

HPLC 法测定消肿接骨贴中芍药苷

张金红¹, 房德敏^{1*}, 虎冲², 高颖¹, 赵薇¹, 冯鑫¹, 郑榕¹, 王巨存¹

1. 天津医院, 天津 300211

2. 天津医科大学临床医学院, 天津 300270

摘要: 目的 建立消肿接骨贴中芍药苷测定的方法。方法 采用高效液相色谱法外标法测定。采用 Thermo C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸 (12:88); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 25 °C; 进样量 10 μL。结果 芍药苷进样量在 0.124 8~1.248 0 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 98.94%, RSD 值为 1.73% ($n=6$)。结论 本研究方法专属性强, 灵敏度高, 简便、准确、重现性好, 可用于消肿接骨贴中芍药苷的测定。

关键词: 消肿接骨贴; 芍药苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0197-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.024

Determination of paeoniflorin in Xiaozhong Jiegu Plaster by HPLC

ZHANG Jin-hong¹, FANG De-min¹, HU Chong², GAO Ying¹, ZHAO Wei¹, FENG Xin¹, ZHENG Rong¹, WANG Ju-cun¹

1. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

2. Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300270, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of paeoniflorin in Xiaozhong Jiegu Plaster. **Methods** The content of paeoniflorin was determined by HPLC with external standard method. Thermo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.1% orthophosphoric acid (12:88) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 230 nm and the column temperature was 25 °C. The injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of paeoniflorin was 0.124 8 — 1.248 0 μg ($r=0.999\ 8$) with an average recovery of 98.94% (RSD=1.73%, $n=6$). **Conclusion** The established method is specific, sensitive, simple, accurate, reproducible, and suitable for the quality control of paeoniflorin in Xiaozhong Jiegu Plaster.

Key words: Xiaozhong Jiegu Plaster; paeoniflorin; HPLC

消肿接骨贴为以我院临床经验方为基础, 经过现代制备工艺制备而成的中药复方制剂, 由骨碎补、续断、羌活、川芎、赤芍、黄芪、冰片等 18 味中药经提取、精制而成, 具有舒筋活血、化瘀、补肾壮骨、促进骨折愈合、消肿止痛之功效, 临床上对各种类型的骨折、跌打损伤和骨质疏松等症均具有显著的疗效。赤芍作为消肿接骨贴的药效组分之一, 具有清热凉血、散瘀止痛之功效, 用于热入营血、温毒发斑、吐血衄血、目赤肿痛、肝郁胁痛、经闭痛经、癥瘕腹痛、跌扑损伤、痈肿疮疡等症^[1]。现代药理研究表明, 赤芍主要作用于心血管系统及血液系统, 具有抗血栓形成、抗血小板聚集、调血脂

和抗动脉硬化作用^[2]。赤芍中化学成分有单萜类、三萜类、儿茶素类等, 其中主要有效成分为总苷类化合物, 包括芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷等萜类化合物, 芍药苷占总苷 70%以上^[3]。为了更好地控制消肿接骨贴的内在质量, 确保用药安全有效, 本实验建立了采用 HPLC 法测定消肿接骨贴中芍药苷的方法。

1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪, 512 HPLC 泵, 486 紫外检测器, Millennium 2010 色谱工作站; BL-220H 型岛津电子天平。

芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批

收稿日期: 2012-12-18

作者简介: 张金红 (1983—), 女, 药师, 硕士研究生, 研究方向为临床药学与中药制剂。Tel: (022)28322056 E-mail: zjh83@yahoo.cn

*通信作者 房德敏, 女, 主任药师, 研究方向为药事管理与临床药学。Tel: (022)28317052 E-mail: fdm-wx@sohu.com

号 110736-200934); 消肿接骨贴 (天津医院药剂科制剂室提供, 规格 9 cm×9 cm, 批号 20120113、20120126、20120218); 乙腈为色谱纯, 水为经二次蒸馏的纯化水 (天津医院药剂科制剂室制备), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸 (12:88); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 25 °C; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取经五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷对照品约 10 mg, 精密称定, 置于 50 mL 干燥的棕色量瓶中, 加适量甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 3 mL 置 10 mL 干燥的棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (含芍药苷 62.4 μg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备

取消肿接骨贴 10 片, 弃去背衬, 称定质量, 剪碎, 取膏贴约 4 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 取出, 放置至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

照处方组成, 取除赤芍外的其余各药材投料, 按相同生产工艺和“2.3”项下方法制成缺赤芍的阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

取芍药苷对照品、消肿接骨贴样品和阴性对照溶液, 进样测定, 结果在上述色谱条件下, 阴性对照无干扰, 消肿接骨贴中芍药苷峰与相邻成分的色谱峰可达基线分离, 分离度大于 1.5, 色谱图见图 1。

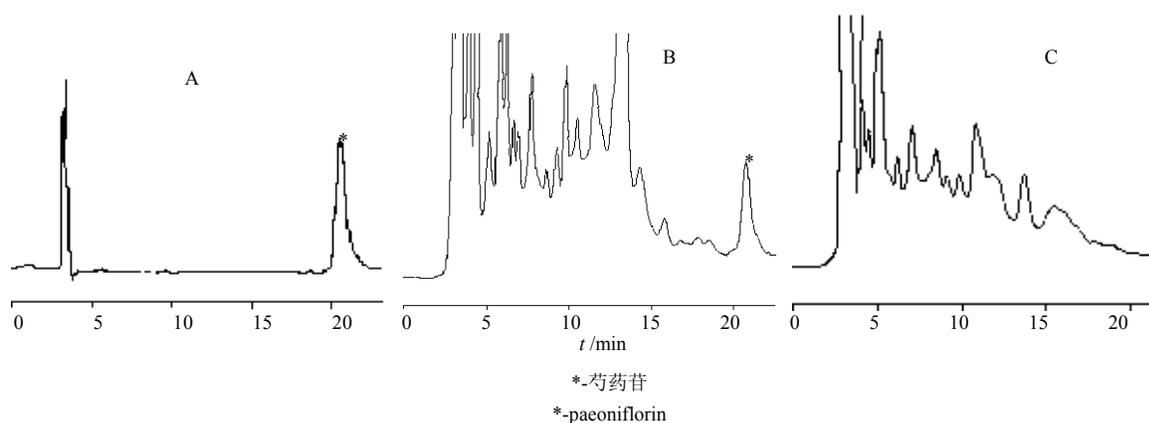


图 1 芍药苷对照品 (A)、消肿接骨贴 (B) 和缺赤芍的阴性对照样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of paeoniflorin reference substance (A), Xiaozhong Jiegu Plaster (B), and negative sample without *Paeoniae Rubra Radix* (C)

2.6 线性关系考察

分别精密吸取 62.4 μg/mL 芍药苷对照品溶液 2、4、8、10、12、16、20 μL, 注入高效液相色谱仪, 在选定的色谱条件分别进行测定。以芍药苷峰面积为纵坐标, 进样质量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=1\ 239\ 780.418\ 6 X-58\ 160.352\ 1$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明, 芍药苷在 0.124 8~1.248 0 μg 呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验

在选定的色谱条件下, 精密吸取 62.4 μg/mL 芍药苷对照品溶液, 进样 10 μL, 重复进样 6 次, 测定芍药苷的峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.84%。

2.8 稳定性试验

取批号 20120126 消肿接骨贴样品, 精密称定, 制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定芍药苷峰面积, 计算得 RSD 值为 1.30%, 结果表明供试品溶液中芍药苷在 24 h 内基本稳定。

2.9 重现性试验

取批号 20120218 消肿接骨贴样品 6 份, 每份 4.0 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 在选定的色谱条件下, 进样测定峰面积, 并计算芍药苷的质量分数, 计算得其 RSD 值为 1.74%。

2.10 加样回收率试验

精密称取批号 20120126 消肿接骨贴样品 6 份,

每份约 2.0 g, 精密称定, 分别精密加入芍药苷对照品 0.782 mg, 制备供试品溶液, 在选定的色谱条件下测定, 计算得芍药苷的加样回收率为 98.94%, RSD 值为 1.73%。

2.11 样品测定

取不同批号的消肿接骨贴样品各 2 份, 制备供试品溶液, 在选定的色谱条件下测定芍药苷的峰面积, 每次进样 10 μ L, 以外标法计算消肿接骨贴中芍药苷的质量分数, 结果见表 1。

表 1 消肿接骨贴中芍药苷的测定结果

Table 1 Determination of paeoniflorin in Xiaozhong Jiegu Plasters

批号	芍药苷/(mg·贴 ⁻¹)
20120113	4.192 2
20120126	4.091 0
20120218	4.226 4

3 讨论

在进行芍药苷的最大吸收波长选择时, 取芍药苷对照品溶液适量, 在 190~270 nm 波长进行全波长扫描。结果表明, 芍药苷在 230.0 nm 波长处有最大吸收, 与《中国药典》2010 年版一部“赤芍”项下的含量测定波长一致, 故选择 230 nm 为测定波长。

流动相的选择对于高效液相色谱分析的成功与否是非常关键的。本研究参考大量文献以选取合适的流动相种类及配比, 参照《中国药典》2010 年版一部“赤芍”项下的含量测定, 采用甲醇 - 0.05 mol/L

磷酸二氢钾 (40:65) 为流动相, 又参考有关文献以甲醇 - 水 (20:80)^[4]、乙腈 - 水 (14:86)^[3] 及其不同比例, 乙腈 - 0.1%磷酸 (13:87)^[5] 及其不同比例, 结果表明, 流动相采用乙腈 - 0.1%磷酸 (12:88) 时, 样品中芍药苷的色谱峰被有效地分离, 其他成分对芍药苷的测定无干扰, 保留时间适当。其他种类的流动相均存在分离程度较差, 目标峰在各杂峰之间且干扰严重, 峰型较差, 基线噪音大等诸多问题。

消肿接骨贴是由 18 味中药经提取精制而成的大复方制剂, 含药味多, 因此对其进行定性定量研究较为困难, 笔者通过对色谱柱的种类、流动相的种类与比例、柱温等条件进行逐一的摸索试验, 建立了反相高效液相色谱法测定消肿接骨贴中芍药苷, 该方法操作简便、准确度高, 专属性强、重复性好, 为其他中成药品种中芍药苷的质量控制提供了参考。而消肿接骨贴中多种药效成分的同时测定共同控制其质量, 有待进一步深入的研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 147.
- [2] 刘俊英, 张颖, 闫爽. 赤芍的药理作用 [J]. 中国中医药资讯, 2011, 3(9): 375.
- [3] 魏莉本, 黄玮. HPLC 法测定固经丸中芍药苷的含量 [J]. 淮海医药, 2011, 29(4): 353-354.
- [4] 蓝鸣声, 陈路, 覃成芳, 等. 五淋散胶囊中栀子苷和芍药苷的 HPLC 含量测定 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(14): 1281-1284.
- [5] 鲁敏, 金樟照, 龚青. 高效液相色谱法测定治伤跌打丸中芍药苷 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 389-390.