

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.19.015

高效液相色谱法测定复方香芍口服液中芍药苷含量*

丁家昱¹, 韩宪忠^{1△}, 番正², 夏荣松¹, 袁文霄¹

(1. 重庆市人民医院·中国科学院大学重庆医院, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)
摘要:目的 建立测定复方香芍口服液中芍药苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05% 磷酸二氢钾溶液(15:85, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 230 nm, 进样量为 10 μL。结果 芍药苷进样量在 0.059~1.180 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好($r = 0.9997$, $n = 5$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%; 平均加样回收率为 98.64%, RSD 为 0.72% ($n = 9$)。结论 该方法简便快速、专属性强、重复性好, 适用于复方香芍口服液中芍药苷的含量测定。

关键词: 复方香芍口服液; 芍药苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)19-0074-03

Content Determination of Paeoniflorin in Compound Xiangshao Oral Liquid by HPLC

DING Jiayu¹, HAN Xianzhong¹, PAN Zheng², XIA Rongsong¹, YUAN Wenxiao¹

(1. Chongqing General Hospital · Chongqing Hospital of University of Chinese Academy of Sciences, Chongqing, China 400014; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of paeoniflorin in Compound Xiangshao Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was Waters SunFire C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.05% potassium dihydrogen phosphate solution (15:85, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 230 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of paeoniflorin was 0.059-1.180 μg ($r = 0.9997$, $n = 5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2%. The average recovery of paeoniflorin was 98.64% with an RSD of 0.72% ($n = 9$). **Conclusion** The method is simple, rapid, specific and repeatable, which is suitable for the content determination of paeoniflorin in Compound Xiangshao Oral Liquid.

Key words: Compound Xiangshao Oral Liquid; paeoniflorin; HPLC; content determination

腹痛、腹胀、消化不良为临床多发病, 西药解痉镇痛常有口干、心悸、呕吐恶心等药品不良反应发生。目前, 痛药物虽有一定止痛效果, 但消除伴随症状作用较差, 市场上治疗腹痛的中成药较常见。重庆市人民医院以

*基金项目: 重庆市卫生和计划生育委员会2017年度中医药科技项目[ZY201702044]。

第一作者: 丁家昱, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院制剂分析、药物新剂型的质量标准, (电话)023-63519115(电子邮箱)dingjiayu0929@163.com。

△通信作者: 韩宪忠, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为临床药学及中药制剂研发, (电子邮箱)hxz5981@163.com。

中国医药科技出版社, 2020: 77-79.

1661: 37-48.

- [2] 王云龙, 房 岐, 郑 超. 丹参化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中国药业, 2020, 29(15): 6-10.
- [3] 杨 帆, 戚莹雪, 张永清. 丹参地上部分化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1558-1564.
- [4] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
- [5] 马丙祥, 董宽凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 663-665.
- [6] ZHOU LM, ZUO Z, CHOW MS. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45(12): 1345-1359.
- [7] XU SX, ZHONG AQ, MA HN, et al. Neuroprotective effect of salvianolic acid B against cerebral ischemic injury in rats via the CD40 / NF-κB pathway associated with suppression of platelets activation and neuroinflammation [J]. Brain Res, 2017, 1661: 37-48.
- [8] 李巧玲, 田 晶. 食用合成色素的安全性评价及对策[J]. 食品工业, 2017, 38(11): 268-271.
- [9] 益 磊, 孟祥松, 周志美, 等. 染色增重中药材及饮片科学监管技术方法探究[J]. 中国药事, 2014, 28(3): 288-291.
- [10] 张 萍, 李宁新, 李明华, 等. 2019年全国中药材及饮片质量分析报告[J]. 中国现代中药, 2020, 22(5): 663-671.
- [11] 连云岚, 杜 娟, 乔玉峰. HPLC-MS法检测少腹逐瘀丸及原料药材中非法添加的7种黄色素[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3219-3223.
- [12] 宋德芳, 李 恒. 药材和饮片非法染色物检测技术研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(3): 96-99.
- [13] 栗有志, 刘 俊, 李艳美, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定枸杞中9种红色合成色素[J]. 分析科学学报, 2016, 32(6): 846-850.

(收稿日期: 2022-03-01; 修回日期: 2022-06-19)

木香、白芍、厚朴、吴茱萸、甘草5味药材经提取、纯化工工艺,最终制得复方香芍口服液。初步药效学与毒理学试验结果表明,该制剂具有缓解腹痛、胀满、消化不良、呕恶厌食的功效,且起效快、疗效好、副作用小,市场前景良好。方中白芍具有解痉、肌松、抗菌、保护消化道、治疗溃疡等作用^[1],其主要有效成分为芍药苷。本研究中建立了测定复方香芍口服液中白芍活性成分芍药苷含量的高效液相色谱法,以更好地控制产品质量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

CPA225D型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司,精度为十万分之一);Waters 2487型高效液相色谱仪(美国沃特世公司);Simplicity-185型超纯水机(美国Millipore公司);SC-04型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 试药

芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111730-201307,含量为97.4%);复方香芍口服液(医院制剂,编号分别为S1,S2,S3,规格为每瓶10 mL);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

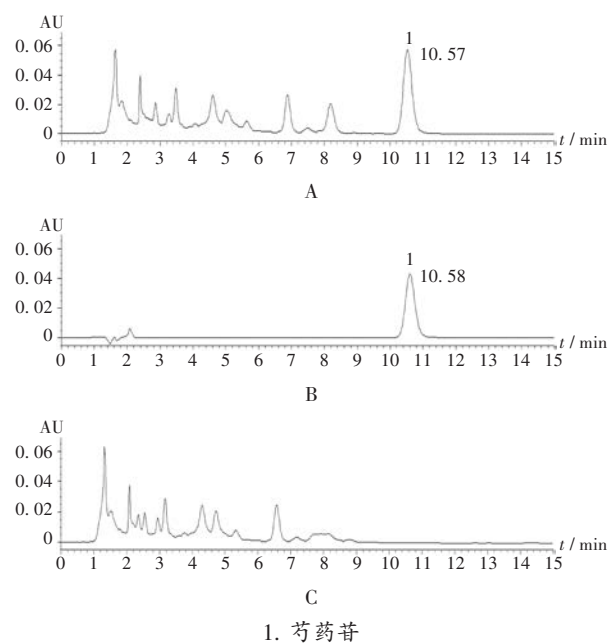
色谱柱:Waters SunFire C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸二氢钾溶液(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。精密量取供试品溶液10 μL,按此色谱条件进样测定,色谱图见图1A。结果显示,芍药苷峰与其他杂质峰均能达到基线分离,分离度大于1.5,理论板数以芍药苷峰计大于3 000。

2.2 溶液制备

精密量取样品1 mL,90 ℃水浴蒸至约0.5 mL,用10 mL甲醇溶液洗涤残余物,洗涤液转入10 mL离心管,离心(转速为3 000 r/min)20 min,取上清液,置50 mL容量瓶中,10 mL甲醇洗涤沉淀,同法离心,合并上清液,加甲醇稀释并定容,摇匀。精密量取1 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀;用0.22 μm有机微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取芍药苷对照品12.00 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,作为对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液1 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,即得对照品溶液。按相同处方比例和制备工艺,制备仅缺乏白芍的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密量取2.2项下对照品溶液和阴性



A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Paeoniflorin

A. Test solution B. Reference solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

对照品溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,色谱图见图1B和图1C。可见,芍药苷保留时间为10.58 min,阴性对照品溶液色谱图中相应位置无此峰,表明杂质及阴性对照对测定均无干扰,该方法专属性良好。

线性关系考察:精密吸取2.2项下对照品溶液1,5,10,15,20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(X, μg)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 12\,543X + 89\,144$, $r = 0.9997$ ($n = 5$)。结果表明,芍药苷进样量在0.059 ~ 1.180 μg范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下对照品溶液10 μL,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果芍药苷峰面积的RSD为1.20% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取样品(编号为S1)适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别于0,2,4,8,12 h时进样测定,记录峰面积,结果芍药苷峰面积的RSD为0.83% ($n = 5$),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。精密量取2.2项下对照品溶液10 μL,按2.1项下色谱条件分别于0,1,2,3 d时进样测定,记录峰面积,结果芍药苷峰面积的RSD为1.01% ($n = 4$),表明对照品溶液在室温下3 d内稳定。

重复性试验:取同一批(编号为S1)样品适量,混匀,依法制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芍药苷的平均含量为363.80 mg/mL, RSD

为0.74%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取芍药苷对照品0.75 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为对照品浓溶液(质量浓度为15.37 mg/mL)。精密量取已知含量的样品(编号为S1,质量浓度为363.80 mg/mL)1 mL,共9份,分别加入对照品浓溶液8,10,12 mL,平行3份,依法制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
363.80	122.96	485.15	98.69		
363.80	122.96	485.42	98.91		
363.80	122.96	485.84	99.25		
363.80	153.70	516.89	99.60		
363.80	153.70	514.61	98.12	98.64	0.72
363.80	153.70	514.40	97.98		
363.80	184.44	546.47	99.04		
363.80	184.44	546.17	98.88		
363.80	184.44	543.30	97.32		

2.4 样品含量测定

取3批(编号分别为S1,S2,S3)样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量。结果3批(编号分别为S1,S2,S3)样品中芍药苷含量分别为363.80,368.75,370.55 mg/mL,RSD分别为0.73%,1.21%,0.96%。

3 讨论

参考文献[2]及2020年版《中国药典(一部)》白芍^[3]项下项目,测定芍药苷含量时流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86,V/V),检测波长为230 nm。预试验中,复方香芍口服液中存在杂质峰,未能与芍药苷峰得到有效分离,严重干扰后者的测定。参考文献[4-16],分别以乙腈-0.1%磷酸溶液^[4,6-8,14]、乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(7:13:80,V/V/V)^[9]、乙腈-0.05%磷酸二氢钾溶液^[10,15]、乙腈-0.4%磷酸溶液(20:80,V/V)^[11]等为流动相系统,考察芍药苷与其他组分的分离效果。综合考虑,最终确定2.1项下色谱条件,在此条件下芍药苷与其他组分分离良好。

木香、白芍、厚朴、吴茱萸、甘草组方中含有大量的多糖类物质,溶液呈胶体状,不能直接进行高效液相色谱分析,其他组分干扰严重。在样品前处理过程中,分别考察采用50%甲醇和甲醇作为溶剂,沉淀杂质并稀释样品,取上清液,滤过,分别进样测定,色谱峰分离均较好,但甲醇作为溶剂的杂质峰更少。故采用甲醇沉淀及分离多糖类物质。

曾考察3个厂家的同类型色谱柱,结果样品中芍药苷色谱峰峰形良好,与杂质均达到基线分离,含量测定结果基本一致,表明方法对色谱柱的耐用性良好。

综上所述,本研究中建立的方法简便快速、专属性强、重复性好,适用于复方香芍口服液中白芍的主要活性成分芍药苷的含量测定。

参考文献

- [1] 谢 鸣. 中医方剂现代研究(上卷)[M]. 北京:学苑出版社,1997:219.
- [2] 张 艳,申丽莎,杨 帆,等. 赤芍药材中芍药苷含量测定方法的改进[J]. 中国药业,2017,26(24):28-30.
- [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,2020:154.
- [4] 姚 玥,陈元圆,黄艳红. HPLC法测定院内制剂参芪益母膏中芍药苷、芍药内酯苷的含量[J]. 海峡药学,2021,33(7):56-58.
- [5] GU YL, PIAO XL, ZHU D. Simultaneous determination of calycosin, prim-O-glucosyleimifugin, and paeoniflorin in rat plasma by HPLC-MS/MS: application in the pharmacokinetic analysis of HQCF [J]. J Int Med Res, 2020, 48 (11): 300060520972902.
- [6] WU J, LIU HY, YU B, et al. Simultaneous Determination of Six Constituents in Cangbaikutong Capsule by HPLC Wavelength Switching Technique[J]. Medicinal Plant, 2019, 10(4):20-23.
- [7] 付士朋,沈宏伟,王谦博,等. 不同采收期赤芍中6种有效成分的含量测定及其变化规律研究[J]. 中国药房,2020,31(4):441-446.
- [8] 段立广,王东晗,安绯悦,等. 参苓护肝胶囊定性鉴别和芍药苷含量测定方法的研究[J]. 科学技术创新,2020(35):19-21.
- [9] 胡 婧,胡 斌,邓 莉,等. 胃炎颗粒中3种活性成分的定性鉴别及芍药苷含量测定[J]. 中国药业,2019,28(1):31-34.
- [10] 许天阳,董坤园,宋凤媛,等. Box-Behnken响应面法优化炒赤芍炮制工艺[J]. 中国药房,2019,30(20):2845-2850.
- [11] 杜安全,周正华. 精芪参固本胶囊薄层鉴别及芍药苷含量测定[J]. 化学分析计量,2019,28(4):83-86.
- [12] 饶俊珍,程 璐,熊 鑫,等. 根痛合剂中葛根素和芍药苷的含量测定[J]. 今日药学,2017,35(1):17-19.
- [13] 田 溪,梁振江,郭安然,等. 前列安颗粒中芍药苷和连翘苷在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药房,2016,27(10):1363-1366.
- [14] 聂晓洁,尹云泽,赵 欣,等. 清心牛黄片中芍药苷含量测定方法的探索[J]. 天津药学,2016,28(4):15-17.
- [15] 张 林. 复方黄连素片中芍药苷的含量测定方法研究[J]. 黑龙江医药,2016,29(4):599.
- [16] QU XL, CAO PX, MA SB. Assay of Peoniflorin in Gangbangui Capsule[J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 15(7): 1145-1146.

(收稿日期:2022-02-07;修回日期:2022-05-11)