

· 研究报告 ·

HPLC 法测定扶正平消胶囊中芍药苷的含量

付振贺, 赵 亮, 周 瑾, 王新霞, 张国庆, 黄玉凤 (第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

[摘要] **目的** 建立扶正平消胶囊中芍药苷含量的测定标准。**方法** 采用 HPLC 法进行含量测定, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-5 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液(10:90), 流速: 1.0 ml/min, 柱温: 25 °C; 检测波长: 230 nm, 进样量 10 μl, 运行时间 25 min。**结果** 芍药苷在 25.0~500.0 μg/ml 范围内线性关系良好($r=0.9999$), 线性方程: $Y=12.65X+43.54$, 平均加样回收率为 92.69%, RSD 为 1.77%。**结论** 该方法操作易行、结果可靠、重复性好, 可用于扶正平消胶囊中芍药苷的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱; 扶正平消胶囊; 芍药苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2018)01-0068-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.014

Determination of paeoniflorin in Chinese traditional herbal preparation Fuzheng-pingxiao capsule using HPLC method

FU Zhenhe, ZHAO Liang, ZHOU Jin, WANG Xinxia, ZHANG Guoqing, HUANG Yufeng (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To determine the content of paeoniflorin in Fuzhengpingxiao capsule by HPLC method. **Methods** The content of paeoniflorin were determined by HPLC, and the column was an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was acetonitrile and 5 mmol/L sodium dihydrogen phosphate (10:90), and the flow rate was set at 1 ml/min. Column temperature was 25 °C, detection wavelength was 230 nm, injection volume was 10 μl, and running time was 25 min. **Results** Paeoniflorin was linear ($r=0.9999$) in the concentration of 25.0-500.0 μg/ml, the linear equation was $Y=12.65X+43.54$, and the average recovery was 92.69% with RSD value was 1.77%. **Conclusion** The method was easy to operate, reliable and reproducible, which could be used in the determination of paeoniflorin in FuzhengPingxiao capsule.

[Key words] HPLC; FuzhengPingxiao capsule; paeoniflorin; determination

扶正平消胶囊是由黄芪、当归、全蝎、蜈蚣、吴茱萸、桃仁、浙贝母、白芍等二十八味中药组成的复方制剂, 具有扶正祛邪、活血散结的功效。第二军医大学附属东方肝胆外科医院曾对原方进行过较为深入的基础和临床研究, 证明其能延长肝癌鼠的生存期, 用于治疗肝脏肿瘤多年, 且临床效果较好^[1]。白芍的有效成分为芍药苷、白芍苷、氧化芍药苷和苯甲酰芍药苷等苷类化合物, 简称白芍总苷。芍药苷为白芍总苷的主要成分, 具有镇静、解痉、抗炎、抗应激性溃疡、扩张冠脉血管、对抗急性心肌缺血以及抑制血小板凝聚等多方面的作用^[2-4]。参考相关文献^[5-7],

本研究采用 HPLC 法对扶正平消胶囊中的芍药苷含量进行测定, 为该方的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、ChemStation B 02.01 色谱工作站; METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); SB 3200-T 超声发生器(上海科导超声仪器公司)。

1.2 试剂

芍药苷(批号: 23180-57-6, 上海诗丹德生物科技有限公司)。乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司), 水为超纯水。扶正平消胶囊(批号: 20160501, 本院制剂室)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

[基金项目] 军队医疗机构制剂单品种研究; 扶正平消胶囊标准研究(14TG0700)

[作者简介] 付振贺, 本科, 药师, Tel: (021)81875574, Email: fuzhenhe0798@qq.com

[通讯作者] 黄玉凤, 本科, 主管药师, Tel: (021)81875575, Email: huangyufeng2013@126.com

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈-5 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液(10:90),流速:1.0 ml/min,柱温:25℃,检测波长:230 nm;进样量:10 μl,运行时间:25 min。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取芍药苷对照品 10.0 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 1.000 mg/ml 对照品储备液。按比例进行逐级稀释,配制浓度分别为 500、200、100、50、25、2、1 μg/ml 系列对照品溶液,置于 4℃ 冰箱保存,备用。

2.3 样品溶液的制备

取扶正平消胶囊 10 粒,去壳取内容物,混匀,精密称取胶囊内容物 1 g,置于 25 ml 锥形瓶中,加水 10 ml,超声(50 kHz,120 W)提取 60 min,提取液滤纸过滤后,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

除芍药苷药材饮片外,取处方量其余 27 种药材饮片,按处方工艺制备阴性对照样品,并按“2.3”项下方法制备阴性对照样品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 系统适用性

取对照品溶液,按“2.1”项下进样分析,得液相色谱图,见图 1B,1 号峰芍药苷保留时间为 19.42 min,色谱峰对称性为 1.03,塔板数>5 000。

2.5.2 专属性试验

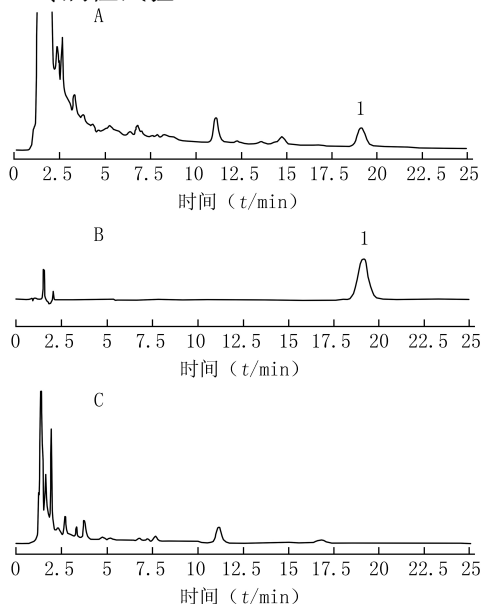


图1 芍药苷 HPLC 图

A. 供试品溶液;B. 对照品(100.0 μg/ml)溶液;
C. 阴性样品溶液;1. 芍药苷

取阴性样品溶液及供试品溶液进样,记录色谱图,结果见图 1C、1A。结果表明,芍药苷色谱峰与其他各成分色谱峰得到较好的分离,阴性对照无干扰。

2.5.3 线性关系

取不同浓度系列对照品溶液,按“2.1”项下进样。每个浓度点平行进样 3 针,以芍药苷溶液的浓度(X)为横坐标,芍药苷色谱峰面积值(Y)为纵坐标,进行线性回归处理,得回归方程: $Y=12.65X+43.54$, $r=0.9999$ 。结果表明芍药苷在 25.0~500.0 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.5.4 定量限和检测限

将低浓度对照品溶液稀释多次,按“2.1”项下进样,以信噪比为 10 时(S/N=10)为最低定量限,结果显示该方法的定量限为 2.0 μg/ml;当信噪比为 3 时(S/N=3)为最低检测限,该方法的检测限为 1.0 μg/ml。

2.5.5 精密度试验

取低(25.0 μg/ml)、中(100.0 μg/ml)、高(500.0 μg/ml)3 个浓度对照品溶液各 10 μl,1 d 内早、中、晚各进样 1 次,记录芍药苷色谱峰面积,考察日内精密度,结果显示日内精密度<2%;取低(25.0 μg/ml)、中(100.0 μg/ml)、高(500.0 μg/ml)3 个浓度对照品溶液各 10 μl 进样,连续 3 d 测定,每天早、中、晚各进样 1 次,记录峰面积,考察日间精密度,结果显示该方法日间精密度<2%,具体数据见表 1。

2.5.6 重复性试验

精密称取同一批次扶正平消胶囊样品,按“2.3”项下方法平行制备 6 份,按“2.1”项下进样分析,测得芍药苷的平均含量为 0.103% (RSD 为 0.53%, $n=6$),结果表明该方法的重复性良好,具体结果见表 2。

2.5.7 稳定性试验

按“2.3”项下方法操作,制备样品溶液,分别在 0、4、8、12、24、48 h 测定样品溶液中芍药苷的含量,考察样品常温放置稳定性,芍药苷 RSD 为 1.29% ($n=6$),结果表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5.8 加样回收率试验

取扶正平消胶囊粉末 0.5 g,精密称定,平行操作 6 份,分别加入对照品溶液 1 ml(含芍药苷 0.5 mg/ml),按“2.3”项下方法操作,按“2.1”项下进样分析,结果芍药苷的平均加样回收率为 92.69% (RSD 为 1.77%, $n=6$),结果表明该方法回收率良好,具体数据见表 3。

表1 日内及日间精密度试验

质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	日内精密度			日间精密度				
	峰面积	平均值	RSD(%)	d 1	d 2	d 3	平均值	RSD(%)
25.0	322.5	332.7	0.11	322.5	329.8	332.5	328.4	1.74
	323.1			323.1	325.9	334.7		
	322.5			322.5	326.3	338.1		
100.0	1 257	1 268	1.18	1 257	1 270	1 304	1 286	1.94
	1 262			1 262	1 263	1 315		
	1 285			1 285	1 299	1 324		
500.0	6 368	6 630	0.56	6 368	6 310	6 370	6 350	0.98
	6 298			6 298	6 313	6 367		
	6 326			6 326	6 303	6 497		

表2 重复性试验结果

称量 (m/g)	测定浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1.002	103.3	0.103	0.103	0.53
1.003	102.4	0.102		
1.015	103.6	0.102		
1.004	103.7	0.103		
1.011	104.4	0.103		
1.009	102.6	0.102		

表3 加样回收率试验结果(n=6)

称量 (m/g)	原有量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
0.501	0.516 0	0.500 0	0.980 2	92.84	92.69	1.77
0.504	0.519 1	0.500 0	0.993 6	94.90		
0.511	0.526 3	0.500 0	0.991 0	92.94		
0.506	0.521 2	0.500 0	0.976 2	91.00		
0.509	0.524 3	0.500 0	0.977 3	90.60		
0.507	0.522 2	0.500 0	0.991 4	93.84		

2.6 样品含量测定

取3个批号的扶正平消胶囊各10粒,按“2.3”项下方法操作,另按“2.2”项下配制标准曲线溶液,分别取上述溶液10 μl 注入高效液相色谱仪,记录峰面积,将样品峰面积代入标准曲线线性方程计算供试品溶液的含量,测定结果见表4。

表4 芍药苷含量测定结果

批号	样品称量 (m/g)	测得含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	平均含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	每粒含量 ($\mu\text{g}/\text{粒}$)	RSD (%)
20160501	1.002	1 032	1 030	257.5	0.61
20160502	1.003	1 023			
20160601	1.015	1 035			

3 讨论

3.1 检测波长的确定

参照文献^[8-12],将对照品、供试品及阴性对照品溶液在180~360 nm的波长下扫描,对照品、供试品溶液在230 nm的波长处均有一吸收峰,而阴性对照品溶液没有,故确定230 nm为检测波长。

3.2 流动相的考察

参考文献^[13-15],比较了两种乙腈-5 mmol/L磷酸二氢钠水溶液(体积比分别为10:90、30:70)和一种甲醇-5 mmol/L磷酸二氢钠水溶液(体积比10:90)的流动相体系,最终选择第1个体系,该体系可使各成分得到较好的分离,满足定量分析的要求。

3.3 提取溶剂的选择

分别用甲醇、乙醇、水^[16]和乙腈作为样品的提取溶剂,发现水的干扰性小,有利于定量。

3.4 样品含量下限的确定

根据制剂含量测定结果,芍药苷的含量为257.5 $\mu\text{g}/\text{粒}$,《中华人民共和国药典(一部)》2015年版规定白芍药材的芍药苷含量不少于1.2%,按处方投料量计算芍药苷的含量应不少于360 $\mu\text{g}/\text{粒}$,按制备转化率50%计算,应不少于180 $\mu\text{g}/\text{粒}$ 。综合考虑待测成分在制剂生产过程中的转化率及稳定性等因素,暂定扶正平消胶囊每粒(0.25 g)中芍药苷的含量不低于180 μg 。

本研究采用HPLC法对中药复方制剂扶正平消胶囊中的主要成分芍药苷进行定量测定,操作简便、快速,结合原有的质量标准可以更好的对扶正平消胶囊进行质量控制。

【参考文献】

[1] 吕磊,李玲,田文君,等. 中药复方扶正平消胶囊挥发油成分的GC-MS分析[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(5): 353-356.

- 137.
- [6] Wadei HM, Textor SC. Hypertension in the kidney transplant recipient[J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2010, 24(3): 105-120.
- [7] Rezzani R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies[J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2004, 39(2):85-128.
- [8] Kamel M, Kadian M, Srinivas T, et al. Tacrolimus confers lower acute rejection rates and better renal allograft survival compared to cyclosporine [J]. *World J Transplant*, 2016, 6(4):697-702.
- [9] Franke GH, Trampenau C, Reimer J, et al. Switching from cyclosporine to tacrolimus leads to improved disease-specific quality of life in patients after kidney transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(5):1293-1294.
- [10] Videla CO. Two-year experience with tacrolimus in renal transplantation after late conversion from cyclosporine therapy[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(6):2659-2663.
- [11] Margreiter R, Pohanka E, Sparacino V, et al. Open prospective multicenter study of conversion to tacrolimus therapy in renal transplant patients experiencing ciclosporin-related side-effects[J]. *Transpl Int*, 2005, 18(7):816-823.
- [12] 黄晓宁, 陈小娟, 李 勇. 肾移植术后患者应用他克莫司与环孢素 A 发生急性排斥反应的 Meta 分析[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16(5):636-639.
- [13] Tao Y, Hu L, Li S, et al. TraniLAST prevents the progression of chronic cyclosporine nephrotoxicity through regulation of transforming growth factor β /Smad pathways[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(5):1985-1988.
- [14] Seeland S, Török M, Kettiger H, et al. A cell-based, multiparametric sensor approach characterises drug-induced cytotoxicity in human liver HepG2 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(3):1109-1120.
- [15] Cond SAP, Bastos MG, Vieira BJ, et al. Down-regulation of transforming growth factor beta-2 expression is associated with the reduction of cyclosporin induced gingival overgrowth in rats treated with roxithromycin: an experimental study [J]. *BMC Oral Health*, 2009, 9(1):33.
- [16] Al-Hamilly NS, Radwan LR, Abdul-Rahman M, et al. Biological roles of KGF, CTGF and TGF- β in cyclosporine-A- and phenytoin-induced gingival overgrowth: A comparative experimental animal study. [J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 66:38-43.
- [17] 余爱华, 辛华雯, 吴笑春, 等. 环孢素和他克莫司对肾移植后发生糖尿病的影响研究[J]. *中国药师*, 2011, 14(4):521-523.
- [18] Sinangil A, Celik V, Barlas S, et al. New-onset diabetes after kidney transplantation and pretransplant hypomagnesemia [J]. *Prog Transplant*, 2016, 26(1):55-61.
- [收稿日期] 2017-02-20 [修回日期] 2017-06-30
[本文编辑] 李睿旻

(上接第70页)

- [2] 苏显中, 于 敏, 李 明, 等. HP20 树脂分离纯化赤芍抑菌活性成分的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(20):12067-12069.
- [3] 向楚兵, 倪彩霞, 陈 林, 等. 赤芍二基原药材的抗炎、镇痛作用比较研究 [J]. *中药与临床*, 2011, 2(1):46-48.
- [4] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. *中国药物警戒*, 2012, 9(2):100-103.
- [5] 李 静. HPLC 测定舒胃颗粒中芍药苷的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(4):349.
- [6] 肖 焕, 马再鸿. HPLC 测定养血当归片中芍药苷的含量 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2012, 10(2):154-155.
- [7] 杨媛媛, 马晓康, 顾政一, 等. 不同产地新疆赤芍中芍药苷的含量测定 [J]. *医药导报*, 2008(7):763-764.
- [8] 钟美霞, 肖佳尚, 劳海燕. HPLC 法测定通络胶囊中芍药苷的含量 [J]. *广东药学院学报*, 2007(3):252-253.
- [9] 杨金草. HPLC 谱法测定清肺平喘口服液中药药苷的含量 [J]. *临床合理用药杂志*, 2009, 2(13):71-72.
- [10] 尹宁宁, 徐华玲, 徐丽华. 白芍中芍药苷含量测定影响因素的实验研究 [J]. *中国医药导报*, 2009, 6(11):43-44.
- [11] Shin HK, Seo CS. Simultaneous determination of nine marker compounds in the traditional Korean medicine, Dangguisusan by high-performance liquid chromatography [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(43):555-561.
- [12] Sumino M, Saito Y, Ikegami F, et al. A simultaneous determination of principal compounds in tokishakuyakusan by high-performance liquid chromatography with diode array detector [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(2):320-324.
- [13] 龚 青, 鲁 敏, 戚雁飞. 高效液相色谱法测定小儿肠胃康颗粒中芍药苷的含量 [J]. *医药导报*, 2008, 27(3):328-329.
- [14] 陈 赉. 煎煮法提取赤芍中芍药苷的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(3):645-646.
- [15] 解江纯, 刘志东, 田 慧, 等. 芍药苷稳定性研究 [J]. *天津中医药*, 2010, 27(4):344-345.
- [16] 董明纲, 郭春燕, 张 力, 等. 赤芍中芍药苷提取溶剂的选择 [J]. *四川中医*, 2006, 24(6):35-37.
- [收稿日期] 2017-04-10 [修回日期] 2017-12-29
[本文编辑] 陈盛新