

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.05.005

高效液相色谱法同时测定六味补血胶囊中没食子酸、芍药苷和蒙本内酯含量*

关潇滢^{1,2}, 曾利娜^{1,2}, 胡晓谕³, 温晓丽³, 赵渝³, 肖丽和^{1,2,Δ}

(1. 广东省深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057; 2. 深圳药品质量标准研究重点实验室, 广东 深圳 518057; 3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立测定六味补血胶囊中没食子酸、芍药苷和蒙本内酯含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用 Symmetry Shield RP₁₈ ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 采用波长切换方式, 检测波长没食子酸为 280 nm, 芍药苷为 230 nm, 蒙本内酯为 334 nm。结果 没食子酸、芍药苷和蒙本内酯质量浓度分别在 0.046~0.910, 0.049~0.970 g/L, 2.1~52.3 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 99.20%, 98.79%, 97.15%, RSD 分别为 0.29%, 0.97%, 0.81% (n=6)。结论 该方法准确、可靠、重复性好, 可用于六味补血胶囊的质量控制。

关键词: 六味补血胶囊; 没食子酸; 芍药苷; 蒙本内酯; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)05-0013-03

Simultaneous Determination of Gallic Acid, Paeoniflorin and Ligustilide in Liuwei Buxue Capsules by HPLC

Guan Xiaoying^{1,2}, Zeng Li'na^{1,2}, Hu Xiaoyu³, Wen Xiaoli³, Zhao Yu³, Xiao Lihel^{1,2}

(1. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen, Guangdong, China 518057; 2. Shenzhen Key Laboratory of Drug Quality Standard Research, Shenzhen, Guangdong, China 518057; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110016)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of gallic acid, paeoniflorin and ligustilide in Liuwei Buxue Capsules. **Methods** The Symmetry Shield RP₁₈ ODS column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with gradient elution, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution, the flow rate was 1.0 mL/min, the mode of wavelength switching was used, the detection wavelength was 280 nm for gallic acid, 230 nm for paeoniflorin and 334 nm for ligustilide. **Results** The linear ranges of gallic acid, paeoniflorin and ligustilide were 0.046-0.910 g/L, 0.049-0.970 g/L, 2.1-52.3 μg/mL. The average recoveries were 99.20%, 98.79%, 97.15%. RSDs were 0.29%, 0.97%, 0.81% (n=6). **Conclusion** The method is accurate, reliable and reproducible, which can be used for the quality control of Liuwei Buxue Capsules.

Key words: Liuwei Buxue Capsule; gallic acid; paeoniflorin; ligustilide; HPLC; content determination

六味补血胶囊以经典补血养血方剂四物汤为基础, 在当归、白芍、熟地黄及川芎 4 味药材基础上辅以黄芪和紫草, 具有益气补血之功效, 对女性气血两虚之症具有确切疗效^[1]。六味补血胶囊现行质量标准(标准号 YBZ05452009)中含量测定项仅选取方中佐药白芍所含的芍药苷进行测定, 并未对君药当归及其他药味进行含量控制, 存在不足。为完善该制剂的含量测定方法, 本研究选取当归中主要成分蒙本内酯^[2-4]、白芍中没食子酸^[5]和芍药苷^[6-7]作为测定指标, 并参照蒙本内酯^[8-9]、没食子酸^[10-12]、芍药苷^[13-15]3 种成分的含量测定方法, 建立同时测定上述 3 种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

E2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 包括 2998 PDA 检测器、自动进样器、四元梯度泵、Empower3 色谱工作站; XS205 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); TW423L 型分析天平(日本岛津公司); SB-25-12DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

六味补血胶囊(深圳国源国药有限公司, 批号分别为 20151204, 20151205, 20151206); 没食子酸对照品(批号为 110831-201605, 纯度为 90.8%), 芍药苷对照品(批号为 110736-201741, 纯度为 95.7%), 蒙本内酯

*基金项目: 广东省深圳市科技计划项目[JCYJ20140722104416530]。

第一作者: 关潇滢, 女, 满族, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为中药质量控制方法及质量标准, (电话)0755-26031745(电子信箱)guanxy1213@163.com。

Δ通信作者: 肖丽和, 女, 硕士研究生, 主任中药师, 研究方向为药品质量控制方法及质量标准, (电话)0755-26031801(电子信箱)lihexiao@163.com。

对照品(批号为111737-201507),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,德国默克公司);甲醇,磷酸(分析纯,广州化学试剂厂);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry Shield RP₁₈ ODS柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱,梯度洗脱条件见表1;柱温:35℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:没食子酸 280 nm,芍药苷 230 nm,藁本内酯 334 nm,采用波长切换方式检测;进样量:10 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 → 5	5	95
5 → 20	5 → 17	95 → 83
20 → 25	17 → 18	83 → 82
25 → 30	18 → 60	82 → 40
30 → 40	60 → 88	40 → 12

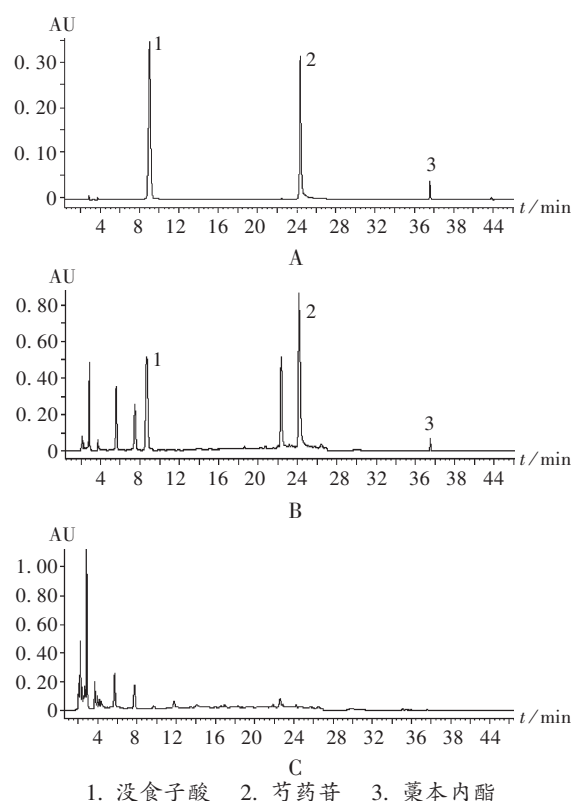
2.2 溶液制备

取没食子酸对照品 80.22 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为没食子酸对照品贮备液;取芍药苷对照品 101.48 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释,定容至刻度,摇匀,作为芍药苷对照品贮备液;取藁本内酯对照品 10.49 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇稀释,定容至刻度,摇匀,作为藁本内酯对照品贮备液。均置 4℃ 冰箱备用。精密量取没食子酸对照品贮备液 0.5 mL、芍药苷对照品贮备液 0.5 mL、藁本内酯对照品贮备液 0.2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

称取六味补血胶囊内容物 1 g,精密称定,置 25 mL 容量瓶,加甲醇约 20 mL,超声处理 30 min,放置室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按照六味补血胶囊的处方及制法,制备不含当归和白芍的阴性样品,按供试品溶液制备法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验:取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液,按拟订色谱条件进行测定,记录色谱



1. 没食子酸 2. 芍药苷 3. 藁本内酯
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图1 高效液相色谱图

图。结果没食子酸、芍药苷和藁本内酯峰与其他吸收峰均达到基线分离,阴性无干扰(见图1)。

线性关系考察:精密量取没食子酸对照品贮备液和芍药苷对照品贮备液 0.125, 0.250, 0.500, 1.250, 2.000, 2.500 mL,藁本内酯对照品贮备液 0.04, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 1.00 mL,置 10 mL 容量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。按拟订色谱条件测定,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。结果见表2。

精密度试验:取同一混合对照品溶液,按拟订色谱条件,连续进样 6 针,测定峰面积。结果见表2。可见,仪器精密度良好。

重复性试验:取六味补血胶囊(批号为20151206)内容物适量,依法平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件测定,记录峰面积。结果见表2。可见,方法重复性良好。

稳定性试验:依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 时测定。结果见表2。可见,

表2 线性关系考察、精密度及稳定性试验结果(n=6)

成分	线性关系考察			精密度试验	重复性试验	稳定性试验
	回归方程	r	质量浓度线性范围	RSD(%)	RSD(%)	RSD(%)
没食子酸	$Y = 2.8 \times 10^7 X - 3.9 \times 10^4$	0.999 6	0.046 ~ 0.910 g/L	0.28	0.92	0.23
芍药苷	$Y = 1.2 \times 10^7 X - 1.6 \times 10^5$	0.999 3	0.049 ~ 0.970 g/L	0.74	0.88	0.48
藁本内酯	$Y = 2.1 \times 10^4 X - 0.94 \times 10^3$	0.999 4	2.1 ~ 52.3 μg/mL	0.29	1.65	0.94

表3 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.495 1	0.495 1	0.495 1	3.587 1	11.152 4	0.240 7	3.642 0	11.654 0	0.262 3	7.213 8	22.495 7	0.494 4	99.58	97.33	96.71						
0.505 7	0.505 7	0.505 7	3.663 9	11.391 2	0.245 8	3.642 0	11.654 0	0.262 3	7.275 8	22.877 4	0.500 5	99.17	98.56	97.08						
0.497 5	0.497 5	0.497 5	3.604 5	11.206 5	0.241 9	3.642 0	11.654 0	0.262 3	7.250 3	22.714 7	0.500 8	100.10	98.75	98.71	99.20	98.79	97.15	0.29	0.97	0.81
0.526 3	0.526 3	0.526 3	3.813 2	11.855 2	0.255 9	3.642 0	11.654 0	0.262 3	7.359 8	23.429 5	0.509 5	97.38	99.32	96.69						
0.508 7	0.508 7	0.508 7	3.685 7	11.458 8	0.247 3	3.642 0	11.654 0	0.262 3	7.284 4	22.943 1	0.500 8	98.81	98.54	96.64						
0.493 8	0.493 8	0.493 8	3.577 7	11.123 1	0.240 1	3.642 0	11.654 0	0.262 3	7.226 3	22.803 0	0.494 7	100.18	100.22	97.07						

注:A为没食子酸,B为芍药苷,C为蒙本内酯。

供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:取已知含量的六味补血胶囊(批号为20151206)内容物6份,精密称定,各约0.5 g,分别加入没食子酸对照品贮备液1.0 mL、芍药苷对照品贮备液3.0 mL、蒙本内酯对照品贮备液0.5 mL。依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,计算含量及回收率,结果见表3。

2.4 样品含量测定

分别精密称取六味补血胶囊(批号分别为20151204, 20151205, 20151206)内容物1 g,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,记录峰面积,分别计算含量。结果见表4。

表4 3批样品含量测定结果(mg/g)

批号	没食子酸	芍药苷	蒙本内酯
20151204	7.085 3	20.715 5	0.435 6
20151205	7.210 4	21.942 7	0.449 3
20151206	7.245 3	22.525 6	0.486 1

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

曾考察以相同体积的50%甲醇、70%甲醇、甲醇、50%乙醇、70%乙醇、乙醇进行超声提取,按拟订色谱条件进行测定,比较没食子酸、芍药苷、蒙本内酯的含量。结果表明,甲醇作为提取溶剂时,没食子酸、芍药苷、蒙本内酯的含量最高,稳定性最好,峰形对称,分离度好,故选用甲醇作为提取溶剂。

3.2 检测波长选择

分别取没食子酸、芍药苷、蒙本内酯对照品贮备液,于200~800 nm波长范围内进行扫描。结果表明,没食子酸约在280 nm波长处,芍药苷约在230 nm波长处,蒙本内酯约在334 nm波长处有最大吸收。综合样品中3个成分的出峰时间,设定为280 nm(0→20 min)、230 nm(20→30 min)、334 nm(30→44 min),并采用波长切换的方式,实现各个成分在最大吸收波长处同时检测。

3.3 流动相选择

曾以乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-

0.05%三氟乙酸溶液为流动相,考察分离效果。结果表明,乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱时,样品中的各个成分分离效果最好。

参考文献:

- [1] 鲁艺,肖丽和,杜晓娟,等. 六味补血胶囊的16组拆方对环磷酸胺所致血虚小鼠造血功能的影响[J]. 中国当代医药, 2016,23(18): 12-14.
- [2] 汪程远,杜俊蓉,钱忠明. 蒙本内酯的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2006,41(12): 889-891.
- [3] 左爱华,王莉,肖红斌. 蒙本内酯药理学和药代动力学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012,37(22): 3350-3353.
- [4] 杨志军,顾宁. 蒙本内酯心血管药理作用研究概况[J]. 吉林中医药, 2016,36(2): 211-213.
- [5] 高雅,李骅,王四旺,等. 没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展[J]. 西北药学杂志, 2014,29(4): 435-438.
- [6] 蔡郁,梁文革,刘新颜. 白芍提取物活性成分芍药苷大鼠在体肠吸收动力学的研究[J]. 中国医药导报, 2011,8(16): 39-42.
- [7] 张利. 白芍的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 2014,6(29): 25-26.
- [8] 王婕,赵建邦,宋平顺. 30批当归中阿魏酸、蒙本内酯含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(16): 70-73.
- [9] 刘毅,刘素香,张铁军,等. HPLC法测定川芎中阿魏酸和蒙本内酯[J]. 药物评价研究, 2010,33(3): 210-212.
- [10] 李红娟,柏伟荣,徐振秋,等. HPLC同时测定靛靛胶囊中没食子酸、葛根素、芍药苷、阿魏酸的含量[J]. 食品与发酵科技, 2015,51(6): 68-72.
- [11] 孙立立,江波,袁振海,等. HPLC测定地榆饮片中没食子酸的含量[J]. 中成药, 2006,28(8): 1144-1147.
- [12] 曾彩芳,肖佳尚. 高效液相色谱法测定地榆根中没食子酸含量[J]. 中国药业, 2007,16(13): 15-16.
- [13] 李英美,张彬,范晓惠. 白香丹胶囊中芍药苷、丹皮酚及 α -香附酮的HPLC含量测定[J]. 中成药, 2009,31(11): 1690-1694.
- [14] 郭亚健,王东生. 三宝丹质量标准研究[J]. 中成药, 1993, 15(10): 9-11.
- [15] 王文渊. 反相高效液相色谱法测定六味补血颗粒中芍药苷含量[J]. 中国药业, 2008,17(15): 34-35.

(收稿日期:2017-11-22;修回日期:2017-12-21)