

指标越小越好,所以较好的提取方法应为 C₂D₃B₁A₁,即煎煮 120 min、125 ℃、粉碎粒度为 8 mm×3.5 mm、加水 8 倍。

2.5 验证试验:为进一步考察上述优选工艺的稳定性,选用上述优化条件,取 50 g 药材,采取用水 8 倍量、煎煮 120 min、125 ℃、粉碎粒度 8 mm×3.5 mm、重复 3 次,结果所得秦皮甲素的质量分别为 5.44、5.38、5.67 mg。

3 讨论

秦皮始载于《神农本草经》,列为中品。秦皮甲素为秦皮的有效成分,具香豆素类母体结构,收载于《中国药典》2005 版一部中,采用 HPLC 法测定秦皮甲素和秦皮乙素的总量为控制标准,方法较繁琐。有

关文献对秦皮进行测定分别有 HPLC 法、容量法、紫外分光光度、纸色谱比色法、电泳-光密度计法、薄层色谱-荧光法等法^[1,2]。经多种条件比较,实验用改良的 HPLC 法测定秦皮甲素。

曾考虑将秦皮乙素一起测定,但由于提取效果不佳,出峰结果不理想而放弃,有待于今后继续研究。

References:

[1] Sun D M, Fan S L, Tu Y S. Determination of aesculin in Qinpi Granule by HPLC [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2000, 11 (3): 172.

[2] Liang Y A, Zhu J J. Quantitative determination of aesculin in Cortex Fraxini Caulis by second-derivative differential pulse polarography [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2000, 16 (5): 254.

HPLC 法测定养血当归精合剂中芍药苷

吴瑾瑾¹, 石森林², 徐菲拉³

(1. 杭州市第四医院, 浙江 杭州 310003; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310000; 3. 金华市中心医院, 浙江 金华 312000)

养血当归精合剂由当归、川芎、熟地、黄芪、白芍、阿胶、甘草等组成,具有补虚益气、养血调经的功效,主要用于妇女气血两虚所致月经不调、闭经及痛经等病症。该品目前有 15 家企业生产,但是临床疗效不稳定。究其原因,是原生产工艺较粗糙,缺少量化质量控制标准。为保证药品质量,进一步修订药品质量标准,本实验采用 HPLC 法测定养血当归精中芍药苷。

1 材料与仪器

AgiLent 1100 高效液相色谱仪、UV 检测器(美国 AgiLent 公司),CQ250 型超声波清洗器(上海超声波仪器厂),PL5124 型纯水机(美国 PALL 公司),C₁₈固相萃取小柱(江苏汉邦科技有限公司),AB-204-N 电子天平(梅特勒-托利多),101A-2 电热鼓风机(上海市实验仪器总厂),SX2-4-10 箱式电阻炉(沈阳市节能电炉厂)。

芍药苷对照品(批号 0736-200117,中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,养血当归精合剂(150 mL/瓶)由浙江中医药大学药学院提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Zorbax XDB-C₁₈(150 mm×3.9 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:甲醇-水-磷酸(35:65:0.1);检测波长:230 nm;柱温:室温;体积流量:0.8 mL/min。理论板数按芍药苷峰计算不低于 3 500。

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液的制备:准确移取养血当归精合剂 4.0 mL 于 50 mL 量瓶中,加入甲醇 36 mL,密塞,摇匀,冰箱放置 6 h 以上,滤过,残渣用少量甲醇洗涤,合并滤液,滤液水浴蒸干,残渣用蒸馏水溶解于 5 mL 量瓶中,以蒸馏水稀释至刻度,密塞,摇匀,准确吸取该溶液 300 μL 于 C₁₈固相萃取小柱(15 mm×8 mm, 500 mg)上,分别用蒸馏水 3.0 mL、35%甲醇 5.0 mL 洗脱,收集 35%甲醇洗脱液于 5 mL 量瓶中,并用流动相稀释至刻度,密塞,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备:芍药苷对照品真空干燥 24 h 后,取约 17 mg,精密称取,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,密塞,摇匀,即得对照品储备液。精密吸取此对照品储备液 40 μL 于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,密塞,摇匀,即得对照品溶液(含芍药苷 6.8 μg/mL)。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备:按组方比例取除去白芍的各原料药材适量,按制剂工艺制备空白样品合剂,即得缺白芍的阴性样品。取该阴性样品,按供试品溶液的制备方法制得阴性供试品溶液。

2.3 系统适用性与空白试验:该色谱条件下对照品溶液、供试品溶液与阴性供试品溶液的色谱图见图 1,可见养血当归精合剂中其他成分对芍药苷的测定没有影响。

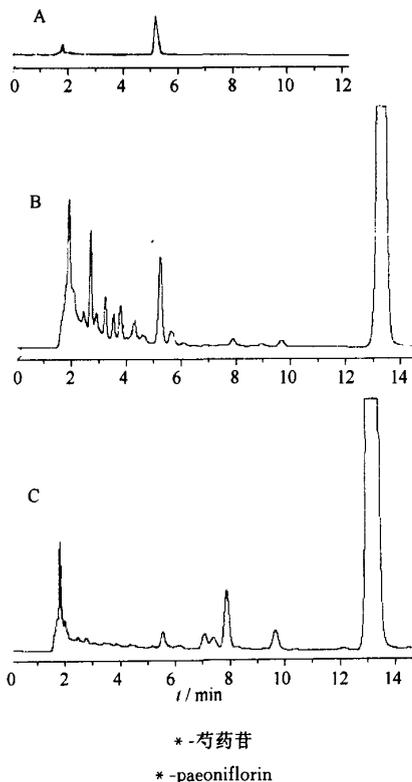


图 1 芍药苷对照品(A)、养血当归精合剂(B)和缺白芍的阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of paeoniflorin reference substance (A), Yangxue Dangguijing Mistura (B), and negative sample (C)

2.4 标准曲线的制备:分别精密吸取对照品储备液 20、40、80、160、240、320、400 μL 置 10 mL 量瓶中,流动相定容,摇匀,进样 20 μL ,测定芍药苷峰面积。以芍药苷峰面积为纵坐标,进样量为横坐标拟合标准曲线,得回归方程 $Y = 1\ 651\ 830.519\ 7\ X$, $r = 0.999\ 9$,结果表明芍药苷在 0.067 9~1.358 0 μg 与峰面积有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取芍药苷对照品溶液 20 μL ,连续进样测定 6 次,记录芍药苷峰面积,结果峰面积 RSD 为 0.47%。

2.6 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,分别在 0、0.5、1、2、3、4、6、8、24 h 进样 20 μL 测定,结果芍药苷峰面积 RSD 1.23%,可见样品在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重现性试验:分别准确移取同一批养血当归精合剂 6 份,制备供试品溶液,每份重复 3 次,进样 20 μL ,结果芍药苷质量浓度的 RSD 为 3.44%。

2.8 加样回收试验:精密取养血当归精合剂 6 份,分别加入精密加入芍药苷对照品约 0.3 mg,制备供试品溶液,测定,结果加样回收率在 95.05~97.20%。

2.9 样品测定:取样品,按上述方法制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液 20 μL 、供试品溶液 20 μL ,按上述色谱条件测定芍药苷峰面积,按外标法计算芍药苷的质量浓度,结果见表 1。

表 1 养血当归精合剂中芍药苷的测定结果 (n=3)
Table 1 Determination of paeoniflorin in Yangxue Dangguijing Mistura (n=3)

批号	芍药苷/(mg·瓶 ⁻¹)	RSD/%
1	19.98	3.44
2	19.93	2.16
3	20.61	2.67

3 讨论

本处方中君药为当归、阿胶,阿魏酸为当归中主要有效成分,但川芎中也含有该成分,因此把阿魏酸作为定量指标进行考察,专属性不够,因此该方法未列入定量测定项中。白芍为本品处方中的臣药之一,芍药苷是该药的主要有效成分,以芍药苷为指标进行测定,可控制成品的质量。

测定波长的选择:将芍药苷对照品溶液与供试品溶液分别用紫外分光光度计在 200~600 nm 扫描,最大吸收波长与文献报道^[1](230 nm)一致,因此选择检测波长为 230 nm。

流动相的选择:本实验用甲醇-水-磷酸(35:65:0.1)、乙腈-水-磷酸(15:85:0.1)、甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢甲溶液-异丙醇-冰醋酸(67:173:4:4)为流动相进行试验,结果后两者中芍药苷与其他组分未能达到基线分离,而甲醇-水-磷酸(35:65:0.1)分离度最好,保留时间较合适,故本实验选用该流动相。

Reference:

[1] Liu J H, Wang S F. Determination of paeoniflorin content in Wujibaifeng Tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33 (4): 325.