高效液相色谱法测定阿胶当归合剂中芍药苷的含量

杭清¹,徐翔²,葛卫红³(1.浙江省杭州市预防保健门诊部,浙江 杭州 310014; 2.浙江大学医学院第二附属医院,浙江 杭州 310003; 3.浙江中医学院,浙江 杭州 310053)

摘要:目的 为阿胶当归合剂质量控制提供新方法。方法 色谱柱:Zorbax XDB-C₁₈(3.9×150mm,5μm);流动相:甲醇-水-磷酸(35:65:0.1);检测波长:230nm;柱温:室温;流速:0.8mL·min⁻¹。结果 芍药苷线性范围:3.395~33.95μg·mL⁻¹,相关系数 r 为0.9999,回收率为96.1%,RSD为0.88%。结论 本方法简便、可靠、重现性较好,能起到控制阿胶当归合剂中芍药苷含量的作用。

关键词:阿胶当归合剂;芍药苷;高效液相色谱法

中图分类号:R917.792.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)05-0418-02

Determination of paeoniflorin in Ejiao Danggui mixture

HANG Qing¹, XU Xiang², GE Weihong³(1. Department of Prevention and Health Care of Hangzhou, Zhejiang Province, Hangzhou 310014, China; 2. Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 3. Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an effective quality control method for Ejiao Danggui mixture. **METHODS** Paeoniflorin in Ejiao Danggui mixture was determined by RP-HPLC, using Zorbax XDB-C₁₈(3.9×150mm,5μm) column, methanol-water-0.1% phosphoric acid(35:65:0.1) as mobile phase and UV detector at 230 nm. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **RESULTS** The linear range of paeoniflorin was 3.395~33.95μg·mL⁻¹, the average recovery of paeoniflorin was 96.1% with RSD 0.88%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and repeatable. It can be used for determination of paeoniflorin in Ejiao Danggui mixture.

KEY WORDS: Ejiao Danggui mixture; paeoniflorin; HPLC

阿胶当归合剂^[1]收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第17册,由当归、阿胶、党参、茯苓、黄芪(蜜炙)、白芍(酒制)、熟地黄、川芎(酒制)、甘草(蜜炙)九味中药组成,主要功能主治为补养气血。用于气血亏虚所致贫血、产后血虚、体弱、月经不调、闭经等。由于处方配伍合理,药效作用明显。

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^[2]。白芍为本品处方中的主要臣药之一,芍药苷是该药的主要有效成分,本研究以芍药苷为指标进行含量测定,控制成品的质量。芍药苷的含量测定方法中国药典采用高效液相色谱法。

1 试剂和仪器

仪器:高效液相色谱仪为Agilent 1100,检测器为DAD;C₁₈固相萃取小柱(江苏汉邦科技有限公司);色谱柱Zorbax XDB-C₁₈(3.9×150mm,5μm)(Agilent公司)。试剂:甲醇为色谱纯,水为纯净水,其余试剂为分析纯;芍药苷对照品(批号:0736-200117,中国药品生物制品检定所);供试样品及阴性样品(江西汇仁药业有限公司)。

2 方法与结果^[3]

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax XDB-C₁₈(3.9×150mm,5μm);流动相:甲醇-水-磷酸(35:65:0.1);检测波长:230nm;柱温:室温;流速:0.8mL·min⁻¹。

2.2 测定条件的选择

测定波长的选择:将对照品溶液用紫外分光光度在200~600nm范围内扫描,最大吸收波长与文献报道(230nm)一致,将芍药苷对照品的检测波长定为230nm。

2.3 系统适用性试验

按样品测定项下方法制备供试品、阴性对照品及对照品溶液,照上述色谱条件,各进样20μL,记录HPLC图谱,图谱表明阴性空白溶液色谱没有干扰。理论板数按芍药苷峰计算,应不低于3500。

2.4 线性范围的考察

精密称取经五氧化二磷减压干燥器干燥至恒重的芍药苷对照品约17mg,置于200mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液。分别精密吸取储备液1,2,3,5,10mL置25mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,进样20μL,测定芍药苷峰峰面积,以芍药苷峰峰面积为纵坐标,芍药苷浓度为横坐标拟合标准曲线,得回归方程 $y = 33158x - 4802.4$ ($r = 0.9999$),线性范围:3.395~33.95μg·mL⁻¹。

2.5 溶液制备

供试品溶液的制备:精密移取阿胶当归合剂 4.0 mL 于 50 mL 具塞三角瓶中,加入甲醇 36 mL, 密塞, 摇匀, 冰箱放置 6 h 以上, 过滤, 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 μ L 于 C_{18} 固相萃取小柱 ($\varnothing 8 \times 15$ 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, 摇匀, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 即得供试品溶液。

对照品溶液的制备:精密吸取线性范围的考察项下对照品储备液 2 mL 于 25 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 (每 1 mL 对照品溶液含芍药苷 0.0068 mg)。

阴性供试品溶液的制备:按阿胶当归合剂制备方法制得缺白芍药材的阴性样品制剂。取阴性样品制剂, 按供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

2.6 精密度试验

精密吸取溶液制备项下对照品溶液, 进样 20.0 μ L, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件下测定芍药苷峰面积, 芍药苷峰面积的 RSD = 0.47% ($n = 6$), 结果表明精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取溶液制备项下供试品溶液, 分别在 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 h 时间进样 20 μ L, 按上述色谱条件测定芍药苷峰面积积分值。供试品溶液中芍药苷峰面积 RSD 为 1.2%, 说明供试品溶液制备后 24 h 内测定, 色谱峰面积无明显变化, 在此时间内测定供试品溶液基本稳定。

2.8 重复性试验

分别准确移取同一批阿胶当归合剂 6 份, 按供试品制备项下制备, 按上述色谱条件进行测定。每份重复 3 次进样 20 μ L, 结果见表 1, 从表 1 可知 RSD = 3.44%, 表明重现性良好, 符合要求。

表 1 重现性试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Results of repeatability test ($n = 6$)

实验号	芍药苷的含量 (mg/150 mL)	平均值	RSD (%)
1	19.65	19.975	3.44
2	19.05		
3	19.65		
4	20.70		
5	19.95		
6	20.85		

2.9 加样回收试验

在已知含量的阿胶当归合剂中加入一定量的芍药苷对照品, 按供试品制备项下制备成加样供试品溶液, 再按上述色谱条件测定, 结果见表 2, 从表 2 可知, 加样回收率在 95.05% ~ 97.20%, RSD 为 0.88%。

2.10 样品测定 分别精密吸取溶液制备项下对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 以外标法计算样品中芍药苷的含量, 结果见

表 3。

表 2 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 2 Results of recovery test ($n = 6$)

取样量 (mL)	样品中的 (mg)	加入纯品 量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.5	0.3146	0.3251	0.6268	96.03	96.11	0.88
2.5	0.3146	0.3251	0.6304	97.14		
2.5	0.3146	0.3251	0.6256	95.66		
2.5	0.3146	0.3251	0.6254	95.60		
2.5	0.3146	0.3251	0.6306	97.20		
2.5	0.3146	0.3251	0.6236	95.05		

表 3 阿胶当归合剂中的芍药苷的测定结果 ($n = 3$)

Tab 3 Determination of paeoniflorin in Ejiao Danggui mixture

批号	芍药苷 (mg/150 mL)
20030420	18.2 $\pm$ 0.22
20030424	21.8 $\pm$ 0.25
20030428	16.2 $\pm$ 0.18
20030508	21.9 $\pm$ 0.20
20030512	22.8 $\pm$ 0.19
20030516	20.7 $\pm$ 0.16

3 讨论

3.1 阿胶当归合剂为含有 9 味中药的复方, 成分复杂, 进行含量测定时干扰较大, 经反复试验, 通过 C_{18} 固相萃取小柱对样品进行处理以除去杂质, 排除干扰, 在样品测定时, 芍药苷与其他组分均能达到基线分离, 而缺白芍的阴性对照, 无干扰, 达到测定目的。

3.2 本方法的样品处理较为复杂, 先用甲醇进行沉淀杂质, 再用 C_{18} 固相萃取小柱进行洗脱。在样品处理过程中, 可能造成样品的丢失, 引入方法的系统误差, 导致本方法的重现性试验结果的 RSD 值偏高, 回收率试验结果偏低。

3.3 加入甲醇 36 mL (至终浓度 90%) 是为了去除阿胶当归合剂中的蛋白质等大分子, 以保护色谱柱。由于干扰组分很多, 我们采用了 C_{18} 固相萃取小柱进行预处理, 并对洗脱溶剂用量进行了考察, 取 4 根 C_{18} 固相萃取小柱 ($\varnothing 8 \times 15$ mm, 500 mg), 上样并水洗后先分别用 2 ~ 5 mL 35% 甲醇洗脱, 再用纯甲醇 5 mL 洗脱, 收集 35% 甲醇和纯甲醇洗脱液并定容至 5 mL, 进样 20 μ L, 按上述色谱条件测定, 结果采用 35% 甲醇 5 mL 洗脱时, C_{18} 固相萃取小柱上吸附的芍药苷已洗脱完全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准《中成药方剂》第十七册 [S]. 1997. 11.
- [2] 林启寿. 中草药成分化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981. 208-215.
- [3] 中国药典. 2000 年版一部 [S]. 2000. 18.

收稿日期: 2005-03-07