

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.036

高效液相色谱法同时测定养血当归糖浆中芍药苷和甘草酸铵含量

余中霞,方菲菲[△],张继红,何亚芬

(江西省上饶市食品药品检验检测中心,江西 上饶 334000)

摘要:目的 建立同时测定养血当归糖浆中芍药苷、甘草酸铵含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Kromasil - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A) - 0.085% 磷酸溶液(B)为流动相(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL,检测波长为 230 nm。结果 芍药苷和甘草酸铵质量浓度分别在 5.54 ~ 55.35 μg/mL 和 9.63 ~ 115.56 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9990$);平均加样回收率分别为 88.42% 和 87.08%, RSD 分别为 3.66% 和 3.52% ($n=6$)。结论 该方法简便、准确、专属性强、重复性好,可用于养血当归糖浆制剂的质量控制。

关键词:高效液相色谱法;养血当归糖浆;芍药苷;甘草酸铵;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0120-03

Simultaneous Determination of Paeoniflorin and Ammonium Glycyrrhizinate in Yangxue Danggui Syrup by HPLC

YU Zhongxia, FANG Feifei, ZHANG Jihong, HE Yafen

(Shangrao Food and Drug Inspection and Testing Center, Shangrao, Jiangxi, China 334000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of paeoniflorin and ammonium glycyrrhizinate in Yangxue Danggui Syrup. **Methods** The chromatographic column was Kromasil - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile(A) - 0.085% phosphoric acid solution(B), gradient elution and the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, The sample injection was 10 μL, and the detection wavelength was 230 nm. **Results** There were good linear relationship in the range of 5.54 - 55.35 and 9.63 - 115.56 μg/mL for paeoniflorin and ammonium glycyrrhizinate, respectively. The average recoveries were 88.42% and 87.08%, and the RSDs were 3.66% and 3.52%, respectively ($n=6$). **Conclusion** This method is simple, accurate, specific and reproducible. It provides an effective method for quantitative analysis of paeoniflorin and ammonium glycyrrhizinate in Yangxue Danggui Syrup.

Key words: high-performance liquid chromatography; Yangxue Danggui Syrup; paeoniflorin; ammonium glycyrrhizinate; determination

养血当归糖浆是由当归、白芍、熟地黄、茯苓、甘草、党参、黄芪、川芎 8 味中药组方的成方制剂,收录于《卫

第一作者:余中霞,女,大学本科,主管药师,研究方向为中药药效物质基础,(电子信箱)372771670@qq.com。

[△]通信作者:方菲菲,女,硕士研究生,助理工程师,研究方向为药物质量标准,(电子信箱)769252379@qq.com。

低。除饮片炮制工艺因素外,还可能是一些生产厂家在生产过程中采用射线辐照等方式进行灭菌处理,造成样品中微生物数量、活性大幅降低,导致检出结果较预期偏低。

中药饮片种类繁多、来源多样、用途不同、加工工艺不同,不同地区中药饮片的微生物负载差异也较大,对于中医临床使用和制剂生产使用的中药饮片,应根据饮片性质、不同入药部位、不同炮制方式、不同给药途径等分类制订合适的微生物限度标准。本课题组的下一步工作将考察微生物对以上 6 种中药饮片有效成分的影响,为《中国药典》进一步制订中药饮片微生物限度的补充提供参考。

参考文献:

- [1] 张光华,王似锦,江志杰,等. 北京地区销售的 10 种中药饮片微生物污染程度考察[J]. 中国药房,2018,29(14):1940-1944.
- [2] 甘永琦,农 浚,零文超,等. 广西等地区 9 种中药饮片微生物污染状况分析[J]. 中国药师,2018,21(5):922-927.
- [3] 甘永琦,王 涛,苏 顶,等. 通草饮片的微生物污染状况考察[J]. 华西药学杂志,2018,33(1):52-56.
- [4] 刘婷婷,姬 俊,牛萌萌,等. 中药饮片蒲公英、柴胡和青箱子中微

生物污染情况考察[J]. 中国药事,2018,32(9):1220-1225.

- [5] 范一灵,李琼琼,房 蕊,等. 上海地区 10 种中药饮片微生物污染情况研究[J]. 中草药,2015,46(13):1908-1913.
- [6] 邵力成,潘建文,谢文明,等. 中药饮片菊花、浙贝母的微生物污染状况及其微生物限度标准的研究[J]. 中南药学,2015,13(10):1093-1095.
- [7] 绳金房,杨晓莉,李 辉. 陕西省 12 种中药饮片微生物污染调查及风险评估[J]. 西北药学杂志,2016,31(6):608-612.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:140-151.
- [9] European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia 8.0[M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines,2014:571-572.
- [10] USP. The United States pharmacopoeia 38th edition[M]. Rockville MD: The United States Pharmacopoeial Convention, 2015:1764-1765.
- [11] 日本药局方编辑委员会. 日本药典:16 版[M]. 厚生省:日本厚生省出版社,2011:120-126.

(收稿日期:2019-09-03)

生部药品标准·中药成方制剂(第二册)》(WS₃-B-0358-90),具有补气血、调经功效,临床常用于治疗行经腹痛、月经不调、贫血虚弱、产后体虚、产后血虚、萎黄肌瘦等症。现行质量标准项下尚未收录其含量测定指标和方法。有研究以主药当归和白芍中主要成分阿魏酸和芍药苷为指标成分建立含量测定方法,以及对主要成分当归、川芎、黄芪建立薄层色谱鉴别方法^[1-2]。鉴于中药成方制剂成分的复杂多样性,少数成分难以全面评价和反映药物的内在质量。且复方中甘草具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效,是养血当归糖浆制剂发挥药效的主要臣药,其主要成分为甘草苷和甘草酸^[3-5]。本研究中以白芍中的芍药苷、甘草中的甘草酸铵为指标成分,建立了测定养血当归糖浆中芍药苷和甘草酸铵含量的高效液相色谱(HPLC)法,为进一步提高和完善养血当归糖浆的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 Waters 2998PDA 检测器,Empower3 工作站;BP211D 型电子天平(德国 Sartorius,精度为十万分之一);色谱柱:Kromasil-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,迪马公司);Bcf-20L 型数控超声清洗器(上海比朗仪器制造有限公司,功率为 100 W,频率为 40 kHz);A3s-10-10CE 型超纯水机(美国艾科浦国际有限公司)。

1.2 试剂

甘草酸铵对照品(批号为 110731-201619),芍药苷对照品(批号为 110736-200408),均购自中国食品药品检定研究院,纯度均不低于 98%;养血当归糖浆(批号分别为 170601,170506,江西盛翔制药有限公司;批号 171205,180504,180903,江西药都樟树制药有限公司;批号为 20161202,广西壮族自治区花红药业股份有限公司;批号为 170602,福寿堂制药有限公司);乙醇(分析纯,上海展云化工有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);磷酸(色谱纯,上海展云化工有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.085% 磷酸溶液,洗脱梯度程序见表 1;检测波长:230 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

时间(min)	乙腈	0.085% 磷酸溶液	时间(min)	乙腈	0.085% 磷酸溶液
0→15	20	80	35→36	100	0
15→35	50	50	36→40	20	80

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取芍药苷对照品 10.49 mg、甘草酸铵对照品 18.45 mg,精密称定,置 50 mL 棕色容量瓶中,加 70% 乙醇适量溶解并定容至刻度,混匀,即得。

供试品溶液:精密量取样品 6 mL,置 10 mL 棕色容量瓶中,加入 70% 乙醇适量,密塞,超声提取 20 min(功率为 40 W,频率为 50 Hz),放冷,再用上述溶液补至刻度,摇匀,离心 30 min(转速为 4 000 r/min,功率为 25 W),取上清液,过滤,滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

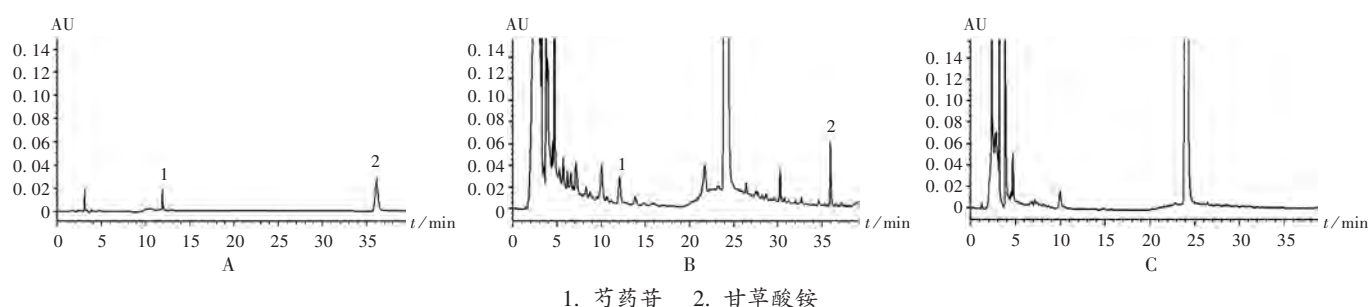
阴性对照品溶液:按该制剂注册标准的处方和制备工艺制备缺白芍和甘草的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取上述 3 种溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,按拟订色谱条件分析,色谱图见图 1。结果被测成分能达到完全分离,阴性对照无干扰。

线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液 1,2,3,4,5 mL,分别置 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,按拟订色谱条件进样测定。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{芍}} = 11\,929X + 19\,597$ ($r = 0.999\,2$) 和 $Y_{\text{甘}} = 3\,654X - 10\,667$ ($r = 0.999\,2$)。结果表明,芍药苷和甘草酸铵质量浓度分别在 5.54~55.35 μg/mL 和 9.63~115.56 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密量取同一混合对照溶液 10 μL,



1. 芍药苷 2. 甘草酸铵
A. 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

重复进样6次,分别测定其峰面积并计算含量。结果芍药苷和甘草酸铵的RSD分别为0.21%和0.16% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同批(批号为170601)样品,依法制备供试品溶液,室温放置,分别于0,2,4,8,12,24 h时进样10 μ L,测定峰面积并计算含量。结果芍药苷和甘草酸铵含量的RSD分别为0.49%和0.56% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取同批(批号为170601)样品,依法制备供试品溶液6份,测定峰面积并计算含量。结果芍药

苷和甘草酸铵含量的RSD分别为0.62%和0.54% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取6 mL同批(批号为170601)样品,分别置10 mL容量瓶中,平行6份,分别精密加入一定质量浓度的对照品溶液,依法制备供试品溶液。按拟订色谱条件进样测定,按外标法计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取不同批次样品,每个批次平行3份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表3。

表2 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.247 1	0.505 2	0.209 8	0.479 7	0.437 9	0.932 1	90.94	88.99				
0.247 1	0.505 2	0.209 8	0.479 7	0.440 1	0.909 4	91.99	84.26				
0.247 1	0.505 2	0.209 8	0.479 7	0.428 4	0.924 3	86.42	87.37	88.42	87.08	3.66	3.52
0.247 1	0.505 2	0.209 8	0.479 7	0.421 6	0.944 6	83.17	91.60				
0.247 1	0.505 2	0.209 8	0.479 7	0.432 2	0.922 7	88.23	87.03				
0.247 1	0.505 2	0.209 8	0.479 7	0.435 4	0.904 4	89.75	83.22				

注:A为芍药苷,B为甘草酸铵。

表3 7批样品含量测定结果(mg/mL, $n=3$)

批号	芍药苷	甘草酸铵	批号	芍药苷	甘草酸铵
170601	41.18	84.20	180903	42.33	86.87
170506	40.54	85.35	20161202	41.49	87.53
171205	43.83	88.16	170602	42.23	88.09
180504	40.97	89.32			

3 讨论

3.1 提取条件选择

采用单因素分析法,比较了不同提取方法(加热回流、冷浸提取、超声提取)、不同提取溶剂(甲醇、乙醇、乙酸乙酯)、不同提取体积分数(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇)、不同提取时间(15,30,45,60 min)的提取效果。结果表明,以70%乙醇溶液超声提取30 min提取最完全,所测含量最高,且操作简单便捷、环保安全。

3.2 流动相选择

有机相比较了甲醇和乙腈,结果在相同色谱条件下,以乙腈为有机相,目标化合物能获得更好分离。水相比较了0.1%磷酸溶液和0.085%磷酸溶液,结果表明,以0.085%磷酸溶液为水相,目标化合物色谱峰出峰时间适宜且分离度和峰形均明显优于0.1%磷酸溶液。

3.3 检测波长选择^[6-7]

比较了316,250,230 nm波长下芍药苷和甘草酸铵的检测情况,结果表明,以316 nm为检测波长时,无

法检测到甘草酸铵;以250 nm为吸收波长时,2种物质未达到最大吸收峰;以230 nm为检测波长时,2种物质均有吸收峰,峰面积值最大,故选择230 nm为检测波长。

3.4 结果分析

通过方法学考察,本试验中所建立的方法稳定准确、简便易行,可为进一步制订和完善养血当归糖浆的质量标准提供依据。不同厂家和不同批次的制剂含量测定结果表明,养血当归糖浆中芍药苷和甘草酸铵的含量稳定,表明制剂工艺稳定,药材来源可靠。

参考文献:

- [1] 王红娟,李彦科,程 雯,等. HPLC法测定气血和胶囊中芍药苷的含量[J]. 中国民族民间医药,2018,37(16):15-19.
- [2] 植达诗,周 颖,牟 晓. HPLC法测定养血当归糖浆中阿魏酸和芍药苷的含量[J]. 中国药事,2008,22(6):493-495.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:87.
- [4] 刘 莉,周世玉,丁 叶,等. 龙胆泻肝胶囊中甘草苷、甘草酸铵的含量测定[J]. 技术创新,2017,38(7):29-30.
- [5] 李桂本,李振国,宋汉敏. HPLC同时测定溃疡散胶囊中甘草苷和甘草酸的含量[J]. 中医研究,2014,27(3):67-70.
- [6] 翁一玲,陈松旺,李 煌. HPLC法测定畅脉乐胶囊中芍药苷的含量[J]. 海峡药学,2018,30(8):59-61.
- [7] 刘淑华. 反相高效液相色谱法测定复方甘草酸铵注射液甘草酸铵含量[J]. 中国药业,2014,23(20):65-66.

(收稿日期:2019-08-20)