

高效液相色谱法测定固精参茸丸中芍药苷的含量

蔡日强¹, 陈吴苏¹, 解荷芝² (1. 广东梅州制药厂, 广东 梅州 514021; 2. 国家中药现代化工程技术研究中心, 广东 珠海 519020)

摘要:目的 建立固精参茸丸中芍药苷的含量测定方法。方法 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇-水 (25:75) 为流动相; 流速 0.80 mL/min; 检测波长: 230 nm, 参比波长: 360 nm, 柱温 25℃; 理论板数: 以芍药苷计算, 不得低于 3 000; 分离度 R 不低于 2.0; 芍药苷保留时间 t_R 20.7 min。结果 本法的平均回收率为 97.08%, RSD 为 2.02% ($n=10$); 本品含芍药苷 7.22 mg/丸, RSD 为 3.07% ($n=10$)。结论 采用本法测定芍药苷的含量准确、重现性好, 可用于本品的质量控制。

关键词: 固精参茸丸; 高效液相色谱法; 芍药苷

中图分类号: R286; R917.792 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)03-0243-03

Determination of paeoniflorin in Gujing Shenrong pill by HPLC method

CAI Ri-qiang, CHEN Wu-su, XIE He-zhi (1. Guangdong Meizhou Pharmaceutical Factory, Meizhou 514021, China; 2. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai 519020, China)

联系地址: 河南省郑州市中原中路 191 号院 10 号楼 3 号, 邮编: 450007

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for determination of paeoniflorin in Gujing Shenrong pill **METHODS** The contents of paeoniflorin were determined by HPLC. Chromatographic conditions included C_{18} column and the mobile phase consisting of a mixture of methanol/water (25: 75), the flow rate was 0.80 mL/min and detection wavelength was at 230nm, reference wavelength was at 360nm. **RESULTS** There was a good linear relationship for paeoniflorin within the range of 270~1350ng. The average recovery of the method was 97.08%, RSD was 2.0% ($n=10$), the content of paeoniflorin in Gujing Shenrong pill was 7.22mg in each pill RSD was 3.1% ($n=10$). **CONCLUSION** The method is accurate, of good reproducibility, and can be used for the quality control of the drug.

KEY WORDS Gujing Shenrong pill; HPLC; paeoniflorin

固精参茸丸由红参、川芎、当归、白术、白芍、熟地、沙苑子、党参、茯苓等 18 药味制成, 具有补气补血, 养心健肾之功能, 用于气虚血弱, 精神不振, 肾亏遗精, 产后体弱等症。白芍为固精参茸丸方的主药之一, 具有平肝止痛, 养血调经, 敛阴止汗的功效^[1]。芍药苷 (paeoniflorin) 为白芍的主要的特征成分之一, 现代药理研究表明, 芍药苷具有提高免疫力^[1~3]、镇痛^[4]、降温^[5]等作用, 为白芍的有效成分之一, 其含量达 3.3%~5.7%^[6]。因此选择芍药苷的 HPLC 测定作为含量测定指标。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

HP1100Series 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies USA), HP Chem Station 6.0 色谱工作站。

1.2 样品与试剂

固精参茸丸 (批号: 020401, 020403, 020405, 020407, 020409, 020411, 020413, 020415, 020417, 020419 广东梅州制药厂); 芍药苷对照品 (批号: 0736-200117, 中国药品生物制品检定所), 经归一化法标定纯度为 99.45%。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Lichrospher RP C_{18} (4.6mm × 250mm, 5 μ m, Merck Co., Ltd, Germany); 流动相: 甲醇-水 (25: 75); 流速: 0.80 mL/min; 检测波长: 230nm, 参比波长: 360nm, 柱温: 25℃; 理论板数: 以芍药苷计算, 不得低于 3000 分离度 R 不得低于 2.0 见图 1~3。

2.2 标准曲线的制备

精密称定芍药苷对照品适量, 加甲醇配制成浓度为 0.27 μ g/ μ L 的溶液。分别精密吸取上述标准溶液 1, 2, 3, 4, 5 μ L,

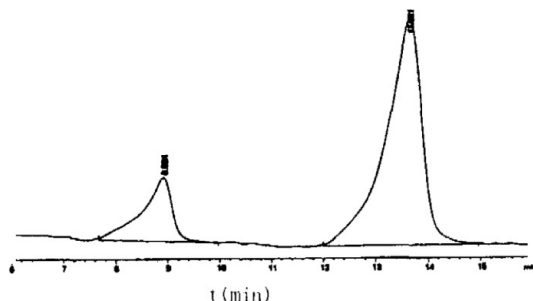


图 1 白芍药材高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Radix Paeoniae Alba

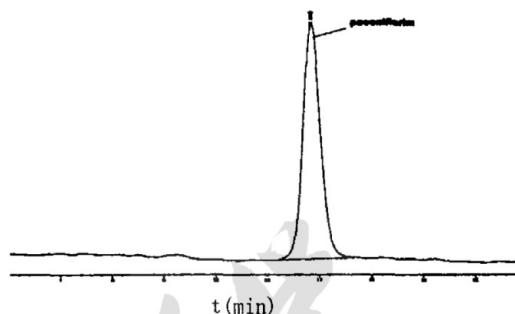


图 2 芍药苷对照品高效液相色谱图

Fig 2 Chromatogram of paeoniflorin

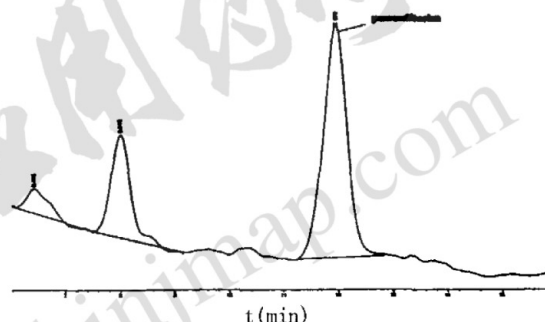


图 3 固精参茸丸高效液相色谱图

Fig 3 Chromatogram of Gujing Shenrong pill

进样测定, 以峰面积 (Y) 对浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程: $Y = 1.5593X - 4.5142$ (X 为: ng) 相关系数 $r = 0.9998$ 结果表明芍药苷在 270~1350ng 有良好的线性关系。

2.3 空白试验

取处方中药材 (不含芍药), 依法制成阴性对照品, 按前法分别测定, 结果未检出芍药苷吸收峰, 故可确定处方中其他药材成分对芍药苷的含量测定无干扰, 见图 4。

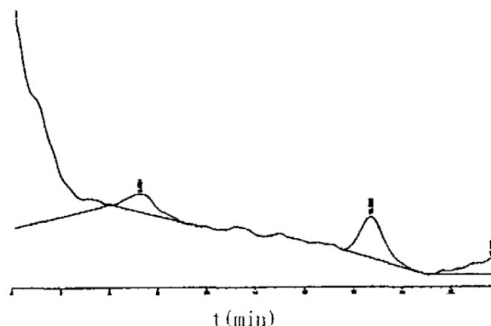


图 4 白芍阴性对照高效液相色谱图

Fig 4 Chromatogram of sample without Radix Paeoniae Alba

2.4 精密度试验

取同一批号样品,依样品制备方法制备并测定,连续进样 10 次,每次 10 μ L,每份测定 3 次,取平均值,比较峰面积,结果 RSD 为 1.6%。结果表明:本方法具有良好的精密度。

2.5 方法重复性试验

取 6 份同一批号样品,依样品制备方法制备并测定,进样测定,每次 10 μ L,每份测定 3 次,取平均值,比较峰面积,结果 RSD 为 2.0%。结果表明:本法重复性良好。

2.6 稳定性实验

取同一批号样品 0.5g,精密称定,余同供试品制备方法制备含量测定样品,依一定时间间隔进样测定,每次 10 μ L,每份测定 3 次,取平均值,比较峰面积。结果表明,样品制备后 8h 内测定,结果均稳定,RSD 为 1.1%。

2.7 加样回收率试验

取同一批号样品 10 份,每份约 0.5g,精密称定。加入芍药苷对照品溶液 (0.264mg/mL) 2mL。余同“2.8”项下,制备,测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 芍药苷加样回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery test						
试验次数	丸剂中量 (mg)	加入量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.575	0.528	1.0758	94.9		
2	0.576	0.528	1.0969	98.7		
3	0.575	0.528	1.0719	94.1		
4	0.575	0.528	1.1023	99.7		
5	0.576	0.528	1.0749	94.5		
6	0.576	0.528	1.0946	98.2	97.1	2.0
7	0.576	0.528	1.1006	99.4		
8	0.577	0.528	1.0835	95.9		
9	0.578	0.528	1.0903	97.5		
10	0.583	0.528	1.1001	97.9		

2.8 成品中芍药苷的含量测定

取本品 60℃干燥至恒重,粉碎(过 5 号筛),取上述干燥粉末约 0.5g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入甲醇 20mL,摇匀,置水浴中回流提取 1h,取出,冷却至室温,过滤,用甲醇分次洗涤容器、滤纸和药渣,洗液与滤液合并,水浴挥干,残渣加甲醇溶解并定容至 10mL,即得供试品溶液,进样测定,每次 10 μ L,每份测定 3 次,取平均值,计算含量,结果见表 2。

表 2 成品中芍药苷含量测定结果

Tab 2 Results of sample assay			
批次	成品量 (g)	芍药苷含量 (mg/丸) $n=3$	平均值 (mg/丸)
020401	0.5009	9.11	
020403	0.5005	9.14	
020405	0.5004	9.25	
020407	0.5001	9.25	
020409	0.5002	9.08	
020411	0.5001	8.49	9.02
020413	0.5007	9.18	
020415	0.5004	8.51	
020417	0.5006	9.16	
020419	0.5004	9.06	

从表 2 中可以看出,10 批样品含量在 8.49~9.25mg/丸,且准确度较高,考虑生产实际,将芍药苷含量下浮 20%,确定其含量限度以芍药苷计不得低于 7.22mg/丸。

3 讨论

本实验对提取方法进行了优选。选择提取时间及提取次数 2 个因素,每个因素 2 个水平,进行正交实验,优选提取方法。正交实验设计见表 3。

表 3 固精参茸丸提取方法优选正交实验表

Tab 3 The design for extracting GujingShenrong pill		
水平	因素	
	提取时间 (h) (A)	提取次数 (B)
1	0.5	1
2	1.0	2

本品 60℃干燥至恒重,粉碎(过 5 号筛),取上述干燥粉末约 0.5g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入甲醇 20mL,摇匀,按下列正交试验表的条件提取,提取液过滤后,水浴蒸干,甲醇定容至 10mL,作为供试品液,备用,每个试验平行操作 3 份。测定吸收值,依标准曲线计算含量,结果见表 4。

表 4 固精参茸丸提取方法优选正交实验及结果

Tab 4 Selective methods for extracting Gujing Shenrong pill			
因素	水平	A	B
试验号数		1	2
1	1	1	0.9775
2	1	2	1.1087
3	2	1	1.1365
4	2	2	1.1408
K ₁		2.0862	2.1140
K ₂		2.2773	2.2495
R		0.1911	0.1355

正交实验结果分析表明,固精参茸丸的最佳提取条件为 A₂B₂,由于采用提取次数的两个水平所得的含量结果差异较小,因此,确定固精参茸丸的提取条件为 A₁B₁,即甲醇回流提取 1h;再加上分次洗涤药渣、容器、滤纸,可提尽芍药苷。

通过以上正交实验优化提取条件及系统的方法学考察,采用本法测定固精参茸丸中芍药苷的含量准确、重现性好。

参考文献

[1] 中国药典 2000 年版一部[S]. 2002: 78; 447.
[2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[J]. 第二卷. 北京: 学苑出版社, 1997: 1100.
[3] 杨国红. 参茸三肾酒质量标准的研究[J]. 中草药, 1994, 25(9): 457.
[4] 魏文树. 中国药理学通报, 1987, 3(3): 148.
[5] 肖喜尚. 安徽医科大学学报, 1993, 29(1): 58.
[6] 李俊. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(1): 53.

收稿日期: 2003-09-27