

HPLC 法测定养阴降压胶囊中马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷

冉华阳¹, 田睿², 黄婕^{3*}

1. 太极集团 西南药业股份有限公司, 重庆 400038

2. 重庆医科大学 教学实验管理中心, 重庆 400038

3. 武警重庆总队医院 心内科, 重庆 400061

摘要: 目的 建立 HPLC 波长切换法同时测定养阴降压胶囊中马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷。方法 采用 HPLC 法, Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: [甲醇-乙腈 (2:1)]-0.02%磷酸溶液, 梯度洗脱; 0~16 min 在 390 nm 波长下检测马兜铃酸 I, 16~40 min 时在 230 nm 波长下检测氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 10 μL。结果 马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷质量浓度分别在 4.72~94.40 ($r=0.999\ 8$)、3.95~79.00 ($r=0.999\ 9$)、6.39~127.80 ($r=0.999\ 9$)、19.81~396.20 μg/mL ($r=0.999\ 1$) 与峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 97.47%、99.09%、100.09%、98.88%, RSD 值分别为 1.19%、1.60%、0.84%、0.65%。结论 所建立的方法简便, 重复性好, 为有效控制养阴降压胶囊的质量提供了依据。

关键词: 养阴降压胶囊; 马兜铃酸 I; 氧化芍药苷; 芍药内酯苷; 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(2016)11-1703-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.11.004

Determination of aristolochic acid I, oxypaeoniflorin, alibiflorin, and paeoniflorin in Yangyin Jiangya Capsules by HPLC

RAN Hua-yang¹, TIAN Rui², HUANG Jie³

1. Taiji Group, Southwest Pharmaceutical Co., Ltd, Chongqing 400038, China

2. Teaching Experiment Management Center, Medical University of Chongqing, Chongqing 400038, China

3. Department of Cardiology, Chongqing General Hospital of Armed Police Force, Chongqing 400061, China

Abstract: **Objective** To develop an HPLC-wavelength switching method for simultaneous determination of aristolochic acid I, oxypaeoniflorin, alibiflorin, and paeoniflorin in Yangyin Jiangya Capsules. **Method** HPLC method was adopted. The determination was carried out on Venusil MP C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-acetonitrile (2:1) and 0.02% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 390 nm in 0—16 min (determination of aristolochic acid I) and 230 nm in 16—40 min (determination of oxypaeoniflorin, alibiflorin, and paeoniflorin). The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 35 ℃, and volume of injection was 20 μL. **Results** There were good linear relationships of aristolochic acid I, oxypaeoniflorin, alibiflorin, and paeoniflorin in the concentration ranges of 4.72—94.40 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 3.95—79.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 6.39—127.80 μg/mL ($r=0.999\ 9$), and 19.81—396.20 μg/mL ($r=0.999\ 1$) between peak areas, respectively. The average recoveries were 97.47%, 99.09%, 100.09%, and 98.88% with RSD 1.19%, 1.60%, 0.84%, and 0.65%, respectively. **Conclusion** The established method is simple and has good repeatability which can be used in quantity control for Yangyin Jiangya Capsules.

Key words: Yangyin Jiangya Capsules; aristolochic acid I; oxypaeoniflorin; alibiflorin; paeoniflorin; HPLC

养阴降压胶囊是由白芍、青木香、龟甲(沙
烫)、珍珠层粉等 16 味中药加工而成, 具有滋阴

潜阳、平肝安神、活血通络的功效, 临床上主要
用于肝肾阴虚, 肝阳上亢引起的高血压病, 头晕

收稿日期: 2016-08-24

作者简介: 冉华阳 (1974—), 男, 重庆人, 本科, 执业药师, 主要从事药品生产质量研究相关工作。Tel: 13983352030

*通信作者 黄婕 (1974—), 女, 重庆人, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管病药理学相关研究工作。

Tel: 13452023697 E-mail: huangjiechongqing@163.com

头痛、颈不适、目眩耳鸣、行走不稳、心悸心疼、烦躁易怒、失眠多梦等症状的治疗^[1]。养阴降压胶囊收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第12册,但标准仅规定了性状和理化鉴别,无其他质量控制检测项目^[2]。由于养阴降压胶囊由16味中药组成,成分较多,单一指标不能较全面地控制产品质量。白芍和青木香在养阴降压胶囊的制剂处方中用量最大,是方中的主要药物^[3];氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷为白芍的指标性成分,马兜铃酸I为青木香的指标性成分。本实验采用HPLC波长切换法同时对养阴降压胶囊中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和马兜铃酸I进行测定,为有效控制养阴降压胶囊的质量,确保临床用药的安全提供依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);AL104 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);KQ-S2000VDE 三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-2100 型紫外可见分光光度计(成都科析电子商务有限公司)。

马兜铃酸I(批号 110746-201510,质量分数 99.1%)、芍药苷(批号 110736-201640,质量分数 95.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;氧化芍药苷对照品(批号 39011-91-1,质量分数 98.0%)购自上海道壹生物科技有限公司;芍药内酯苷对照品(批号 39011-90-0,质量分数 98.0%)购自上海纯优生物科技有限公司。养阴降压胶囊由山西黄河中药有限公司生产,规格 0.5 g/粒,批号分别为 20151201、20160101、20160301;流动相用甲醇和乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Venusil MP C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5

μm);流动相 A: 甲醇-乙腈(2:1),流动相 B: 0.02%磷酸溶液,梯度洗脱^[4-5](0~16 min, 42.0%A; 16~32 min, 42.0%→65.0%A; 32~40 min, 65.0%→42.0%A); 0~16 min 在 390 nm^[6]波长下检测马兜铃酸 I, 16~40 min 时在 230 nm^[7-8]波长下检测氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷;体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 °C;进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷对照品适量,分别置不同的 20 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即得含马兜铃酸 I 0.472 mg/mL、氧化芍药苷 0.395 mg/mL、芍药内酯苷 0.639 mg/mL、芍药苷 1.981 mg/mL 单一成分的对照品储备溶液。分别依次量取各对照品储备液 2.5、2.0、5.0、5.0 mL,置同一 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取养阴降压胶囊适量,倾出内容物,研细,取约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇适量,超声提取 30 min,放冷,用甲醇加至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按养阴降压胶囊的处方工艺,分别制备不含青木香和不含白芍的阴性样品,按供试品溶液的制备项下方法操作,制成相应的阴性样品溶液。

2.5 线性关系试验

分别精密吸取单一成分的对照品储备溶液(马兜铃酸 I 0.472 mg/mL、氧化芍药苷 0.395 mg/mL、芍药内酯苷 0.639 mg/mL、芍药苷 1.981 mg/mL)各 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,将其置于 10 mL 量瓶中,并用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得到一系列质量浓度的混合对照品溶液,进样测定。以测得的峰面积对质量浓度进行线性回归,绘制标准曲线,得回归方程,见表 1。

表 1 线性关系试验结果

Table 1 Results of linear relationship test

组分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
马兜铃酸 I	$Y=1.010\ 3\times 10^6 X+107.2$	0.999 8	4.72~94.40
氧化芍药苷	$Y=7.654\ 2\times 10^5 X+380.6$	0.999 9	3.95~79.00
芍药内酯苷	$Y=1.229\ 7\times 10^6 X-400.8$	0.999 9	6.39~127.80
芍药苷	$Y=1.451\ 9\times 10^6 X+379.5$	0.999 1	19.81~396.20

2.6 专属性试验

精密吸取混合对照品、供试品溶液和阴性样品溶液各适量，件进行检测。结果显示，各阴性样品溶液的色谱图中，在所测马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷 4 个成分对应的位置无干扰，色谱图见图 1。

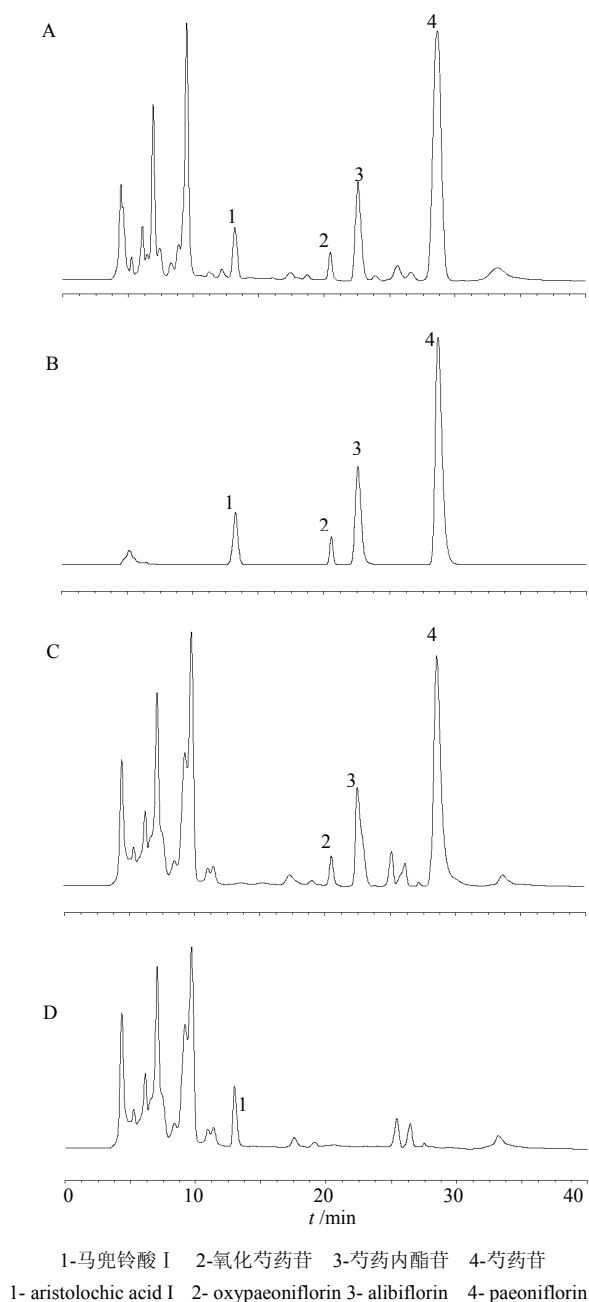


图 1 养阴降压胶囊 (A)、混合对照品 (B)、缺青木香阴性样品 (C) 和缺白芍阴性样品 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Yangyin Jiangya Capsules (A), mixed reference substances (A), negative sample without *Aristolochiae Radix* (C) and negative sample without *Paeoniae Alba Radix* (D)

2.7 精密度试验

取混合对照品溶液，连续进样测定 6 次，记录峰面积，结果马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷峰面积的 RSD 值分别为 0.97%、1.05%、0.83%、0.72%。

2.8 重复性试验

取养阴降压胶囊样品 (批号 20151201) 6 份，制备供试品溶液，进行测定，分别计算马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷的质量分数，结果 RSD 值分别为 1.52%、1.77%、1.29%、1.14%。

2.9 稳定性试验

取养阴降压胶囊 (批号 20151201) 样品制备的同一份供试品溶液，在室温下放置 0、2、4、6、8、12 h，测定马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷的峰面积值，RSD 值分别为 1.01%、1.36%、0.95%、0.74%。结果显示供试品溶液在室温下 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

取养阴降压胶囊 (批号 20151201) 6 份，内容物研细，每份约 0.5 g，精密称定，分别置不同的 50 mL 量瓶中，精密加入混合对照品溶液 (马兜铃酸 I 0.023 6 mg/mL、氧化芍药苷 0.015 8 mg/mL、芍药内酯苷 0.063 9 mg/mL、芍药苷 0.198 1 mg/mL) 25 mL，制备供试品溶液，进样测定，计算得马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷的平均回收率分别为 97.47%、99.09%、100.09%、98.88%，RSD 值分别为 1.19%、1.60%、0.84%、0.65%。

2.11 样品测定

取 3 批养阴降压胶囊，制备供试品溶液，进样测定，采用外标法计算马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷的质量分数，结果见表 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察

曾考察了不同提取方式 (加热回流提取、超声提取) 对马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷提取率的影响，结果显示加热回流提取和超声提取所测 4 个成分的提取效果差异不大，考虑到测定操作的便捷性和稳定性，选取超声提取作为供试品溶液制备的最佳提取方式；在超声提取的基础上对不同提取溶剂 (乙醇、甲醇)、不同提取时间 (20、30、40 min) 进行考察，最终优选出养阴降压胶囊样品最佳的供试品溶液制备方法为甲醇超声提取 30 min。

表 2 养阴降压胶囊中马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷的测定结果 ($n=3$)Table 2 Determination of aristolochic acid I, oxypaeoniflorin, alibiflorin, and paeoniflorin in Yangyin Jiangya Capsules ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	马兜铃酸 I	氧化芍药苷	芍药内酯苷	芍药苷
20151201	1.247	0.726	3.152	9.391
20160101	1.129	0.782	3.374	9.920
20160301	1.458	0.695	2.933	8.657

3.2 流动相的选择

分别对乙腈 - 0.02%磷酸溶液^[3]、乙腈 - 0.05%磷酸溶液、乙腈 - 0.2%醋酸溶液^[4]、乙腈 - 0.1%醋酸溶液、甲醇 - 乙腈 (2:1) 与 0.02%磷酸溶液不同的流动相体系进行了考察, 结果显示, 采用甲醇 - 乙腈 (2:1) 与 0.02%磷酸溶液流动相体系时所得到的色谱图基线平稳, 所测 4 个成分马兜铃酸 I、氧化芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷分离效果较好, 因此选择甲醇 - 乙腈 (2:1) 与 0.02%磷酸溶液进行梯度洗脱。

本实验采用 HPLC 波长切换法同时对养阴降压胶囊中氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷和马兜铃酸 I 进行了测定, 方法简便, 重复性好, 为有效控制养阴降压胶囊的质量提供了依据。

参考文献

[1] 商桂春, 王广录, 付永强. 养阴降压胶囊的质量标准研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 804-805.

- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准 (中药成方制剂第十二册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 40.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 105.
- [4] 欧金梅, 吴德玲, 金传山, 等. HPLC 法同时测定白芍总苷中 4 种单萜苷的含量 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 423-425.
- [5] 刘学湘, 吴晓峰, 潘 扬, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱法分析青木香及其发酵品中马兜铃酸类成分 [J]. 中国天然药物, 2010, 8(6): 456-460.
- [6] 姜 旭, 王智民, 由丽双, 等. RP-HPLC 测定不同产地青木香和细辛中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 408-410.
- [7] 李伟铭, 赵月然, 杨燕云, 等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片中 9 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2208-2212.
- [8] 刘金环, 杨玉琴, 丁 秦, 等. HPLC 法同时测定白芍药材中芍药内酯苷和芍药苷的含量 [J]. 河南中医, 2013, 33(10): 1796-1797.