

HPLC-DAD 法测定银屑优化颗粒中芍药苷、甘草苷、落新妇苷、迷迭香酸和甘草酸

李松¹, 王蓓¹, 浦香兰¹, 狄恒建²

1. 江阴天江药业有限公司, 江苏 江阴 214434

2. 江苏省食品药品检验所, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 建立同时测定银屑优化颗粒中芍药苷、甘草苷、落新妇苷、迷迭香酸和甘草酸 5 种成分的 HPLC-DAD 测定方法。方法 采用高效液相色谱波长切换法。Lichrospher C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长在 230、254、290 nm 切换; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样体积 10 μL。结果 5 种成分的线性关系良好。芍药苷在 69.12~691.20 ng 线性关系良好, 平均加样回收率为 97.45%, RSD 值为 1.54%; 甘草苷在 39.02~390.20 ng 线性关系良好, 平均加样回收率为 97.10%, RSD 值为 1.90%; 落新妇苷在 30.03~300.30 ng 线性关系良好, 平均加样回收率为 99.98%, RSD 值为 1.22%; 迷迭香酸在 7.82~78.20 ng 线性关系良好, 平均加样回收率为 100.83%, RSD 值为 1.36%; 甘草酸在 31.09~310.90 ng 线性关系良好, 平均加样回收率为 97.52%, RSD 值为 1.49%。结论 本方法具有方法简便、快速、准确等特点, 可同时测定银屑优化颗粒中 5 种活性成分。

关键词: 银屑优化颗粒; 芍药苷; 甘草苷; 落新妇苷; 迷迭香酸; 甘草酸; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)04-0373-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.04.011

Determination of paeoniflorin, liquiritin, astiblin, rosmarinic acid, and glycyrrhizic acid in Yinxie Youhua Granules by HPLC-DAD

LI Song¹, WANG Bei¹, PU Xiang-lan¹, DI Heng-jian²

1. Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangyin 214434, China

2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish a quantification method to determine paeoniflorin, liquiritin, astiblin, rosmarinic acid, and glycyrrhizic acid in Yinxie Youhua Granules by HPLC-DAD method. **Methods** The components were determined by HPLC simultaneously with changing ultraviolet-visible wavelength. The column was Lichrospher C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution in gradient elution mode. The detection wavelength was set at 230, 254 and 290 nm. The injection volume was 10 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. The temperature of column was set at 30 °C. **Results** The calibration curves of five active components were excellent. Paeoniflorin had a good linearity in the range of 69.12 — 691.20 μg and its average recovery was 97.45% with RSD of 1.54%. Liquiritin had a good linearity in the range of 39.02 — 390.20 μg and its average recovery was 97.10% with RSD of 1.90%. Astiblin had a good linearity in the range of 30.03 — 300.30 μg and its average recovery was 99.98% with RSD of 1.22%. Rosmarinic acid had a good linearity in the range of 7.82 — 78.20 μg and its average recovery was 100.83% with RSD of 1.36%. Glycyrrhizic acid had a good linearity in the range of 31.09 — 310.90 μg and its average recovery was 97.52% with RSD of 1.49%. **Conclusion** The established method is convenient and accurate with a satisfactory separation and high sensitivity. It can be used to determine the five components in Yinxie Youhua Granules with the same chromatogram condition.

Key words: Yinxie Youhua Granule; paeoniflorin; liquiritin; astiblin; rosmarinic acid; glycyrrhizic acid; HPLC-DAD

银屑优化颗粒为医院制剂, 由赤芍、紫草、肿节风等 7 味中药组成, 临床上主要用于治疗银屑病, 效果良好。原质量标准中未建立测定项目, 较难有效地控制产品质量, 另外仅测定其中的某一个指标

收稿日期: 2013-12-06

作者简介: 李松 (1969—), 男, 高级工程师, 研究方向: 中药复方质量标准。Tel: (0510)86408091 E-mail: lis@tianjiang.com

成分,也不能全面反映产品全貌。因此本实验采用高效液相色谱切换波长法同时测定银屑优化颗粒中芍药苷、迷迭香酸、甘草酸、甘草苷和落新妇苷 5 种成分,以期用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱仪,配备四元梯度洗脱泵、在线脱气器、自动进样器、DAD 检测器、柱温箱(美国 Agilent 公司)。KQ—250B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),AE—240 型十万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

芍药苷(批号 110736-200527)、迷迭香酸(批号 111871-201001)、甘草苷(批号 111610-201005)、落新妇苷(批号 111798-200901)和甘草酸铵(批号 110731-200615)对照品均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

银屑优化颗粒及缺赤芍、甘草、土茯苓、肿节风的阴性对照样品均由江阴天江药业有限公司提供,5.5 g/袋。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Lichrospher-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱,见表 1;检测波长切换为 0~20 min 为 230 nm、20~50 min 为 290 nm、50~70 min 为 254 nm;体积流量为 1 mL/min;柱温为 30 °C;进样体积 10 μL。

表 1 梯度洗脱表

Table 1 Gradient elution mode

| t/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|-------|---------|---------|
| 0~15 | 14 | 86 |
| 15~50 | 14→24 | 86→76 |
| 50~70 | 24→60 | 76→40 |

2.2 溶液的制备

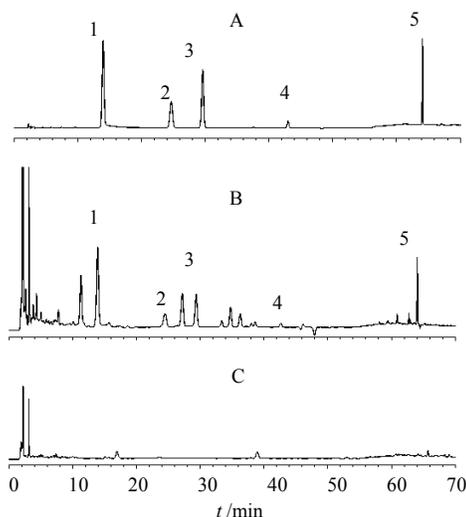
2.2.1 对照品溶液的制备 取芍药苷、迷迭香酸、甘草酸、落新妇苷、甘草酸铵对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为芍药苷 69.12 μg/mL、落新妇苷 30.03 μg/mL、甘草苷 39.02 μg/mL、迷迭香酸 7.82 μg/mL、甘草酸铵 31.09 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品适量,研细,取约 0.5 g,精密称定,加 70%乙醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取缺赤芍、甘草、土茯苓、肿节风等药味的阴性样品 0.5 g,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取供试品溶液、阴性对照溶液和混合对照品溶液,按上述色谱条件测定,记录色谱图,结果见图 1。可知芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸与相邻的组分均达到基线分离,阴性对照在与芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸相对应的保留时间处无色谱峰出现。



1-芍药苷 2-甘草苷 3-落新妇苷 4-迷迭香酸 5-甘草酸
1-paeoniflorin 2-liquiritin 3-astiblin 4-rosmarinic acid
5-glycyrrhizic acid

图 1 混合对照品(A)、银屑优化颗粒(B)和阴性对照溶液(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Yinxie Youhua Granules (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

取混合对照品溶液,分别精密吸取 1、2、4、6、8、10 μL,按上述色谱条件,注入液相色谱仪,记录峰面积值。以进样质量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,进行拟合,得回归方程。芍药苷: $Y=1\ 209.32 X+11.21$, $r=0.999\ 9$; 迷迭香酸: $Y=3\ 027.1 X+27.35$, $r=0.999\ 9$; 甘草苷: $Y=2\ 031.82 X+11.28$, $r=0.999\ 8$; 落新妇苷: $Y=1\ 223.45 X+6.74$,

$r=1.000\ 0$; 甘草酸: $Y=587.28\ X+11.71$, $r=0.999\ 7$ 。结果表明芍药苷进样量在 69.12~691.20 ng、迷迭香酸进样量在 7.82~78.20 ng、甘草苷进样量在 39.02~390.20 ng、落新妇苷进样量在 30.03~300.30 ng、甘草酸进样量在 31.09~310.90 ng 线性关系良好。

2.5 精密度试验

分别精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸的峰面积值, 计算得芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸的峰面积值的 RSD 值分别为 0.56%、0.86%、0.42%、0.23%、0.71%。

2.6 稳定性试验

取批号 1303325 银屑优化颗粒样品制备的供试品溶液, 按上述色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样, 记录色谱峰面积, 结果芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸的峰面积值的 RSD 值分别为 1.02%、1.58%、0.84%、0.65%、0.43%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取银屑优化颗粒样品 (批号 1303325) 适量, 研细, 取约 0.5 g, 平行 6 份, 精密称定, 制备供

试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 结果芍药苷的质量分数为 8.58 mg/g, RSD 值为 1.69%, 迷迭香酸的质量分数为 0.243 mg/g, RSD 值为 1.81%, 甘草苷的质量分数为 2.913 mg/g, RSD 值为 1.52%, 落新妇苷的质量分数为 0.776 mg/g, RSD 值为 1.76%, 甘草酸的质量分数为 6.31 mg/g, RSD 值为 1.58%。

2.8 加样回收率试验

取批号 1303325 银屑优化颗粒样品适量, 研细, 取约 0.5 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别加入芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸对照品 4.285、0.125、1.440、0.390、3.109 mg, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果平均加样回收率分别为 97.45%、100.83%、97.10%、99.98%、97.52%, RSD 值分别为 1.54%、1.36%、1.90%、1.22%、1.49%。

2.9 样品测定

取不同批次的银屑优化颗粒, 制备供试品溶液, 并按上述确定色谱条件测定峰面积值。另精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 同法测定, 按外标法分别计算样品中芍药苷、迷迭香酸、甘草苷、落新妇苷、甘草酸的质量分数, 结果见表 2。

表 2 银屑优化颗粒中 5 种活性成分的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of five active components in Yinxie Youhua Granules ($n=3$)

| 批号 | 芍药苷 | | 迷迭香酸 | | 甘草苷 | | 落新妇苷 | | 甘草酸 | |
|---------|--|-------|--|-------|--|-------|--|-------|--|-------|
| | 质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | RSD/% |
| 1303223 | 8.42 | 1.02 | 0.22 | 1.13 | 2.79 | 0.79 | 0.81 | 1.35 | 6.28 | 0.75 |
| 1303224 | 8.51 | 0.58 | 0.26 | 1.45 | 2.84 | 0.84 | 0.74 | 1.51 | 6.21 | 0.89 |
| 1304225 | 8.58 | 0.96 | 0.24 | 1.05 | 2.91 | 1.01 | 0.78 | 1.24 | 6.31 | 0.91 |

3 讨论

3.1 检测成分的选择

银屑优化颗粒为复方制剂, 方中药味较多, 其中赤芍、土茯苓、肿节风等为方中君药, 甘草为方中调和药。赤芍中含有的芍药苷、土茯苓中含有落新妇苷、肿节风中含有的迷迭香酸、甘草中含有的甘草苷、甘草酸。这些成分均为复方中的主要有效成分, 现代研究证明, 此类成分的药理作用与此复方的传统功效相吻合, 因此测定此复方制剂中 5 种成分, 对于控制银屑优化颗粒的产品质量具有重要的意义。

3.2 检测波长的确定

鉴于不同的成分在不同的波长处有最大吸收, 为了能够使不同的成分在同一色谱条件下均能检测出来。本实验采用检测波长切换的方式, 根据不同的成分选择其最大吸收波长或接近其最大吸收波长作为检测波长。结果芍药苷选择 230 nm 作为检测波长, 甘草苷、迷迭香酸、落新妇苷选择 290 nm 作为检测波长, 甘草酸选择 254 nm 作为检测波长, 均取得了理想的效果^[1-7]。

3.3 色谱条件的选择

银屑优化颗粒为复方制剂, 所含化学成分复杂,

不同成分之间性质差异比较大,为了使各成分能达到基线分离,选择不同的溶剂系统如乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.1%磷酸作为流动相进行梯度洗脱,结果表明:以乙腈-0.1%磷酸系统作为流动相,银屑优化颗粒中的各个成分均能达到很好的分离效果。

3.4 提取溶剂的选择

分别考察了稀乙醇、50%甲醇、70%乙醇、70%甲醇、甲醇作为提取溶剂,分别测定样品中各成分,考虑到溶剂的毒性大小及不同成分的理论板数,最终确定 70%乙醇作为提取溶剂。

参考文献

- [1] 陈有军,赵瑞芝,赵 荧,等. HPLC-PDA 法测定银屑灵流膏中五种成分的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(9): 1522-1525.
- [2] 苏雪清,黄燕萍. HPLC 测定消炎灵片中异秦皮啶的含有量 [J]. 黑龙江医药, 2009, 22(1): 16-18.
- [3] 张广财,张 朔,李可强,等. 高效液相色谱波长切换法同时测定肿节风中多指标成分的含有量 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23): 2051-2052.
- [4] 张小娟,冯育林,刘海燕,等. RP-HPLC 法测定肿节风饮片中异秦皮啶和迷迭香酸 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1917-1919.
- [5] 柏 冬,范 斌,牛晓红,等. HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 387-390.
- [6] 张小娟,冯育林,刘海燕,等. RP-HPLC 法测定肿节风饮片中异秦皮啶和迷迭香酸 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1917-1919.
- [7] 李伟东,蔡宝昌. HPLC 法测定通塞脉微丸中甘草苷、甘草素和阿魏酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 599-601.