

HPLC 同时测定益经颗粒中芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷和斯皮诺素的含量

臧文怡, 毛春芹, 苏晓楠, 周亚萍, 汪丽君, 谢辉*
(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定益经颗粒中芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素含量的方法,为该制剂的质量控制提供参考。方法:采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 乙酸(16:84),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长(0~12 min,230 nm;13~30 min,330 nm),柱温 30 ℃。结果:芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素的线性范围分别为 0.360 2~1.801 2,0.170 6~0.852 9,0.055 98~0.279 9,0.055 44~0.277 2 μg,平均加样回收率分别为 101.14%,98.97%,98.81%,97.92%,RSD 分别为 2.0%,1.9%,2.7%,1.8%。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定益经颗粒中芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素的含量,可提高该制剂的质量。

[关键词] 益经颗粒;芍药苷;阿魏酸;毛蕊花糖苷;斯皮诺素

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050060

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160120.1450.008.html>

[网络出版时间] 2016-01-20 14:50

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Ferulic Acid, Verbascoside and Spinosin in Yijing Granules by HPLC

ZANG Wen-yi, MAO Chun-qin, SU Xiao-nan, ZHOU Ya-ping, WANG Li-jun, XIE Hui*
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of four constituents (paeoniflorin, ferulic acid, verbascoside and spinosin) in Yijing granules. **Method:** Column was Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase was 0.1% acetic acid-acetonitrile (84:16), flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelengths were set at 230 nm for paeoniflorin and 330 nm for ferulic acid, verbascoside and spinosin. **Result:** Linear ranges of paeoniflorin, ferulic acid, verbascoside and spinosin were 0.360 2-1.801 2, 0.170 6-0.852 9, 0.055 98-0.279 9, 0.055 44-0.277 2 μg, respectively. Average recoveries were 101.14%, 98.97%, 98.81% and 97.92% with RSD of 2.0%, 1.9%, 2.7% and 1.8%, respectively. **Conclusion:** This developed HPLC method is convenient and reliable, which could be applied to determine contents of four constituents in Yijing granules.

[Key words] Yijing granules; paeoniflorin; ferulic acid; verbascoside; spinosin

益经颗粒系根据临床有效经验方研制而成的中药新制剂,处方由白芍、当归、熟地黄、酸枣仁等共 7

味药材组成,具有滋阴养血、疏肝解郁的作用,临床主要用于妇女月经不调、痛经、体弱血亏的治疗。方

[收稿日期] 20150628(006)

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程项目

[第一作者] 臧文怡,在读硕士,从事中药制剂研究,Tel:15996256627,E-mail:1090431296@qq.com

[通讯作者] *谢辉,副教授,硕士生导师,从事中药制剂研究,Tel:025-85811517,E-mail:njxh66@163.com

中熟地黄为君药,当归为臣药,白芍、酸枣仁为使药。研究表明熟地黄对红细胞新生有明显的促进作用,对血虚所致的机体功能低下有改善作用;其补血的有效部位为毛蕊花糖苷,该成分对造血干细胞具有促进增值、分化作用,可显著改善造血功能^[1-2]。当归对血液系统的药理作用明显,主要有补血、抑制血小板聚集和抗血栓、抗动脉粥样硬化、抗凝血、改善血液流变性、抗氧化及保护血管内皮细胞等作用^[3-4]。芍药苷为白芍的主要有效成分,具有扩张血管、降低血压、降低红细胞聚集性从而改善血液流变性的作用^[5-6]。酸枣仁具有镇静催眠、镇痛、抗血小板聚集等作用^[7-8]。目前复方制剂的质量控制多采用单一指标成分,为了更好地控制益经颗粒的质量,本实验采用 HPLC 同时测定方中主要药味中的活性成分芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷和斯皮诺素的含量,为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

DGU-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,含 SPD-M20A 型检测器),Milli-Q Integral 型水纯化系统(美国 Millipore 公司),MS105DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-200934,110773-200611,111530-201310,111869-201203),水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 乙酸(16:84),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长(0~12 min, 230 nm; 13~30 min, 330 nm),柱温 30 ℃。在上述条件下,芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素分离度均 > 1.5。

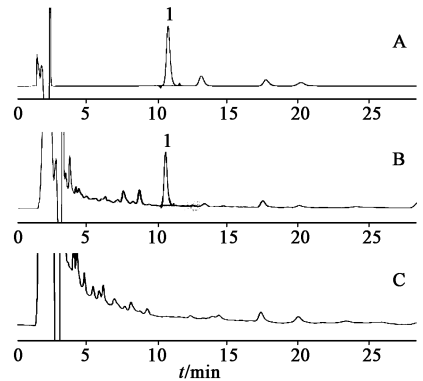
2.2 对照品溶液的制备 取毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加流动相制成 1.04 g·L⁻¹ 对照品贮备液;另分别取芍药苷、阿魏酸、斯皮诺素对照品适量,分别加甲醇制成质量浓度分别为 5.16, 1.71, 0.98 g·L⁻¹ 的对照品贮备液。分别取上述对照品贮备液适量,置 5 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含芍药苷 180.12 μg,阿魏酸 85.29 μg,毛蕊花糖苷 27.99 μg,斯皮诺素 27.72 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取供试品适量,研细,精密称取 5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声 40 min,取出放冷,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 取不含白芍的阴性样

品、不含当归的阴性样品、不含熟地的阴性样品、不含酸枣仁的阴性样品,按 2.3 项下方法制备,分别制得相应的阴性样品溶液。

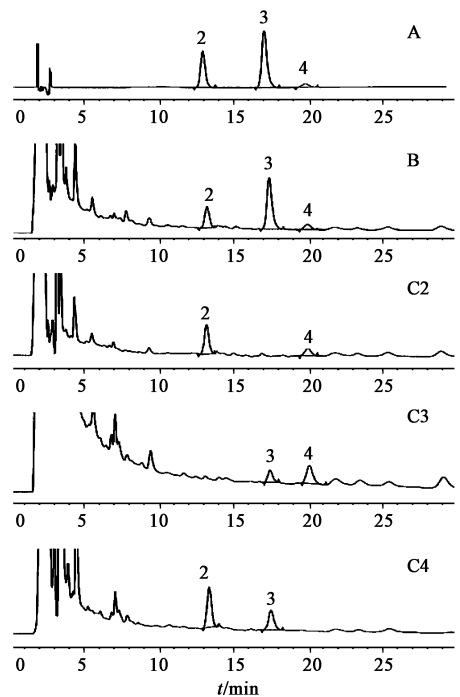
2.5 专属性试验 分别取混合对照溶液、供试品溶液、阴性样品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录色谱图,见图 1,2。结果显示在本色谱条件下,供试品溶液中各被测组分分离良好,且阴性无干扰。



A. 对照品; B. 供试品; C1. 白芍阴性样品; 1. 芍药苷

图 1 益经颗粒在 230 nm 处的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Yijing granules at 230 nm



A. 对照品; B. 供试品; C2. 当归阴性样品; C3. 酸枣仁阴性样品; C4. 熟地黄阴性样品; 2. 斯皮诺素; 3. 阿魏酸; 4. 毛蕊花糖苷

图 2 益经颗粒在 330 nm 处的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Yijing granule at 330 nm

2.6 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL, 按 2.1 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得芍药苷、

阿魏酸、毛蕊花糖苷及斯皮诺素回归方程分别为 $Y = 1.271 \times 10^6 X + 1.498 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 6.218 \times 10^5 X - 3\ 908.29$ ($r = 0.999\ 6$), $Y = 1.416 \times 10^6 X - 6\ 117.00$ ($r = 0.999\ 5$), $Y = 2.353 \times 10^6 X - 2\ 801.30$ ($r = 0.999\ 4$), 线性范围分别为 0.360 2 ~ 1.801 2, 0.170 6 ~ 0.852 9, 0.055 98 ~ 0.279 9, 0.055 44 ~ 0.277 2 μg 。

2.7 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.5%, 1.3%, 1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 1.8%, 1.5%, 2.3%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批益经颗粒(批号 140902),按 2.3 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,结果芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷及斯皮诺素平均质量分数分别为 1.331, 0.676, 0.042, 0.067 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 依次为 1.2%, 1.9%, 2.1%, 2.7%, 表明该方法的重复性良好。

2.10 加样回收试验 分别精密称取 4 种对照品适量,置同一量瓶中,配制成芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷及斯皮诺素质量浓度分别为 3.333, 1.676, 0.105, 0.167 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,备用。取已知含量的益经颗粒(批号 140902)2.5 g,精密称取 9 份,平均分成 3 组,分别加入混合对照品溶液 0.8, 1.0, 1.2 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 益经颗粒中指标成分的加样回收试验

Table 1 Recovery tests of paeoniflorin, ferulic acid, verbascoside and spinosin

成分	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芍药苷	3.320 0	2.666 8	6.041 1	102.04	101.14	2.0
	3.331 1	2.666 8	6.079 8	103.07		
	3.335 8	2.666 8	5.939 2	97.62		
	3.333 5	3.333 5	6.729 7	101.88		
	3.330 6	3.333 5	6.694 9	100.92		
	3.337 7	3.333 5	6.604 7	98.01		
	3.324 6	4.000 2	7.395 6	101.77		
	3.330 0	4.000 2	7.454 6	103.11		
	3.325 0	4.000 2	7.399 2	101.85		
	3.325 0	4.000 2	7.399 2	101.85		
阿魏酸	1.687 0	1.341 0	3.052 8	101.85	98.97	1.9
	1.692 6	1.341 0	3.044 1	100.78		
	1.694 9	1.341 0	3.033 3	99.81		
	1.693 8	1.676 3	3.318 1	96.90		
	1.692 3	1.676 3	3.323 5	97.31		
	1.696 0	1.676 3	3.314 9	96.58		
	1.689 3	2.011 5	3.652 4	97.59		
	1.692 0	2.011 5	3.691 4	99.40		
	1.689 5	2.011 5	3.711 6	100.53		
	1.689 5	2.011 5	3.711 6	100.53		
毛蕊花糖苷	0.105 7	0.084 2	0.188 9	98.81	98.81	2.7
	0.106 0	0.084 2	0.190 6	100.48		
	0.106 2	0.084 2	0.187 2	96.20		
	0.106 1	0.105 3	0.214 1	102.56		
	0.106 0	0.105 3	0.206 7	95.63		
	0.106 3	0.105 3	0.208 9	97.44		
	0.105 8	0.126 3	0.234 8	102.13		
	0.106 0	0.126 3	0.226 9	95.72		
	0.105 8	0.126 3	0.232 5	100.32		
	0.105 8	0.126 3	0.232 5	100.32		
斯皮诺素	0.167 1	0.133 3	0.298 5	98.57	97.92	1.8
	0.167 6	0.133 3	0.301 6	100.53		
	0.167 9	0.133 3	0.299 8	98.95		
	0.167 8	0.166 6	0.334 2	99.88		
	0.167 6	0.166 6	0.326 9	95.62		

续表 1

成分	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
	0.168 0	0.166 6	0.329 3	96.82		
	0.167 3	0.200 0	0.358 6	95.65		
	0.167 6	0.200 0	0.363 1	97.75		
	0.167 3	0.200 0	0.362 4	97.55		

2.11 样品测定 精密称取 3 批益经颗粒各 5 g,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条

件测定,计算样品中 4 个指标成分的含量,结果见表 2。

表 2 益经颗粒中各指标成分的含量

Table 2 Determination of paeoniflorin, ferulic acid, verbascoside and spinosin in Yijing granules

批号	芍药苷		阿魏酸		毛蕊花糖苷		斯皮诺素	
	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%
140901	1.317 3	1.0	0.620 9	1.1	0.039 51	2.0	0.068 42	1.9
140902	1.331 0	1.2	0.676 3	1.9	0.042 37	2.1	0.066 98	2.7
140903	1.395 1	1.0	0.635 1	0.8	0.041 48	1.7	0.063 26	2.5

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 根据方中活性成分的极性,预试验分别选择了甲醇和水为提取溶剂,超声提取 40 min,发现水提取时杂质较多,干扰较为严重。比较不同体积分数(60%,80%,100%)甲醇为溶剂的提取效果,结果发现 80% 甲醇对各成分的提取率相对高于其他体积分数甲醇,且各成分能达到有效分离,故最终选择 80% 甲醇作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择 设定单波长测定时,仅能保证 1 种指标成分的峰面积最大,其他 3 种指标成分无法达到最大紫外吸收。芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、斯皮诺素的吸收波长分别为 230,316,334,335 nm,本文设定检测波长分别为 230 nm 和 330 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 通过查阅文献,考察了不同比例乙腈-乙酸、乙腈-磷酸、乙腈-水为流动相的效果^[9-12]。结果显示当选择乙腈-水为流动相时,待测组分峰形较差;采用乙腈-0.1% 磷酸为流动相时,在 330 nm 处对基线干扰较大;采用乙腈-0.1% 乙酸作为流动相时各成分峰形良好,分离度均 > 1.5,故最终确定流动相为乙腈-0.1% 乙酸。中药复方成分复杂,作用广泛,单一指标成分的含量测定不能有效地控制中药复方的质量。本文采用 HPLC 同时测定益经颗粒中芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷和斯皮诺素的含量,样品制备方法简单,分离效果良好,专属性强、精密度高、重复性较好,可为益经颗粒质量标准的制定提供参考。

[参考文献]

[1] 朱妍,徐畅. 熟地黄活性成分药理作用研究进展[J]. 亚太传统药,2011,11(7):173-175.

[2] 李更生,于震,王慧森,等. 地黄化学成分与药理研究进展[J]. 国外医学:中医中药分册,2004,26(2):74-77.

[3] 刘医辉,杨世英,马伟林,等. 当归药理作用的研究进展[J]. 中国当代医药,2014,22(21):192-194.

[4] 李曦,张丽宏,王晓晓,等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材,2013,36(6):1023-1026.

[5] 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):25-27.

[6] 李文艳,黄山君,王瑞. 中药白芍的药理作用和质量控制研究进展[J]. 药学服务与研究,2012,12(2):118-120.

[7] 马进杰,刘萍,马百平. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2011,38(3):206-211.

[8] 陈雯,黄世敬. 酸枣仁化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1726-1728.

[9] 赵启铎,舒乐新,蔡广知. 酸枣仁总黄酮和总皂苷部位制备工艺的稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24):27-29.

[10] 王玲,尹华,章建华,等. 多指标综合评价法优选补肾活血颗粒的醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):22-24.

[11] 林林,刘广楨,尹宁宁. HPLC 法测定金匱肾气丸中马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和丹皮酚[J]. 中成药,2012,11(34):2137-2140.

[12] 唐安玲,郑琰,宋英,等. HPLC 测定疏经防痛胶囊中芍药苷和丹参酮 II_A 含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):41-43.

[责任编辑 刘德文]