

白芍中芍药苷测定方法的比较

凌宁生, 孙 婕, 李 林*

(天津中新药业集团股份有限公司, 天津 300122)

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 主产于浙江、四川等省, 收载于《中华人民共和国药典》(简称药典) 2000 版一部, 用于治疗血虚肝旺的眩晕、头痛, 肝气不和的胁痛、腹痛、四肢痉挛、血虚萎黄、月经不调、自汗、盗汗等症。本实验以芍药苷为白芍质量控制指标, 采用高效液相色谱(HPLC)法进行测定, 并在实验中考察了影响芍药苷含量的处理方法, 选定最佳提取方法, 此法操作简便、稳定性好、结果准确可靠, 较药典法更加简便。

1 仪器与试剂

Waters™ 600E 液相色谱仪, Waters™ 486 紫外检测器, 超声波清洗机[天鹏电子新技术(北京)有限公司]。芍药苷对照品(购自中国药物生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 0736-200219), 白芍由天津市中药饮片厂提供。乙腈为色谱纯, 乙醇为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 230 nm; 流动相: 乙腈-水-冰醋酸(16 84 0.5); 柱温: 室温; 进样体积: 5 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取芍药苷对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 使成 0.528 mg/mL 的溶液; 称取芍药苷对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 使成 0.610 mg/mL 的储备液。

2.3 线性关系考察: 取对照品溶液, 分别进样 1、2.5、5、10、15、20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积对进样量进行线性回归, 经计算得回归方程: $Y = 1.389 \times 10^6 X + 1.234 \times 10^5$, $r = 0.9998$ 。结果表明, 芍药苷在 0.528~10.56 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 测定方法: 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定, 芍药苷色谱峰的保留时间为 12.94 min, 色谱图见图 1。

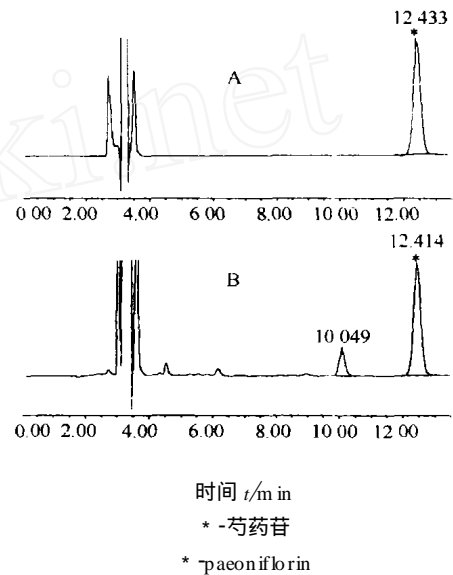


图 1 芍药苷对照品(A)和白芍(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of paeoniflorin reference substance (A) and Radix Paeoniae Alba (B)

2.5 影响条件的考察:

2.5.1 提取溶剂的考察: 称取白芍细粉约 0.2 g, 4 份, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 分别加入甲醇、70% 乙醇、50% 乙醇、30% 乙醇至近刻度, 浸泡 4 h, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 稀释至刻度, 摇匀, 滤过。取续滤液, 进样 5 μL, 测定芍药苷含量, 结果芍药苷质量分数分别为 1.17%、2.56%、2.57%、2.56%, 表明 50% 乙醇提取完全, 因此选取 50% 乙醇作为提取溶剂。

2.5.2 溶剂体积考察: 称取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 乙醇至近刻度, 浸泡 4 h, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。称取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入 50% 乙醇至近刻度, 浸泡 4 h, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。取供试品溶液 5 μL 进样, 测定峰面积, 计算芍药苷含量, 结果芍药苷质量分数分别为 2.57%、2.51%, 表明 10 mL 溶剂可以提取完全, 采用 10 mL 作为提取溶剂量。

2.5.3 提取方法考察: 称取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 10 mL, 称定质量, 置水浴回流 2 h, 取出, 放冷, 以 50% 乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。称取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 乙醇至刻度, 浸泡 24 h, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。称取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 乙醇至近刻度, 浸泡 4 h, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 加入 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。称取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 乙醇至近刻度, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 加入 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。取供试品溶液 5 μ L 进样测定, 计算芍药苷含量, 结果回流 2 h, 冷浸 24 h, 浸泡超声 30 min, 超声 30 min 所得芍药苷质量分数分别为 2.45%、2.59%、2.53%、2.56%, 表明采用 0.2 g 样品 50% 乙醇, 10 mL 超声 30 min 为最佳方法。

2.5.4 提取时间考察: 取白芍细粉约 0.2 g, 3 份, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50% 乙醇至近刻度, 分别超声处理 20、30、40 min, 取出, 放冷, 加入 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液。取供试品溶液 5 μ L 进样测定, 计算芍药苷含量, 结果超声处理 20、30、40 min 所得芍药苷质量分数分别为 2.48%、2.57%、2.50%, 表明超声 30 min 可提取完全。

2.6 供试品溶液的制备: 取白芍细粉约 0.2 g, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇至近刻度, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取滤液, 即得。

2.7 精密度试验: 取对照品溶液, 进样 5 μ L, 重复进样 5 次, 计算峰面积, 结果 RSD = 0.97%。

2.8 稳定性试验: 取供试品溶液, 每隔 1 h 进样 5 μ L, 进样 5 次, 测定峰面积, 结果样品 4 h 内稳定性良好, RSD = 1.00%。

2.9 重现性试验: 称取白芍细粉约 0.2 g, 平行 5 份, 制备供试品溶液, 进样 5 μ L, 结果芍药苷平均质量分数为 2.54%, RSD 为 1.18%。

2.10 回收率试验: 取白芍细粉 (批号: 200302) 约

0.1 g, 共 5 份, 精密称定, 分别精密加入芍药苷对照品储备液 (0.610 0 mg/mL) 4 mL, 加 50% 乙醇至近刻度, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液作为供试品溶液, 外标法测定芍药苷含量, 进样体积 5 μ L, 记录色谱图。结果平均回收率为 95.66%, RSD = 1.20%。

2.11 样品测定结果: 称取不同批号的白芍样品, 制备供试品溶液, 进样 5 μ L 外标法计算芍药苷含量, 结果见表 1。

表 1 两种方法所得白芍中药药苷含量的比较 (n = 2)

Table 1 Comparison of paeoniflorins in Radix Paeoniae Alba obtained by two methods (n = 2)

样 品	芍药苷/%	
	本法	药典法
2002	2.53	0.80
20030407	2.93	1.02
030620	2.52	1.62
安徽	2.50	1.62
浙江	2.74	1.20
河北	3.38	2.20

3 讨论

3.1 芍药苷对照品溶液 400~ 190 nm 进行紫外扫描, 结果芍药苷对照品紫外吸收图谱与文献^[1]记载一致。

3.2 试验结果表明本试验采用的 0.2 g 样品 50% 乙醇定容至 10 mL 样品浓度比药典采用的 0.5 g 样品定容到 20 mL 样品浓度高; 10 mL 提取含量测定高于 25 mL 提取结果, 可能由于超声后溶剂体积膨胀降温后不能回到原状态, 再加入溶剂至刻度, 实际量瓶中溶剂应少于 10 mL, 溶液浓度大于理论浓度, 而且 0.2 g 样品在 10 mL 溶剂中所占体积比大于在 25 mL 溶剂中的体积比, 对溶液浓度影响也相对较大, 也可能是试验误差造成浓度差异; 但 10 mL 溶媒提取未使芍药苷达到过饱和, 10 mL 溶剂可以提取完全, 可将样品中的芍药苷完全溶出, 因而采用 10 mL 作为提取溶剂量。

3.3 本实验方法较药典方法操作更加简便, 节省时间, 稳定性好, 准确度高, 建议药典修改时采用 50% 乙醇作为提取溶媒, 乙腈-水-冰醋酸 (16 : 84 : 0.5) 作为流动相, 以便更好的控制饮片质量。