

表 6 加速试验结果

Tab. 6 Results of accelerated test

观察内容	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月	差值(D)
酸碱度	6.95	6.68	6.51	6.42	6.37	0.58
利巴韦林含量/%	100.3	99.8	99.0	98.4	97.9	2.4
溶液色泽	微黄	微黄	微黄	微黄	黄	-

表 7 长期试验结果

Tab. 7 Results of long term test

观察内容	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月	差值(D)
酸碱度	6.95	6.84	6.76	6.70	6.68	0.27
利巴韦林含量/%	100.3	100.0	99.7	99.5	99.0	1.3
溶液色泽	微黄	微黄	微黄	微黄	微黄	-

根据以上两项试验数据来看,产品在存放 6 个月后的 pH 值分别下降了 0.58 和 0.27,利巴韦林含量分别下降 2.4%和 1.3%。

3 讨论

通过对产品质量稳定性各主要因素及影响路径的分析和试验,确定了中间品溶液 pH、灭菌温度和金属离子为最可能影响产品质量稳定性的 3 个因素,从而采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行工艺条件的优化。结果显示,因素 A、B、C 的 R 值分别为 2.30, 0.34, 0.21, 即因素 $A>B>C$,证明中间品溶液的 pH 值对灭菌后产品在 25 °C/60% RH 条件下放置 1 个月后产品的 pH 值变化的影响最大,灭菌温度对其 pH 值的影响其次,而金属离子的存在对其 pH 值的影响相对最小,但也不容忽视。优选最

佳工艺条件为中间品 pH 值 7.0, 105 °C/30 min 灭菌并用 EDTA-2Na 处理。由此制得的产品,经过 6 个月的加速试验(40 °C, 75% RH)和长期试验(25 °C, 60% RH),产品的 pH 值、利巴韦林含量以及溶液色泽均较稳定,较好地提升了该产品的工艺水平和质量稳定性。

根据以上研究结果,综合考虑制备过程中的实际情况,确定复方利巴韦林口服液工艺条件为中间品的 pH 值 6.9~7.0, 105 °C/30 min 灭菌,纯化水为溶剂,并用 EDTA-2Na 对接触药液的容器具进行严格处理。以此为该产品的优选工艺条件,所得产品质量稳定可靠,较目前市售产品的稳定性有显著提升。

REFERENCES

- [1] 浙江省医疗制剂规范(2005)[S]. 2005: 253.
- [2] 赵云强. 蔗糖转化速率常数与酸度和温度的关系[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2000, 18(4): 84-86.
- [3] CHENG R Z, GAO H W, WANG X J. The mechanism study of acid catalyzed sucrose hydrolysis reaction [J]. J Changchun Teach Coll(长春师范学院学报), 1999, 18(5): 19-21.
- [4] ZHANG J, LI Y P, WANG B Y. Sucrase catalyzed hydrolysis of sucrose [J]. J Luoyang Teach Coll(洛阳师范学院学报), 2011, 30(2): 54-56.
- [5] ZHOU K. The study of saccharides hydrolysis to levulinic acid [D]. Jiangsu: Jiangnan Normal University, 2008.
- [6] 顾学裘. 药物制剂注解[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 181.
- [7] 中国药典. 第二部[S]. 2010: 1207, 附录 15.

收稿日期: 2014-07-01

HPLC 同时测定补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的含量

陈为飞¹, 李渊贞², 朱希², 王玲², 尹华^{2*} (1.浙江司太立制药股份有限公司, 浙江 仙居 317300; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 采用 HPLC 波长切换法, 建立同时测定补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛 3 成分含量的分析方法。方法 采用 Zorbax Extend-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的检测波长分别为 227, 210, 290 nm; 进行样品前处理工艺和方法学考察。结果 松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷和桂皮醛均得到很好分离, 浓度分别在 0.426 0~2.88 6 μg·mL⁻¹, 7.455~86.60 μg·mL⁻¹ 和 0.440 6~13.22 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r \geq 0.999$); 平均加样回收率分别为 98.3%(RSD=1.6%), 101.4%(RSD=1.1%)和 100.0%(RSD=1.2%); 精密度试验峰面积 RSD 均 ≤ 1.4%。结论 该方法预处理简单, 方法灵敏、准确、重复性好, 可用于补肾活血颗粒及相关制剂的质量控制。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273772); 浙江省中医药科学研究基金计划项目(2010ZA026); 浙江省中药现代化项目(浙经信[2010]421 号)

作者简介: 陈为飞, 男, 工程师 Tel: (0576)87718649 E-mail: Cwf1166@163.com *通信作者: 尹华, 女, 教授, 博导 Tel: (0571)86613604 E-mail: maryyinhu@163.com

关键词: 补肾活血颗粒; 高效液相色谱法; 波长切换法; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0463-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.019

Simultaneous Determination of Pinoresinol Diglucoside, Amygdalin and Cinnamylaldehyde in Bushen Huoxue Granule

CHEN Weifei¹, LI Yuanzhen², ZHU Xi², WANG Ling², YIN Hua^{2*} (1.Zhejiang Starry Pharmaceutical Co., Ltd., Xianju 317300, China; 2.College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of pinoresinol diglucoside, amygdalin, and cinnamylaldehyde in Bushen Huoxue granule. **METHODS** Agilent Zorbax Extend-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm) was adopted; the mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 210 nm(0–5 min) for amygdalin, 227 nm(5–10 min) for pinoresinol diglucoside, 290 nm(10–14 min) for cinnamylaldehyde. The methodological study included sample pre-treatment process and method validation. **RESULTS** The components of pinoresinol diglucoside, amygdalin, and cinnamylaldehyde were well separated, the method had a good linearity in the range of 0.426 0–2.88 6 μg·mL⁻¹, 7.455–86.60 μg·mL⁻¹ and 0.440 6–13.22 μg·mL⁻¹($r \geq 0.999$); the average recoveries were 98.3% (RSD=1.6%), 101.4%(RSD=1.1%), 100.0%(RSD=1.2%), respectively, and the RSDs of intra-day and inter-day assays were all $\leq 1.4\%$. **CONCLUSION** This method was simple, sensitive and reproducible and can be used for the quality control of Bushen Huoxue granule and its related preparation.

KEY WORDS: Bushen Huoxue granule; HPLC; wavelength switching; content determination

补肾活血颗粒组方为熟地、杜仲、附子、肉桂、山茱萸、枸杞、桃仁、红花、山药、甘草等 10 味中药。其中杜仲为君药,具有调节骨代谢作用,对血压有“双向调节”功能,其生理活性成分为松脂醇二葡萄糖苷等木脂素类成分和黄酮类成分^[1-2]。肉桂为臣药,具有扩张血管、调节血液循环,通过调节神经体液来调节机体的物质能量代谢,改善机体的应激状态等作用,其生理活性成分为桂皮醛、桂皮酸等^[3-4]。桃仁为佐药,具有活血化瘀作用,其生理活性成分主要为苦杏仁苷^[5]。在前期研究的基础上,鉴于制备工艺分为水提和醇提两部分,故最终确定以杜仲的有效成分松脂醇二葡萄糖苷、肉桂的有效成分桂皮醛、桃仁的有效成分苦杏仁苷作为补肾活血颗粒的含量测定指标。本文采用较为简便的前处理工艺,通过在合适的时间点切换检测波长,建立多成分同时定量分析的方法,并将其用于补肾活血颗粒中上述 3 种成分的含量测定,以较全面地反映和控制补肾活血颗粒的质量。

1 仪器与试剂

Water 高效液相色谱系统 1525-2998(美国 Waters 公司,二元梯度泵,二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站);BD211D 电子天平(德国塞多利斯);ELGA 纯水机(英国 ELGA);R204 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);DZKW-4 型电子恒温不锈钢水浴锅(上海东星建材实验设备有限公

司);PHS-3TC(0.01 级)精密数显酸度计(上海天达仪器有限公司)。

松脂醇二葡萄糖苷对照品(批号:11537-200501,供含量测定用)、苦杏仁苷对照品(批号:110820-9910,供含量测定用)、桂皮醛(批号:110710-200714,供含量测定用)对照品均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈(色谱纯);其他试剂均为分析纯;补肾活血颗粒制剂(中药标准化研究实验室,批号:20100203,规格:15 g·包⁻¹);水为过 0.22 μm 滤膜的纯化水。

2 方法和结果^[5-8]

2.1 对照品溶液的制备

分别取松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 分别含松脂醇二葡萄糖苷 1.065 mg、苦杏仁苷 1.443 mg、桂皮醛 0.440 6 mg 的混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备

取补肾活血颗粒约 1.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入乙腈-水(13:87)25 mL,回流提取 30 min,放冷,滤过,精密吸取续滤液 1 mL 置 5 mL 量瓶中,用流动相稀释并定容,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱:0~

8.0 min, 13%A, 8.0~8.5 min, 13%A→55%A, 8.5~13.0 min, 55%A, 13.0~13.5 min, 55%A→13%A; 松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛检测波长分别为: 227, 210, 290 nm; 波长切换时间为: 0~5 min, 210 nm, 5~10 min, 227 nm, 10~14 min, 290 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。上述色谱条件下, 3 个成分的分度均>1.5; 理论板数≥1 000。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 按补肾活血颗粒的制备方法

制成缺杜仲的阴性制剂, 再按“2.2”项下方法制成缺杜仲、桃仁、肉桂的阴性对照溶液。混合对照品溶液、补肾活血颗粒样品溶液、阴性对照溶液分别进样分析, 补肾活血颗粒供试品色谱图中, 在与对照品色谱图相应的位置上, 有 3 个相同保留时间的色谱峰; 而缺杜仲、桃仁、肉桂的阴性对照溶液在相应保留时间处无色谱峰, 说明补肾活血颗粒中其他药味对松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的测定不产生干扰, 方法专属性好, 色谱图见图 1。

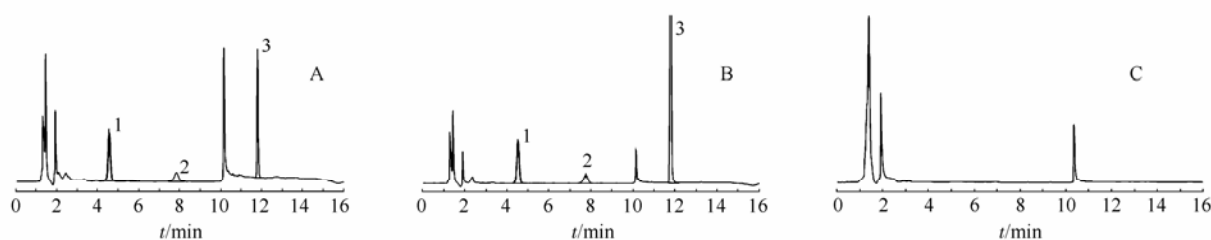


图 1 高效液相色谱图

A-供试品; B-混合对照品; C-阴性对照溶液; 1-苦杏仁苷; 2-松脂醇二葡萄糖苷; 3-桂皮醛。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-standard solution; C-blank; 1-amygdalin; 2-pinoresinol diglucoside; 3-cinnamyl aldehyde.

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛对照品溶液适量, 制备得 8 个浓度的系列混合对照品溶液。按照混合对照品溶液浓度由低到高, 按“2.3”项下色谱条件测定, 以各成分的浓度(X)对峰面积(Y)进行线性回归, 回归方程分别为 $Y_{\text{松脂醇二葡萄糖苷}} = 1.507 \times 10^3 X - 2.982 \times 10^3 (r=0.999\ 0)$, $Y_{\text{苦杏仁苷}} = 1.331 \times 10^6 X - 5.705 \times 10^4 (r=0.999\ 5)$, $Y_{\text{桂皮醛}} = 1.215 \times 10^4 X - 3.921 \times 10^4 (r=0.999\ 5)$; 线性范围依次为 0.426 0~2.88 6 μg·mL⁻¹, 7.455~86.60 μg·mL⁻¹, 0.440 6~13.22 μg·mL⁻¹。

2.4.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 在确定的最佳色谱条件下, 连续重复进样 6 次, 并分别于当天和 2, 3, 4, 5 d 进样, 计算各成分的平均峰面积及峰面积的 RSD。松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的混合对照品溶液峰面积的日内精密度分别为 1.4%, 0.92%, 0.49%, 峰面积的日间精密度分别为 1.3%, 0.48%, 0.49%, 表明各成分对照品溶液的日内精密度和日间精密度均良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液各 20 μL, 按“2.3”项下色谱条件, 分别于 0, 1, 2,

4, 8, 20, 24, 48 h 进样测定, 记录各成分的峰面积。48 h 内供试品溶液中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 0.081%, 0.30%, 表明供试品溶液在 48 h 内均保持稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批次补肾活血颗粒(批号: 20100228)6 份, 每份约 1.5 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 6 份补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷的平均含量为 0.438 9 mg·g⁻¹, RSD 为 1.0%; 苦杏仁苷的平均含量为 6.148 mg·g⁻¹, RSD 为 0.56%; 桂皮醛的平均含量为 0.649 4 mg·g⁻¹, RSD 为 0.53%, 表明 3 个成分重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的补肾活血颗粒(批号: 20100228)6 份, 每份 0.75 g, 精密称定, 分别精密加入 1.065 mg·mL⁻¹ 松脂醇二葡萄糖苷对照品溶液 0.35 mL、1.443 mg·mL⁻¹ 苦杏仁苷对照品溶液 3.5 mL、0.440 6 mg·mL⁻¹ 桂皮醛对照品溶液 1.2 mL, 按“2.2”项下方法处理, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 结果补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的平均回收率分别为 98.3%, 101.4%, 100.0%, 其 RSD 分别为 1.6%, 1.1%, 1.2%, 结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 The results of recovery test($n=6$)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
松脂醇二 葡萄糖苷	0.329 0	0.372 8	0.686 6	95.92	98.3	1.6
	0.330 8	0.372 8	0.702 4	99.68		
	0.328 6	0.372 8	0.692 2	97.53		
	0.336 0	0.372 8	0.704 7	98.90		
	0.328 1	0.372 8	0.691 2	97.40		
苦杏仁苷	0.337 4	0.372 8	0.710 7	100.1	101.4	1.1
	4.608	5.050	9.761	102.0		
	4.633	5.050	9.763	101.6		
	4.603	5.050	9.760	102.1		
	4.706	5.050	9.758	100.0		
桂皮醛	4.596	5.050	9.775	102.6	100.0	1.2
	4.727	5.050	9.771	99.88		
	0.486 7	0.528 7	1.018 2	100.5		
	0.489 4	0.528 7	1.022 2	100.8		
	0.486 2	0.528 7	1.019 3	100.8		
桂皮醛	0.497 1	0.528 7	1.018 2	98.56	100.0	1.2
	0.485 5	0.528 7	1.018 4	100.8		
	0.499 3	0.528 7	1.019 1	98.32		

2.5 样品测定

取 3 个批号的补肾活血颗粒, 每批各 2 份, 每份约 1.5 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 计算样品中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的含量, 结果见表 2。

表 2 三成分含量测定结果($n=2$)

Tab. 2 Results of sample determination($n=2$)

批号	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	松脂醇二葡萄糖苷	苦杏仁苷	桂皮醛
20100203	0.444 4	6.341	0.676 8
20100228	0.439 9	6.293	0.671 2
20100304	0.439 8	6.261	0.667 2

3 讨论

前期分别研究了补肾活血颗粒的提取、纯化及成型工艺, 确定了补肾活血颗粒的最佳制备工艺^[9-10]。在进行质量标准研究时发现, 3 个成分的紫外最大吸收波长相差较大, 松脂醇二葡萄糖苷 227 nm、苦杏仁苷 210 nm、桂皮醛 290 nm, 无法以一个固定波长同时测定 3 成分的含量; 而分别在每个组分的最大吸收波长下进行样品中各个单组分的含量测定虽易实现, 但工作量大大增加, 且耗时耗材。本实验采用梯度洗脱波长切换技术, 在各个组分的出峰段选择相应的最大吸收波长作为检测波长, 可在同一色谱系统同时检测松脂醇

二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛 3 个成分含量, 并实现各成分分别在其最大吸收波长下进行检测, 提高了多组分体系检测的灵敏度。通过比较不同的溶剂和调节流动相比比例, 在水-乙腈(87:13~45:55)梯度洗脱下, 松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛 3 个成分的峰形较佳, 与相邻峰分离良好。

根据制剂中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的含量测定结果, 以 3 批制剂平均含量的 80%作为补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的含量限度, 故规定制剂中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的含量限度分别为 0.353, 5.04, 0.537 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

REFERENCES

[1] TONG P J, XU L, HU B S, et al. *In vitro* induction studies of Yougui drink on culture of steroid induced necrosis of femoral head rat osteoblast [J]. China J Orthop Traumatol(中国骨伤), 2010, 23(1): 23-27.

[2] JIANG B F, FANG J L, YU N Z, et al. The influence of You Gui Yin on the local adiponectin expression of steroid-induced osteonecrosis of femoral head of rats [J]. J Tradit Chin Orthop Traumatol(中医正骨), 2010, 22(5): 11-14.

[3] 江春艳, 许激扬, 卞筱泓, 等. 杜仲降压成分的组及血管舒张作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 218-220.

[4] ZHAO J X, LI P, SHENG X, et al. Effects of Cinnamyl aldehyde on cell cycle and relafeol proteins expression in NIH3T3 cells [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(16): 1692-1694.

[5] QIAN X, LUO G, XU F. Determination of pinoreosinol diglucoside in Eucommia Formula granules by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2012, 21(10): 36-37.

[6] YAO H, YAO H J, LI S, et al. Determination of cinnamic acid, cinnama ldehyde, paeonol, alisol B 23-acetate, atractylodes lancea and atractylodin in Yeming granules by RP-HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2012, 47(15): 1242-1245.

[7] YANG D B, TONG Y, MA Z S, et al. Simultaneous determination of ephedrine hydrochloride, D-pseudoephedrine and amygdalin in Xiao'er Pingchuan Qutan granule by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(5): 687-690.

[8] GAO M. Determination of amygdalin in Sangju Ganmao granules by HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2013, 25(9): 59-61.

[9] YIN H, LI Y Z, ZHANG J H. Study on the water-extraction process of the Bushen Huoxue granules with multiple index by HPLC wave length switching [J]. Chin J Mod App Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(3): 326-329.

[10] ZHU X, YIN H, LI Y Z. Study on drying and molding process of Bushen Huoxue granules [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(3): 585-588.

收稿日期: 2014-06-12