

HPLC 同时测定坤泰胶囊中毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷含量

郑阿旭(南阳市食品药品检验所, 河南 南阳 473000)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定坤泰胶囊中毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷含量的方法, 为完善现有质量标准提供参考。方法 采用 Phenomexsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 乙酸为流动相 B, 采用梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 毛蕊花糖苷的检测波长为 334 nm, 芍药苷检测波长为 230 nm, 黄芩苷的检测波长为 280 nm。结果 毛蕊花糖苷在 3.27~32.68 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 98.4%, RSD 为 0.68%(n=6); 芍药苷在 17.65~176.51 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 99.2%, RSD 为 1.08%(n=6); 黄芩苷在 48.78~487.77 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 97.7%, RSD 为 0.87%(n=6)。结论 该方法简便、快捷、结果准确、重复性好, 可应用于坤泰胶囊的质量控制。

关键词: 坤泰胶囊; 毛蕊花糖苷; 芍药苷; 黄芩苷; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)11-1367-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.011

引用本文: 郑阿旭. HPLC 同时测定坤泰胶囊中毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1367-1369.

Simultaneous Determination of Verbascoside, Paeoniflorin and Baicalin in Kuntai Capsules by HPLC

ZHENG A'xu(Nanyang Food and Drug Inspection Institute, Nanyang 473000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of verbascoside, paeoniflorin and baicalin in Kuntai capsules, provide reference for the improvement of the existing quality standards. **METHODS** Using Phenomexsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatography column; mobile phase was acetonitrile(A)-0.1% acetic(B) with gradient elution; flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; column temperature was 35 °C; the detection wavelength of verbascoside, paeoniflorin and baicalin was 334, 230, 280 nm, respectively. **RESULTS** Verbascoside had good linear relationship in 3.27~32.68 μg·mL⁻¹, the average recovery was 98.4%, RSD was 0.68%(n=6). Paeoniflorin had good linear relationship in 17.65~176.51 μg·mL⁻¹, the average recovery was 99.2%, RSD was 1.08%(n=6). Baicalin had good linear relationship in 48.78~487.77 μg·mL⁻¹, the average recovery was 97.7%, RSD was 0.87%(n=6). **CONCLUSION** The method is simple, shortcut, accurate, repeatable and can be used for the quality control of Kuntai capsules.

KEYWORDS: Kuntai capsules; verbascoside; paeoniflorin; baicalin; content determination

坤泰胶囊由熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶、茯苓加工而成, 具有滋阴清热、安神除烦功能, 用于治疗阴虚火旺者, 症见潮热面红、自汗盗汗、心烦不宁、失眠多梦、头晕耳鸣、腰膝酸软、手足心热; 妇女卵巢功能衰退更年期综合征。原标准仅对盐酸小檗碱成分进行了含量测定^[1], 熟地黄作为方中君药, 原标准未对其定量, 白芍和黄芩作为方中重要组成部分, 原标准也未对其定量, 故笔者制定了采用 HPLC 同时测定有效成分毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷含量的方法, 更有利于对坤泰胶囊的质量控制, 为进一步完善该制剂质量标准提供参考依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效色谱系统-2996PDA 检测器(美国 Waters 公司); RHCX-300 超声波清洗器(济

宁荣汇超声波设备有限公司); BP211D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

对照品: 毛蕊花糖苷(批号: 111530-201512; 纯度: 96.7%; 供含量测定用)、芍药苷(批号: 110736-201337; 纯度: 94.9%; 供含量测定用)和黄芩苷(批号: 110715-201318; 纯度: 93.3%; 供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供; 坤泰胶囊(贵阳新天药业股份有限公司, 批号: 170920, 171109, 180114); 阴性样品自制。乙腈(色谱纯, 西陇化工股份有限公司); 乙酸(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomexsil C₁₈ 键合硅胶柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 以乙腈为流动相 A, 0.1%

作者简介: 郑阿旭, 男, 主管中药师

Tel: (0377)63892589

E-mail: 10875345@qq.com

乙酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱(0~25 min, 16%A; 25~40 min, 16%→45%A; 40~41 min, 45%→16%A; 41~45 min, 16%A); 检测波长: 毛蕊花糖苷为 334 nm, 芍药苷为 230 nm, 黄芩苷为 280 nm; 柱温: 35 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 供试品溶液的制备^[2]

取装量差异项下的内容物, 混匀, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80%甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 35 min(功率 300 W, 频率 40 KHz), 放冷, 再称定质量, 用 80%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

取毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加 80%甲醇制成混合对照品溶液(毛蕊花糖苷为 32.68 μg·mL⁻¹, 芍药苷为 176.51 μg·mL⁻¹, 黄芩苷为 487.77 μg·mL⁻¹)。

2.4 阴性样品溶液的制备

按坤泰胶囊处方制备不含熟地黄、白芍和黄芩的阴性样品, 按“2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 专属性考察^[3]

分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性样品溶液各 10 μL, 注入 HPLC 色谱仪, 记录色谱图。结果显示毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷色谱峰与其他各峰分离较好, 理论板数均>3 000。供试品与对照品色谱相应的位置上, 毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷色谱峰保留时间一致, 无杂峰干扰。方中除熟地黄、白芍和黄芩外的其他药味均不干扰毛蕊花糖苷、芍药苷、黄芩苷的含量测定。结果见图 1。

2.6 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 80%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为系列对照品溶液, 分别进样 10 μL, 按“2.1”项下条件进行测定, 以峰面积为纵坐标, 毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷的浓度为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程, 毛蕊花糖苷: $Y=1.3385 \times 10^4 X - 4.4637 \times 10^3$, $r=0.9997$; 芍药苷: $Y=1.4041 \times 10^4 X - 1.1453 \times 10^4$, $r=0.9998$; 黄芩苷: $Y=3.6709 \times 10^4 X - 2.8341 \times 10^5$, $r=0.9998$ 。结果表明毛蕊花糖苷在 3.27~32.68 μg·mL⁻¹内线性关系良好; 芍药苷在 17.65~176.51 μg·mL⁻¹内线性关系良好; 黄芩苷在 48.78~487.77 μg·mL⁻¹

内线性关系良好。

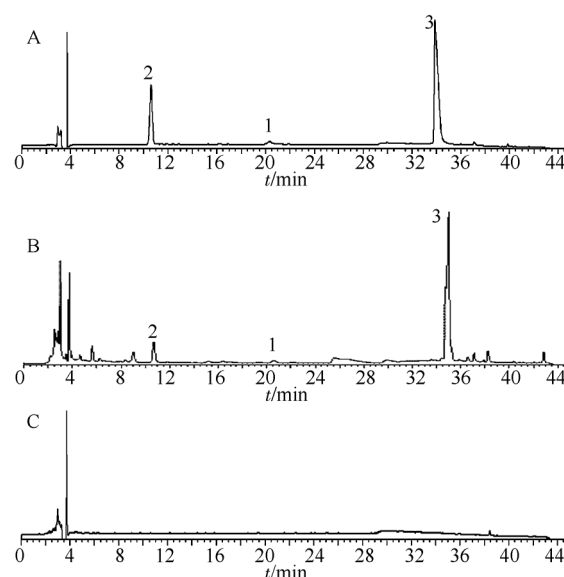


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性样品溶液; 1-毛蕊花糖苷; 2-芍药苷; 3-黄芩苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed standard solution; B-sample solution; C-blank sample solution; 1-verbascoide; 2-paeoniflorin; 3-baicalin.

2.7 仪器精密度试验

取混合对照品溶液 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算结果显示毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 为 0.79%; 芍药苷峰面积的 RSD 为 0.98%; 黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.67%, 表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

取同一批坤泰胶囊(批号: 170920), 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果样品中毛蕊花糖苷含量 RSD 为 0.97%; 芍药苷含量 RSD 为 0.85%; 黄芩苷含量 RSD 为 0.78%, 表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性考察

取“2.8”项下同一供试品溶液, 在室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后, 每次进样 10 μL, 测定其峰面积, 毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 为 0.84% ($n=6$), 芍药苷峰面积的 RSD 为 0.95% ($n=6$), 黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.91% ($n=6$)。试验结果表明, 供试品在 24 h 内基本稳定。

2.10 加样回收率试验

分别精密称取已知含量的同一批坤泰胶囊(批号: 170920)粉末 0.5 g, 共 6 份, 分别精密加入含 2.75 μg·mL⁻¹的毛蕊花糖苷、41.72 μg·mL⁻¹的芍药

苷和 144.43 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷的混合对照品溶液 50 mL, 按“2.2”项下制备方法处理, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Recovery test results

样品份数	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
毛蕊花糖苷	0.510 2	0.140 8	0.137 5	0.276 1	98.40	98.4	0.68
	0.501 0	0.138 3	0.137 5	0.272 4	97.53		
	0.502 4	0.138 7	0.137 5	0.274 3	98.62		
	0.511 3	0.141 1	0.137 5	0.277 5	99.20		
	0.499 4	0.137 8	0.137 5	0.272 6	98.04		
	0.499 9	0.138 0	0.137 5	0.273 9	98.84		
芍药苷	0.510 2	2.131 0	2.086 0	4.167 5	97.63	99.2	1.08
	0.501 0	2.092 6	2.086 0	4.155 4	98.89		
	0.502 4	2.098 4	2.086 0	4.164 2	99.03		
	0.511 3	2.135 6	2.086 0	4.227 9	100.30		
	0.499 4	2.085 9	2.086 0	4.143 5	98.63		
	0.499 9	2.088 0	2.086 0	4.183 5	100.46		
黄芩苷	0.510 2	7.372 5	7.221 5	14.498 4	98.68	97.7	0.87
	0.501 0	7.239 6	7.221 5	14.239 3	97.27		
	0.502 4	7.259 8	7.221 5	14.284 1	96.93		
	0.511 3	7.388 4	7.221 5	14.480 4	98.21		
	0.499 4	7.216 4	7.221 5	14.319 4	98.36		
	0.499 9	7.223 7	7.221 5	14.201 1	96.62		

2.11 样品含量测定

取 3 批样品进行毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷的含量测定, 每份样品测定 3 次, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Results of sample determination($n=3$)

批号	毛蕊花糖苷		芍药苷		黄芩苷	
	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
170920	0.276 0	1.12	4.176 8	1.04	14.450 2	0.89
171109	0.281 2	0.98	4.198 4	1.24	14.172 9	1.24
180114	0.263 5	1.37	4.095 6	0.85	14.586 2	1.47

3 讨论

3.1 超声时间的选择

本研究在试验过程中曾对提取时间分别以超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 25, 35, 45 min 进行考察, 超声提取 35 min 和 45 min 时, 供试品中所测各组分含量相差很小, 而超声提取 25 min 各组分含量明显低于超声提取 35 min 和 45 min 所

测含量, 又采用回流提取 35 min 与超声提取 35 min 进行测定并比较结果, 两者含量相差极小, 因超声处理相对简便, 所以供试品制备的最佳提取条件为超声(功率 300 W, 频率 40 KHz)提取 35 min。

3.2 检测波长的选择

通过 PAD 检测器在紫外光波范围扫描得知, 毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷的最大吸收波长分别为 334, 230, 280 nm, 故本研究设定检测波长分别为 334, 230, 280 nm, 可以满足各指标成分含量测定的要求, 保证了测定结果的准确性。

3.3 流动相的选择

通过查阅相关文献, 试验考察了不同比例乙腈-0.4%磷酸^[4]、乙腈-0.1%乙酸、乙腈-0.1%磷酸^[5-6]为流动相采用梯度洗脱的分离效果, 结果显示采用乙腈-0.1%乙酸流动相梯度洗脱法各组分峰形良好, 分离效果最好。

本实验在坤泰胶囊原标准的基础上由单一的盐酸小檗碱含量测定增加了同时测定毛蕊花糖苷、芍药苷和黄芩苷的含量, 专属性更强, 使质控标准更趋完善, 更加有效控制了坤泰胶囊的质量。

REFERENCES

[1] 国家药品监督管理局. 国家药品标准新药转正标准[S]. 第 54 册, 2006: Appendix 35-38.

[2] ZANG W Y, MAO C Q, SU X N, et al. Simultaneous determination of paeoniflorin, ferulic acid, verbascoside and spinosin in Yijing granules by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学), 2016, 22(5): 60-63.

[3] WANG B L, WANG X D, SHI X F, et al. Simultaneous determination of quercetin, luteolin and isorhamnetin in pollen of *Paeonia rockii* by RP-HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 262-265.

[4] YANG Y F. RP-HPLC determination of paeoniflorin, baicalin, palmitate hydrochloride and berberine hydrochloride in Kuntai capsules [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(6): 958-960.

[5] DENG J, CHEN H, JIN W H. Determination of catalpol, verbascoside, atractylenolide- I and atractylenolide- III in Dangshen Yangrong pills by HPLC [J]. Chin J Pharmacov(中国药物警戒), 2015, 12(1): 26-29.

[6] YAN Q R, WU W K. Simultaneous determination of baicalin and paeoniflorin in xuanlan yanhouyan granules by double wavelength HPLC [J]. Pharm Today(今日药学), 2016, 26(12): 837-839.

收稿日期: 2018-07-12

(本文责编: 李艳芳)