

HPLC同时测定郁舒片中5种成分的含量

夏忠庭^{1,2}, 鲍丽颖³, 惠婷婷², 邓雁如^{1*}, 周水平²

- (1. 天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193;
2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药研究所, 天津 300410;
3. 天津中医药大学 中西医结合学院, 天津 300193)

[摘要] 目的:建立同时测定郁舒片中芍药苷、芍药内酯苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷含量的 HPLC 方法。方法:采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以 0.1% 磷酸水-乙腈为流动相梯度洗脱,检测波长 203 nm,柱温 25 °C,进样体积 8 μL,流速 0.8 mL·min⁻¹。结果:芍药苷、芍药内酯苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷分别在 1.005 8~0.100 6 ($r=0.999\ 8$), 0.360 5~0.036 0 ($r=0.999\ 9$), 0.150 7~0.015 1 ($r=0.999\ 8$), 0.091 9~0.009 2 ($r=0.999\ 8$), 0.063 7~0.006 4 μg ($r=1.000$) 与峰面积均具有良好的线性关系。平均加样回收率分别为 99.81% (RSD 2.0%), 100.51% (RSD 2.0%), 99.09% (RSD 1.7%), 99.23% (RSD 1.8%), 99.65% (RSD 2.0%)。结论:该方法简单易行、准确度高,可以作为郁舒片的质量控制方法。

[关键词] 郁舒片; 高效液相色谱; 芍药苷; 芍药内酯苷; 金丝桃苷; 芦丁; 异槲皮苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0047-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030047

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141211.1528.014.html>

[网络出版时间] 2014-12-11 15:28

Simultaneous Determination of Five Components in Yushu Tablets by HPLC XIA Zhong-ting^{1,2}, BAO Li-ying³, HUI Ting-ting², DENG Yan-ru^{1*}, ZHOU Shui-ping² (1. *Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Analysis, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China*; 2. *Division of Modernized TCM, Tasly Holded Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China*; 3. *School of Integrative Medicine, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China*)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of five components (paeoniflorin, albiflorin, hyperin, rutin, isoquercitrin) in Yushu tablets. **Method:** An Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was 0.1% phosphoric acid aqueous solution (A) - acetonitrile (B) with gradient elution. Analysis were performed at 25 °C with a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 203 nm. **Result:** The method had a good linearity in the ranges of 0.360 5-0.036 0 μg ($r=0.999\ 9$) for albiflorin, 1.005 8-0.100 6 μg ($r=0.999\ 8$) for paeoniflorin, 0.150 7-0.015 1 μg ($r=0.999\ 8$) for rutin, 0.091 9-0.009 2 μg ($r=0.999\ 8$) for hyperin, 0.063 7-0.006 4 μg ($r=1.000\ 0$) for isoquercitrin. The average recoveries of five components were 100.51% (RSD 2.0%), 99.81% (RSD 2.0%), 99.09% (RSD 1.7%), 99.23% (RSD 1.8%), and 99.65% (RSD 2.0%), respectively. **Conclusion:** The method is dependable, simple and practical, and may be used to control the quality of Yushu tablets.

[Key words] Yushu tablets; HPLC; albiflorin; paeoniflorin; hyperin; rutin; isoquercitrin

[收稿日期] 20140604(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402202)

[第一作者] 夏忠庭, 博士, 高级工程师, 从事中药、天然药物化学成分及新药开发研究, Tel: 022-86342617, E-mail: hexinshang-1@hotmail.com

[通讯作者] * 邓雁如, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药、天然药物化学成分及新药开发研究, Tel: 022-23052125, E-mail: dyanru@yahoo.com

郁舒片是由白芍、刺五加、蒺藜、贯叶金丝桃、远志等8味中药制备而成,具有补益肝肾、解郁安神的功效,主要用于抑郁症患者。方中白芍具有养血调经、柔肝止痛、敛阴收汗、平抑肝阳的功效;贯叶金丝桃具有疏肝解郁、清热利湿、消肿通乳的功效^[1]。白芍主要成分是以芍药苷与芍药内酯苷为主的萜类成分;贯叶金丝桃含有多种活性成分,主要包括以金丝桃素为代表的苯并二萜酮化合物,以贯叶金丝桃素和加贯叶金丝桃素为代表的间苯三酚化合物和以金丝桃苷、芦丁和异槲皮苷为代表的黄酮类化合物。现代药理研究表明,白芍、贯叶金丝桃的主要成分芍药内酯苷与芍药苷以及以金丝桃苷、芦丁和异槲皮苷为代表的黄酮类成分,都具有明显的抗抑郁作用^[2-5]。因此,控制制剂中芍药苷、芍药内酯苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷的含量,对保证产品质量,具有重要意义。本研究同时测定这5种成分含量,为郁舒片质量控制提供可靠的方法和依据。

1 材料

1.1 仪器 1200系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司), Milli-Q型超纯水系统(美国Millipore公司), XS-205DU型1/10万分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂 乙腈、甲醇(色谱纯,美国Merck公司),乙醇(分析纯,天津市康科德科技有限公司),磷酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),水为自制超纯水。

异槲皮苷(批号111809-201001)、芦丁(批号100080-200306)、金丝桃苷(批号111521-201205)、芍药苷(批号110736-201136,纯度96.0%)对照品购自中国食品药品检定研究院,芍药内酯苷对照品(纯度98.5%)购自天津一方科技有限公司。郁舒片由天士力制药集团股份有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相0.1%磷酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~20 min, 12%~16% B; 20~35 min, 16% B),流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长203 nm,柱温25℃,进样量8 μL。

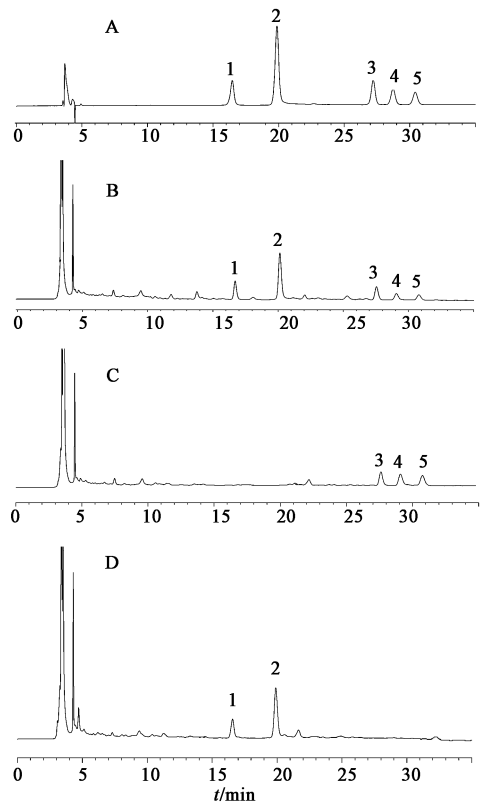
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芍药苷、芍药内酯苷、金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷对照品各适量,用甲醇制成每毫升含金丝桃苷、芍药苷、芦丁、芍药内酯苷、异槲皮苷0.114 9, 1.257 2, 0.188 4, 0.450 6, 0.079 7 mg的混合对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 取郁舒片20片,精密称定,粉碎,过50目筛,精密称定35 mg,于具塞锥形瓶中,精密加50%乙醇10 mL,称定质量,超声处理20 min,放冷,再称定质量,用50%乙醇补足失重,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性供试品溶液 按处方比例及制备工艺分别制备不含白芍的阴性样品和不含贯叶金丝桃的阴性样品,再按照2.2.2项下方法操作,同法制成阴性供试品溶液。

2.3 系统适应性试验 按照2.1项下的色谱条件,对混合对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液进行测定。结果,供试品色谱图中金丝桃苷、芦丁、芍药苷、芍药内酯苷、异槲皮苷的保留时间与对照品相应的保留时间一致,各色谱峰与相邻色谱峰的分度度都>1.5,并且阴性无干扰。见图1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 缺少白芍阴性样品; D. 缺少贯叶金丝桃阴性样品; 1. 芍药内酯苷; 2. 芍药苷; 3. 芦丁; 4. 金丝桃苷; 5. 异槲皮苷

图1 郁舒片HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Yushu tablet

2.4 线性关系 精密吸取混合对照品溶液0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度的混合对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标,各成分进样质量为横坐标,绘制标准曲线,

计算回归方程。结果表明,5 种成分峰面积值与进

样量具有良好的线性关系。见表 1。

表 1 郁舒片中 5 种成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of five componts in Yushu tabelt

成分	回归方程	相关系数	线性范围/ μg
芍药内酯苷	$Y = 1\,964.2X + 3.079\,5$	0.999 9	0.360 5 ~ 0.036 0
芍药苷	$Y = 2\,267.3X + 17.680\,0$	0.999 8	1.005 8 ~ 0.100 6
芦丁	$Y = 6\,512.3X + 7.598\,1$	0.999 8	0.150 7 ~ 0.015 1
金丝桃苷	$Y = 6\,635.9X + 6.129\,0$	0.999 8	0.091 9 ~ 0.009 2
异槲皮苷	$Y = 6\,753.1X + 3.734\,4$	1.000 0	0.063 7 ~ 0.006 4

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,测得芍药内酯苷、芍药苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.4%, 0.9%, 1.0%, 1.1%, 1.1%。结果表明,仪器精密度良好。

2.6 检测限和定量限 精密吸取不同体积的混合对照品溶液,按 2.1 项下的色谱条件进行检测,测得芍药内酯苷、芍药苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的最低检出限 (LOD) 分别为 0.65, 0.59, 0.20, 0.23, 0.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 最低定量限 (LOQ) 分别为 2.15, 1.98, 0.68, 0.75, 0.80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液分别在制备后 0, 2, 4, 6, 12, 24 h, 按 2.1 项下的色谱条件进行检测,测得芍药内酯苷、芍药苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.7%, 0.7%, 0.9%, 0.5%。结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一份样品 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定。结果,芍药内酯苷、芍药苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 2.9%, 2.6%, 2.6%, 2.5%。

2.8 加样回收率试验 取郁舒片,粉碎,过 50 目筛,取 6 份,各 17 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入一定量的芍药内酯苷、芍药苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷混合对照品溶液,按供试品的制备方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,进行测定,计算回收率。结果见表 2。

2.9 样品测定 取不同生产批号的 3 批样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件,分别进样,测定峰面积,并计算各成分的含量,结果见表 3。

3 讨论

3.1 样品制备方法考察 考察了水、甲醇和 50% 甲醇,50% 乙醇等提取溶剂,结果表明,水提取,金丝桃

表 2 郁舒片中 5 种成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery of five componts in Yushu tabelt ($n = 6$)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回 收率/%	RSD /%
芍药内酯苷	0.077 4	0.110 4	0.188 4	100.51	2.0
芍药苷	0.191 8	0.308 0	0.499 3	99.81	2.0
芦丁	0.021 3	0.046 2	0.067 1	99.09	1.7
金丝桃苷	0.020 6	0.028 1	0.048 5	99.23	1.8
异槲皮苷	0.018 0	0.019 5	0.037 5	99.65	2.0

表 3 郁舒片样品中 5 种成分含量测定

Table 3 Yushu tabelt determination

样品批号	芍药 内酯苷	芍药苷	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷
201403001	3.61	9.03	0.86	0.78	0.78
201403002	4.00	9.99	0.82	0.76	0.77
201403003	4.04	10.05	0.83	0.78	0.77

苷等黄酮类成分含量低,50% 乙醇、50% 甲醇和甲醇提取时,各成分含量无显著性差异,因此,选择价廉低毒的 50% 乙醇为提取溶剂。对超声提取时间(10, 20, 30, 40 min)进行了研究,结果表明,超声提取 20 min 时,各成分色谱峰峰面积都已达最大,因此,超声提取时间确定为 20 min。

3.2 色谱条件考察 芍药内酯苷和芍药苷为萜苷类,芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷为黄酮类化合物,这两类化合物的最大紫外吸收波长不同,本实验考察了 360, 254, 230, 203 nm 波长下的色谱行为,发现这 5 种成分在 203 nm 下都有很好的吸收,并且基本没有杂质成分干扰,因此,选择 203 nm 作为这 5 种成分的检测波长。化合物在色谱柱上的保留行为与化合物的结构有关,黄酮类化合物和萜苷类化合物结构差异较大。在等度条件下,芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的保留

时间要远远长于芍药内酯苷和芍药苷,故等度洗脱不适合同时测定这5种成分。参考相关文献[7-8],并经多次试验研究,筛选了适宜的流动相,建立了梯度洗脱方法,不仅大大缩短了分析时间,并可同时定量这5种成分。

本研究建立了同时定量郁舒片中5种成分的方法,方法灵敏度高,简单可行,对郁舒片的质控提供了方法和依据,但郁舒片中含有多种活性成分,如萜苷类、黄酮类、低聚糖类以及皂苷类化合物等,还要加大基础研究,建立每类活性成分的定量方法,以全面控制郁舒片的质量。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:96-97,215.
[2] 王春影,于晓鸿. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究[J]. 黑龙江科技信息,2013(5):20-21.

[3] 崔广智,金树梅. 芍药苷对强迫游泳小鼠脑内单胺递质的影响[J]. 天津中医药大学学报,2012,83(2):83-84.
[4] 林萍,易宏伟,张斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(10):23-26.
[5] 石永平,汪海. 高度富集黄酮类成分的贯叶连翘提取物抗抑郁作用[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(1):4-7.
[6] 于宁,何承辉,邢建国. HPLC测定复方贯叶金丝桃滴丸中金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):104-106.
[7] Wu Ying, Zhou S D, Li P. Determination of flavonoids in *Hyoericum perforatum* by HPLC analysis [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(4):280-282.
[8] 张振凌,冯晟楠,贾利利. HPLC同时测定黄连阿胶汤合煎液中芍药苷黄芩苷小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(5):75-77.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国医药导报》杂志
欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、美国化学文摘(CA)收录期刊、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库收录期刊,所刊登的文章被万方数据、中国知网、中文科技期刊数据库全文收录。每期定价20元,全年36期优惠价540元。

本刊设专家论坛、综述、论著、实验研究、药理与毒理、临床研究、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、病例报告、医疗器械、中医中药、生物医药、药品检验、制剂与技术、药师与临床、不良反应监测、药物经济学、调查研究、护理研究、教育研究、科研管理、法规与标准、卫生研究、医疗管理、产业与市场、医药监管、工作探讨等栏目。是广大医药卫生科研、教育、医护、药事、经营管理等人员了解医药研究进展、发展动态,展示医药科研成果,学习先进经验,探讨工作难题,交流和提高业务学术水平的得力助手,也是发表医药学术论文的阵地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025
投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533
传真:010-59679056 投稿信箱:yydb@vip.163.com
网址:www.yiyaodaobao.com.cn