.1%, RSDs were 0.23%, 0.21%, 0.22%, 0.24%, 0.32%, 0.53%, 0.87%, 0.39%, 0.51%, 0.13%. **Conclusion** The method is rapid, accurate, sensitive, reproducible and can be used for the determination of paeoniflorin in traditional Chinese medicine patent preparations.

Key words HPLC; paeoniflorin; traditional Chinese medicine patent preparations; determination

中药白芍为毛茛科植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall) 的干燥根, 具有平肝止痛、养血调经、敛阴止汗等功效^[1]; 中药赤芍 (*Paeonia moutan* Sieber) 为毛茛科植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall) 或川赤芍 (*Paeonia veitchii* Lynch) 的干燥根, 具有清热凉血、散瘀止痛等功效^[1], 均为临床常用中药。芍药苷 (paeoniflorin) 是白芍和赤芍的主要有效成分。目前中国药典 2005 年版一部中成药中芍药苷的含量测定方法多为高效液相色谱法, 但前处理条件和色谱条件均较为烦琐费时, 且均不一致^[1]。本文选取 5 种不同剂型 10 个含白芍或赤芍成分的中成药, 通过改进中国药典 2005 年版一部中成药中芍药苷的含量测定方法, 使测定方法更为快速、准确, 操作简便, 能较好地控制中成药中芍药苷的质量。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 HPLC 仪 (在线脱气机、四元泵、自动进样器, 二极管阵列检测器); ChemStation 色谱工作站, 十万分之一电子天平 (AE240 型, 瑞士梅特勒公司); 医用数控超声仪 (KQ-250DE 型, 昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 736-9407); 样品包括 5 个水丸剂: 艾附暖宫丸 (每 100 粒重 10 g)、加味道遥丸 (每 100 粒重 6 g)、千金止带丸 (每袋装 6 g)、十全大补丸 (每 8 丸相当于原药材 3 g)、舒肝和胃丸 (每 100 丸重 20 g), 2 个颗粒剂: 抗感颗粒 (每袋 10 g)、气滞胃痛颗粒 (每袋装 5 g), 1 个片剂: 复方黄连素片 (每片含盐酸小檗碱 30 mg), 1 个胶囊剂: 胃康灵胶囊 (每粒装 0.4 g), 1 个液体制剂: 通天口服液 (每瓶 10 mL), 均购自上海雷允上药店; 水为娃哈哈纯净水; 甲醇为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯 (Fisher)。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液 取芍药苷对照品 8.43 mg 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 即得 335.2 μg·mL⁻¹ 芍药苷对照品母液。精密吸取上述对照品母液适量, 逐级稀释得浓度为 83.8 41.9 20.95 8.38 4.19 2.095 μg·mL⁻¹ 的芍药苷对照品溶液, 置于 4℃ 冰箱保存。

2.2 供试品溶液 分别取艾附暖宫丸、复方黄连素片去糖衣、胃康灵胶囊内容物、加味道遥丸、抗感颗粒、气滞胃痛颗粒、千金止带丸、十全大补丸、舒肝和胃丸适量, 研细, 各取约 2 g; 精密吸取通天口服液 3 mL, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇, 50

mL, 密塞, 称定重量, 控温 25℃ 超声处理 (功率 90 W, 频率 50/60 kHz) 45 min, 放冷, 再称定其重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 将所得 10 份溶液统一配制成浓度约 30 μg·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

3 色谱条件

色谱柱: Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (16:84); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 230 nm; 柱温: 25℃; 进样量: 10 μL。

溶剂甲醇、335.2 μg·mL⁻¹ 对照品溶液、供试品溶液的色谱图见图 1-A、B、C。从图 1 可见辅料和试剂对主药测定无干扰, 芍药苷峰的保留时间约为 9.65 min, 按芍药苷峰计算理论塔板数不低于 13000, 分离度均大于 1.5。

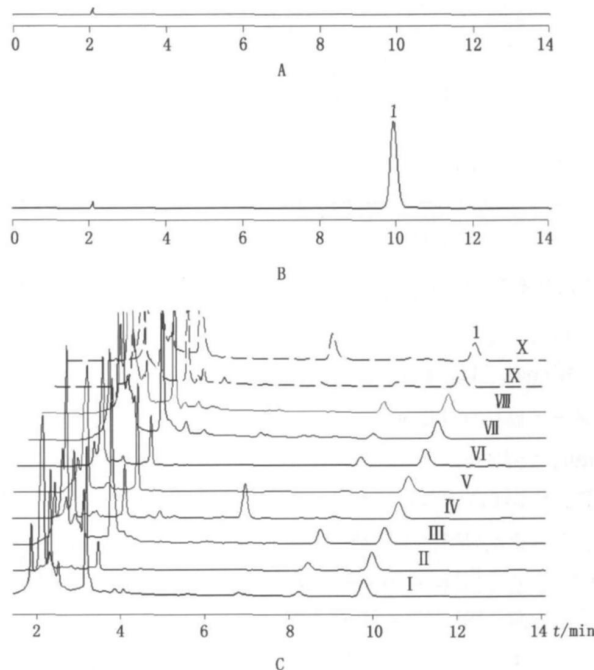


图 1 溶剂甲醇 (A)、对照品溶液 (B) 及供试品溶液 (C) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of methanol solvent (A), reference substance solution (B), and samples solution (C)

I. 艾附暖宫丸 (Aifu Nuangong pills) II. 复方黄连素片 (compound Huanglian su pills) III. 胃康灵胶囊 (Weikangling capsules) IV. 加味道遥丸 (Jiawei Xiaoyao pills) V. 抗感颗粒 (Kanggan granules) VI. 气滞胃痛颗粒 (Qizhi W胃痛 granules) VII. 千金止带丸 (Qianjin Zhidai pills) VIII. 十全大补丸 (Shiquan Dabu pills) IX. 舒肝和胃丸 (Shugan Hwei pills) X. 通天口服液 (Tongtian oral liquid)

1. 芍药苷 (paeoniflorin)

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 分别将“2.1”项下不同浓度的对照品溶液按“3”项下色谱条件依次连续进样,以对照品溶液的浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对峰面积(Y)进行线性回归,得回归方程:

$$Y = 14.03X + 7.744 \quad r = 0.9999$$

结果表明芍药苷浓度在 $2.095 \sim 335.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系。

4.2 精密度试验 分别配制浓度为 $2.095, 20.95, 335.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 种浓度的芍药苷对照品溶液,按“3”项下条件分别每天重复进样测定 3 次,连续测定 3 d 根据所得峰面积分别计算日内、日间精密度。结果芍药苷对照品溶液低、中、高 3 个浓度的日内和日间精密度的 RSD 分别为 $0.22\%, 0.11\%, 0.13\%$ 和 $0.80\%, 0.39\%, 0.41\%$, 表明此方法测定芍药苷的精密度良好。

4.3 检测限考察 将芍药苷对照品溶液进行稀释,以 $SN = 3:1$ 计,确定其最低检测限为 $67.02 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法分别制备艾附暖宫丸、复方黄连素片、胃康灵胶囊、加味逍遥丸、抗感颗粒、气滞胃痛颗粒、千金止带丸、十全大补丸、

舒肝和胃丸、通天口服液 10 种供试品溶液,在 $0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 \text{ h}$ 分别测定芍药苷的峰面积,考察其含量的变化。结果芍药苷峰面积的 RSD 分别为 $0.81\%, 0.61\%, 0.40\%, 0.98\%, 0.56\%, 0.76\%, 0.85\%, 0.43\%, 0.37\%, 0.66\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.5 重复性试验 按“2.2”项下方法平行制备艾附暖宫丸、复方黄连素片、胃康灵胶囊、加味逍遥丸、抗感颗粒、气滞胃痛颗粒、千金止带丸、十全大补丸、舒肝和胃丸、通天口服液的供试品溶液各 6 份,按“3”项下条件分别测定芍药苷的峰面积,计算,平均含量分别为 $1.42, 8.91, 3.20, 3.98, 16.89, 3.46, 0.71, 1.71, 0.86, 0.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 为 $1.0\%, 0.69\%, 0.76\%, 0.37\%, 0.63\%, 0.57\%, 0.65\%, 0.33\%, 0.62\%, 0.60\%$

4.6 加样回收率试验 精密称定已知含量的艾附暖宫丸、复方黄连素片、胃康灵胶囊、加味逍遥丸、抗感颗粒、气滞胃痛颗粒、千金止带丸、十全大补丸、舒肝和胃丸、通天口服液各 6 份,每份 1 g (或 1.5 mL),置 50 mL 具塞锥形瓶中,分别加入芍药苷对照品溶液适量,按“2.2”项下方法制备成所需溶液,按“3”项下色谱条件分别测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Determination results of recoveries

样品名称 (sample)	样品含量 (sample content) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ $\text{or} \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	加入量 (added) / mg	回收率 (recoveries) / %	RSD / %
艾附暖宫丸 (Aifu Nuangong pills)	1.39	0.28	102.1	0.23
复方黄连素片 (compound Huangliansu tablets)	8.74	0.07	103.4	0.21
胃康灵胶囊 (Weikangling capsules)	3.23	0.14	98.6	0.22
加味逍遥丸 (Jiawei Xiaoyao pills)	3.89	0.14	100.6	0.24
抗感颗粒 (Kanggan granules)	16.73	0.035	101.6	0.32
气滞胃痛颗粒 (Qizhi Weitong granules)	3.38	0.14	97.3	0.55
千金止带丸 (Qianjin Zhide pills)	0.73	0.7	98.5	0.87
十全大补丸 (Shiquan Dabu pills)	1.76	0.28	100.8	0.39
舒肝和胃丸 (Shugan Hwei pills)	0.82	0.7	101.2	0.51
通天口服液 (Tongtian oral liquid)	0.46	0.7	100.1	0.13

5 样品测定

分别配制 10 个中成药的供试品溶液,每个样品平行操作 3 份,按“3”项色谱条件进样分析,以外标法计算样品含量,结果见表 2,均符合 2005 年版中国药典中标示量含量的规定。

6 讨论

6.1 前处理条件考察

6.1.1 溶剂的考察 结合中国药典 2005 年版中的

方法,考察了甲醇、乙醇、50% 甲醇、稀乙醇作为溶剂进行提取并测定,结果含量有一定差异。甲醇、乙醇提取的溶出成分中杂质较多,而 50% 甲醇提取的杂质峰较少,待测组分的峰形最好且芍药苷的含量最高,故确定以 50% 甲醇为提取溶剂。

6.1.2 提取方法及时间的考察 试验中对比考察了恒温加热蒸馏法和超声提取法,结果表明经超声提取法测得的芍药苷含量明显较高。同时在以 50%

表 2 样品测定结果表 ($n = 3$)
Tab 2 Determination results of samples

样品 (samples)	批号 (Lot No.)	含量 (content) /mg·g ⁻¹ or mg·mL ⁻¹	RSD /%
艾附暖宫丸 (Aifu Nuangong pills)	4030083	1.41	0.82
复方黄连素片 (compound Huangliansu tablets)	55050006	8.63	0.43
胃康灵胶囊 (Weikangling capsules)	20061253	3.19	0.43
加味逍遥丸 (Jiawei Xiaoyao pills)	7083912	3.91	0.48
抗感颗粒 (Kanggan granules)	060901	16.82	0.53
气滞胃痛颗粒 (Qizhi Weitong granules)	20070103	3.36	0.90
千金止带丸 (Qianjin Zhidai pills)	070725	0.72	0.12
十全大补丸 (Shiquan Dabu pills)	20061110	1.78	0.60
舒肝和胃丸 (Shugan Hewei pills)	6033796	0.84	0.52
通天口服液 (Tongtian oral liquid)	0612017010	0.46	0.10

甲醇作为提取溶剂的前提下,考察了不同超声时间 15, 30, 45, 60 min 所提取的芍药苷含量,结果以 45 min 含量最高,60 min 反而有所下降,可见温度对芍药苷的测定影响较大。加热蒸馏及超声时间过长产生的热量均可破坏芍药苷成分。据有关文献报道^[2],芍药苷在含水溶液中会因受热而不稳定,因其本身结构中含有苯甲酸酯键,在有水的条件下受热易分解或受其他成分的干扰,故含量降低,但超声过程中的产热温度一般不会超过 65℃。

6.2 色谱条件考察

6.2.1 流动相的考察 结合中国药典 2005 年版一部,和相关文献报道^[3-6],对不同比例的甲醇-水和乙腈-水体系选择比较。结果除乙腈-0.1% 磷酸溶液对加味逍遥丸、抗感颗粒、气滞胃痛颗粒分离效果较差外,以甲醇-水和乙腈-水体系为流动相时样品中芍药苷均能与其他杂质峰完全分离,且分离度均大于 1.5。但乙腈-水体系的分析时间比甲醇-水体系短 3 min 左右,且峰形对称。同时实验过程中发现选择乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液作为流动相对四元泵有影响,容易发生盐沉积,导致压力增高,故最终确定流动相为乙腈-水 (16:84)。

6.2.2 其他色谱条件考察 确定流动相组成和比例后,对柱温、流速、色谱柱等色谱条件进行了考察,最终确定了“3”项下的色谱条件,所得结果重现性好,精密度高,分析快速准确,分离效果佳。

6.3 方法优势小结 中国药典 2005 年版一部中共收载含芍药苷成分的处方制剂达 46 种,部分前处理条件采用加热回流、柱色谱^[6]、有机溶剂萃取等方式提取,流动相也采用了 8 种不同体系,不仅操作过

程复杂,易导致芍药苷受热分解使含量降低,且不同方法间的测定结果差异较大。本文采用控温 25℃ 超声处理方式,以 50% 甲醇作为提取溶剂,乙腈-水为流动相,提取方法简单,分析快速,精密度高,重现性好,并有效地减少了环境污染,为统一芍药苷的含量测定提供了参考依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 Vol I (一部): 68, 109, 298, 336, 389, 411, 428, 471, 518, 534, 585, 634
- 2 YAN Xing-li(闫兴丽), ZHANG Jian-jun(张建军), LI Xiao-yan(李小燕), et al. Stability influence of temperature on paeoniflavin in Radix Paeoniae, extract of Radix Paeoniae and Qiankunqing granules(温度对白芍药材、白芍提取物及乾坤清颗粒成品中芍药苷含量稳定性的影响). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(2): 131
- 3 WANG Yan-ling(王燕玲), CHEN Yan-fen(陈燕芬). Content determination of paeoniflavin of Shiquandabu pill(十全大补丸中芍药苷的含量测定). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31(11): 942
- 4 CHANG Li-ying(常丽影), HE Yu-fang(赫玉芳), NAN Min-lun(南敏伦), et al. Determination of paeoniflavin in Weikangling capsule by HPLC(高效液相色谱法测定胃康灵胶囊中芍药苷的含量). *Lishichen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16(7): 596
- 5 YANG Li(杨丽). Determination of paeoniflavin of Qianjinzhidai pills by HPLC(HPLC 法测定千金止带丸中芍药苷的含量). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2007, 21(6): 422
- 6 JIA Shan-xue(贾善学), DOU Zhong-hua(窦忠花), CHEN Zhizhong(陈志忠). Content determination of paeoniflavin of Shiquandabu pill with reversed-phase HPLC(高效液相色谱法测定十全大补丸中芍药苷的含量). *Her Med* (医药导报), 2002, 21(11): 735

(本文于 2009 年 5 月 11 日修改回)