

高效液相色谱法测定养坤丸中黄芩苷和芍药苷的含量

李 明, 陈志维, 黎玉翠, 暴梅佳, 苏子仁^{*}
(广州中医药大学, 广东 广州 510000)

[摘要] 目的: 建立反相高效液相色谱法(RP-HPLC)同时测定养坤丸中黄芩苷和芍药苷含量的方法。方法: 采用 Phenomenex Luna C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C。结果: 黄芩苷与芍药苷能达到基线分离, 线性良好。结论: 该方法简便、快速、准确、重复性好, 为养坤丸的质量控制提供了理论依据。

[关键词] 养坤丸; 反相高效液相色谱法; 黄芩苷; 芍药苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)03-0012-03

Determination of Baicalin and Paeoniflorin in Yangkun Pills by HPLC

LI Ming, CHEN Zhi-wei, LI Yu-cui, BAO Mei-jia, SU Zi-ren^{*}
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an RP-HPLC method for the determination of baicalin and paeoniflorin in Yangkun Pills. **Method:** The sample was separated at 30 °C on a Phenomenex Luna C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile and water containing 0.2% Phosphoric acid in gradient mode. The detection wavelength was 230 nm, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Two compounds were baseline-separated, the linear relationships of the injection amounts and peak areas for both baicalin and paeoniflorin were excellent. **Conclusion:** The method was simple, rapid, precise and repeatable. This method can be used for controlling the quality of Yangkun Pills.

[Key words] Yangkun Pills; RP-HPLC; baicalin; paeoniflorin; assay

[收稿日期] 2008-06-16

[通讯作者] * 苏子仁, Tel: (020) 39358517; E-mail: vip.suziren@gzhtcm.edu.cn

养坤丸是中药部颁标准收载的传统中药制剂^[1],由熟地黄、甘草、地黄、川芎(酒制)、当归(酒蒸)、延胡索(酒醋制)、黄芩(酒制)、郁金、木香、杜仲(盐制)、香附(酒醋制)、白芍(酒炒)、蔓荆子(酒蒸)、砂仁共 14 味药材组成,具有疏肝理气,养血活血之功效。临床上主要用于血虚肝郁而致月经不调,闭经,痛经,经期头痛等。原部颁标准中仅有显微鉴别部分,并无含量测定项。黄芩、白芍在养坤丸中用量较大,且功效成分明确,本文建立了黄芩苷、芍药苷的反相高效液相色谱测定方法,为该中成药的有效成分的含量测定以及质量控制提供评价方法。

1 仪器与试剂

DIONEX SUMMIT 高效液相色谱仪(P680 HPLC 四元梯度泵、STH585 柱温箱、PDA-100 检测器、ASH-100 自动进样器);Chromeleon 色谱工作站;KQ3200DE 型医用数控超声仪;试验室专用超纯水机;AB204-N 电子分析天平(海特勒-托利多仪器有限公司)

养坤丸 3 批(批号: 070313、070314、070315),由广州真和新君宝药业有限公司提供;黄芩苷对照品

(批号 110715-200212)、芍药苷对照品(批号 110736-200423),由中国药品生物制品检定所提供;试剂:超纯水、乙腈(色谱纯),磷酸(分析纯),甲醇(分析纯),乙醇(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-0.2% 磷酸,梯度洗脱,洗脱程序见表 1;流速: 1.0 mL·min⁻¹;柱温: 30℃;检测波长为 230 nm;进样量: 10 μL。理论板数按黄芩苷峰计算均不低于 2 500,按芍药苷峰计算不低于 2 000。在以上色谱条件下,养坤丸中的黄芩苷、芍药苷与其它组分的色谱峰分离度良好。见图 1。

表 1 梯度洗脱程序(%)							
T(min)	0~ 15	15~ 17	17~ 29	29~ 33	33~ 40	40~ 43	
0.2% 磷酸(%)	83	83→75	75	75→50	50	50→83	
乙腈(%)	17	17→25	25	25→50	50	50→17	

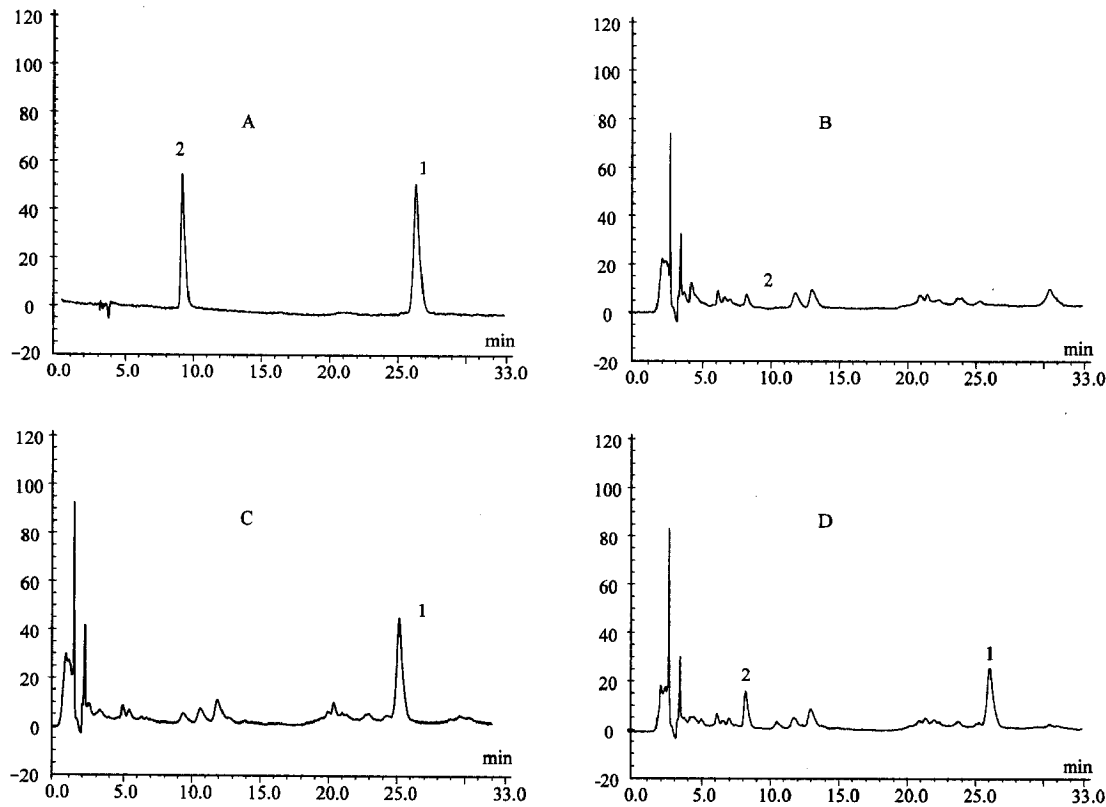


图 1 养坤丸 HPLC 图
A. 混合对照品; B. 缺黄芩阴性; C. 缺白芍阴性; D. 样品; 1. 黄芩苷; 2. 芍药苷

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品 11.80 mg、芍药苷对照品 3.32 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 1 mL 黄芩苷对照品溶液和芍药苷对照品溶液置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 即得混合对照品溶液 (黄芩苷 $0.1180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 芍药苷 $0.0332 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 供试品溶液的制备 取养坤丸, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 50 KHz), 放冷, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系的考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL 进行测定, 按上述色谱条件测定峰面积, 并以进样量 (μg) 为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行线性回归, 得黄芩苷在 0.1180~2.950 μg 线性方程为 $Y = 0.0185X - 0.0077$, $r = 0.9999$, 芍药苷在 0.0332~0.830 μg 的回归方程为 $Y = 0.0247X - 0.0166$, $r = 0.9999$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 重复 6 次, 结果显示黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.27%, 芍药苷峰面积的 RSD 为 0.21%。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 按上述色谱条件进行测定。结果显示黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.39%, 芍药苷峰面积的 RSD 为 0.67%。样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样品 (批号: 070313), 按供试品制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定。结果显示黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.32%, 芍药苷峰面积的 RSD 为 0.75%。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品 (批号: 070313), 研细, 取约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入混合对照品溶液 10 mL, 70% 乙醇 40 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 50 KHz), 放冷, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。平行操作 6 份, 测定, 结果见表 2。

2.9 样品测定 取不同批号的 3 批样品, 按供试品溶液制备方法制备, 并按上述色谱条件进行测定。结果见表 3。

表 2 回收率测定结果

成分	称样量 (g)	理论含 量(mg)	加入量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
黄芩苷	0.2504	1.3722	1.1800	2.5348	98.53	100.69	1.82
	0.2513	1.3771	1.1800	2.5671	100.85		
	0.2511	1.3760	1.1800	2.5991	103.65		
	0.253	1.3864	1.1800	2.5672	100.07		
	0.2498	1.3689	1.1800	2.5694	101.74		
	0.2513	1.3771	1.1800	2.5491	99.32		
	0.2504	0.3556	0.3320	0.6782	97.17		
	0.2513	0.3568	0.3320	0.6879	99.73		
芍药苷	0.2511	0.3566	0.3320	0.6881	99.85	99.00	1.27
	0.253	0.3593	0.3320	0.6927	100.42		
	0.2498	0.3547	0.3320	0.6797	97.89		
	0.2513	0.3568	0.3320	0.6853	98.94		

表 3 样品含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

批号	黄芩苷($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	芍药苷($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
070313	5.48 ± 0.04	1.42 ± 0.02
070314	5.26 ± 0.03	1.53 ± 0.04
070315	5.39 ± 0.04	1.49 ± 0.02

3 讨论

有文献^[2~3]用 HPLC 法分别测定养坤丸中的黄芩苷和芍药苷的含量, 但未见有同时测定的报道。本法能同时测定养坤丸中黄芩苷和芍药苷的含量, 方法简便、快捷、重复性好, 为综合控制养坤丸的质量提供了很好的依据。

采用无水乙醇、70% 乙醇以及甲醇作为提取溶剂进行供试品溶液的制备, 发现采用 70% 乙醇时, 黄芩苷、芍药苷的提取率最高。故采用 70% 乙醇作为供试品溶液制备的提取溶剂。

黄芩苷的最大吸收波长为 280 nm, 芍药苷的最大吸收波长为 230 nm, 黄芩苷的含量较高, 芍药苷的含量相对较低, 所以选择 230 nm 作为检测波长。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂第一册, 1991: ZF83.
- [2] 梁永枢, 林海, 李依信. HPLC 法测定养坤丸中黄芩苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(4): 275.
- [3] 赖志坚, 刘小平. HPLC 测定养坤丸中芍药苷的含量[J]. 中药材, 2007, 25(8): 590.