

UPLC 同时检测加味逍遥提取物 6 种指标性成分含量

李明月¹, 周立红², 张文生², 章顺楠², 叶正良³, 柳文媛^{1*}

(1. 中国药科大学, 南京 210009; 2. 天士力制药集团股份有限公司, 天津 300410;
3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410)

[摘要] 目的: 建立同时测定加味逍遥提取物中 6 个指标性成分(梔子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸) 含量方法。方法: 采用超高效液相色谱法, 以 UPLCTM HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm。结果: 6 个指标性成分分离度良好, 均在各自线性范围内线性关系良好, $R^2 \geq 0.9994$; 平均加样回收率为 98.29% ~ 101.67%, RSD 均 < 3.8%。结论: 该法准确、简便、分离度良好, 可作为加味逍遥提取物的质量评价方法。

[关键词] 加味逍遥提取物; 超高效液相色谱法; 梔子苷; 芍药内酯苷; 芍药苷; 甘草苷; 苯甲酰芍药苷; 甘草酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0058-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090058

Simultaneous Determination of Six Components in Extract of Modified Xiaoyao by UPLC

LI Ming-yue¹, ZHOU Li-hong², ZHANG Wen-sheng², ZHANG Shun-nan²,
YE Zheng-liang³, LIU Wen-yuan^{1*}

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Tasly Pharmaceutical Group Co. Ltd.,
Tianjin 300410, China; 3. Tasly Pride Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300410, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC method for the simultaneous determination of geniposide, albiflorin, paeoniflorin, liquiritin, benzoylpaeoniflorin, and glycyrrhizic acid in extract of modified Xiaoyao extract. **Method:** UPLC was performed on UPLCTM HSS T₃ column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 230 nm. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹ and column temperature was 30 ℃. **Result:** The six components were well separated and showed good linearity in their respective concentration ranges with $R^2 \geq 0.9994$. The average recovery was 98.29% - 101.67% with RSD less than 3.8%. **Conclusion:** The established method is simple and stable with satisfactory separation degree. It can be used for the quality control of modified Xiaoyao extract.

[Key words] modified Xiaoyao extract; UPLC; geniposide; albiflorin; paeoniflorin; liquiritin; benzoylpaeoniflorin; glycyrrhizic acid

加味逍遥方是我国的传统名方,源自宋代《太平惠民和剂局方》。在后世使用过程中,进行增减药味发展为加味逍遥方,由柴胡、当归、梔子、丹皮、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷和甘草 10 味中药组成,具有疏肝解郁、活血调经的作用。现研究发现该方有更广的药理活性,如抗抑郁、联合治疗防治早期高

血压^[1]、治疗更年期综合征^[2]等,增加了该方的使用。《中国药典》2010 年版中仅规定了芍药苷的含量检测^[3],检测指标较为单一。对于加味逍遥制剂的含量检测主要集中在梔子苷、芍药苷、丹皮酚、甘草酸^[4-6],种类较少,且不是同时检测,对于 10 味药的大复方质量控制不够全面。本实验采用超高效液相

[收稿日期] 20150813(014)

[第一作者] 李明月,在读硕士,从事现代药物分析研究, Tel:022-86342806, E-mail:cindyepu@163.com

[通讯作者] * 柳文媛,教授,从事现代药物分析, Tel:025-83271038, E-mail:liuwenyuan8506@163.com

色谱法,可在同一条件下检测加味道遥提取物中的栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸,为加味道遥方的质量控制提供了一定依据。

1 仪器与试剂

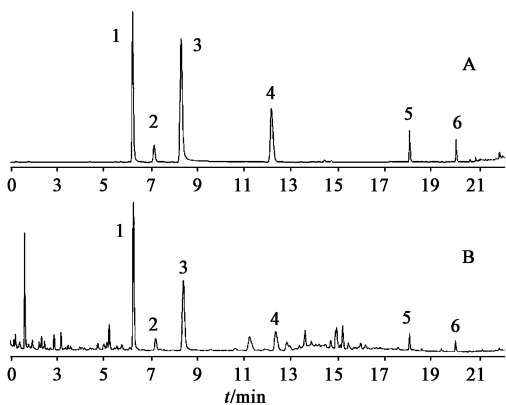
Acquity™ 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, Empower 色谱工作站);XP6 型 1/100 万,ML503 型,XS205 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);AS 系列超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

加味道遥提取物为天士力制药集团股份有限公司国际产业中心中试产品,批号 20141001。

对照品栀子苷(批号 110749-201316),芍药苷(批号 110736-201438)和甘草苷(批号 111610-201106)由中国食品药品检定研究院提供;甘草酸铵(EDQM,批号 G0460000),苯甲酰芍药苷(批号 20140419),芍药内酯苷(天津马克生物公司,供含量检测,批号 20130825)。乙腈,磷酸为色谱纯,水为自制,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用超 UPLC™ HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相 0.05% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)洗脱梯度(0 ~ 5 min, 95% ~ 87% A; 5 ~ 8 min, 87% A; 8 ~ 14 min, 87% ~ 75% A; 14 ~ 18 min, 75% ~ 45% A; 18 ~ 19 min, 45% ~ 0% A; 19 ~ 21 min, 0% A; 21 ~ 22 min, 0% ~ 95% A; 22 ~ 24 min, 95% A),柱温 30 °C,流速 0.4 mL·min⁻¹,检测波长 230 nm,进样量 2 μL,分析时间 24 min。对照品和供试品色谱见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 栀子苷; 2. 芍药内酯苷; 3. 芍药苷; 4. 甘草苷; 5. 苯甲酰芍药苷; 6. 甘草酸

图 1 加味道遥提取物的超高效液相色谱

Fig. 1 UPLC of modified Xiaoyao extract

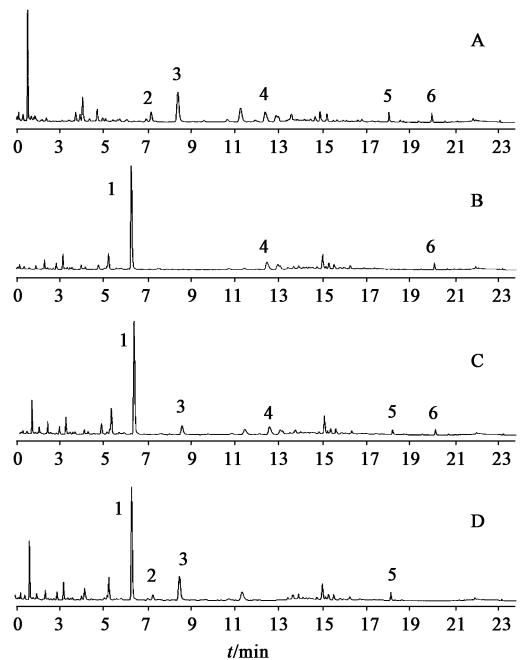
2.2 供试品溶液的制备 取加味道遥提取物,精密称取 0.2 g 于 10 mL 量瓶,用超纯水定容,超声至提取物完全溶解,0.22 μm 的滤膜滤过,作为供试品

溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸铵对照品各适量,用甲醇定容,分别得质量浓度为 0.468 4, 0.383 8, 0.813 8, 0.413 9, 0.569 9, 0.418 6 g·L⁻¹ 对照品母液,分别吸取对照品母液,混合稀释后得系列质量浓度为 93.688, 15.354, 126.928, 34.989, 11.398, 2.032 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液。

2.4 阴性样品溶液制备 按照加味道遥药典方,分别去除栀子、白芍、甘草和同时去除白芍和牡丹皮,按照现已确定的工艺制备以上 4 种缺药材的加味道遥提取物。按照 2.2 项下方法配置阴性样品溶液。

2.5 专属性考察 分别取供试品溶液、对照品溶液及 4 种阴性对照溶液,按 2.1 项下色谱条件进行色谱分析,结果供试品溶液色谱中,与对照品相同保留时间处有吸收峰,而阴性对照溶液在相同保留时间处未显吸收峰,见图 2(栀子苷仅来源于栀子,芍药内酯苷仅来源于芍药,芍药苷、苯甲酰芍药苷来源于牡丹皮和芍药,甘草苷、甘草酸来源于甘草)。



A. 缺栀子阴性样品; B. 缺白芍和丹皮阴性样品; C. 缺白芍阴性样品; D. 缺甘草阴性样品; 1. 栀子苷; 2. 芍药内酯苷; 3. 芍药苷; 4. 甘草苷; 5. 苯甲酰芍药苷; 6. 甘草酸

图 2 阴性样品 HPLC

Fig. 2 HPLC of negative sample

2.6 线性关系的考察 取 2.3 项下对照品母液,分别稀释 1, 2.5, 6.25, 15.625, 39.062 5, 97.656 25 倍,得系列对照品溶液,各进样 2 μL。结果表明上述 6 个成分分别在一定质量浓度与峰面积呈良好

的线性关系。以色谱峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 线性回归方程和相关系数见表 1。

表 1 对照品线性关系和范围

Table 1 Linearities and ranges of seven references

指标物	回归方程	线性范围 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	R^2
栀子苷	$Y = 6\,328.4X - 10\,172$	4.80 ~ 468.44	0.999 7
芍药内酯苷	$Y = 5\,603X + 7\,295.3$	3.93 ~ 383.84	0.999 4
芍药苷	$Y = 6\,569.3X + 16\,850$	8.33 ~ 813.76	0.999 8
甘草苷	$Y = 11\,853X + 15\,307$	4.24 ~ 413.88	1
苯甲酰芍药苷	$Y = 3\,075.3X + 2\,247.9$	5.84 ~ 569.90	1
甘草酸	$Y = 1\,514.1X + 797.28$	4.29 ~ 418.64	1

2.7 精密度试验 按照 2.1 项色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸峰面积的中间精密度 RSD 分别为 0.3%, 0.7%, 0.9%, 1.8%, 1.8%, 0.4%。

2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (批号 20141001), 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h 检测峰

面积, 测得栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.2%, 0.2%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.3%。

2.9 重复性试验 取同一批加味道遥提取物 (批号 20141001) 6 份, 分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸平均质量分数分别为 10.566, 1.507, 8.542, 1.637, 0.804, 2.069 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.4%, 1.8%, 0.5%, 1.3%, 1.4%, 0.7%。

2.10 加样回收率试验 精密称取加味道遥提取物 (批号 20141001) 0.1 g 于 10 mL 量瓶中, 共 6 组, 每组分为高中低 3 个浓度 (130%, 100%, 70%)。低浓度分别准确加入对照品溶液 1 mL, 中浓度分别准确加入对照品溶液 2.5 mL, 高浓度分别加入对照品溶液 4 mL (栀子苷 $433.72\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 芍药内酯苷 $58.34\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 芍药苷 $346.34\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 甘草苷 $108.93\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 苯甲酰芍药苷 $30.77\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 甘草酸 $82.89\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。用超纯水定容, 超声至提取物完全溶解, 0.22 μm 的滤膜滤过, 作为供试品溶液。按 2.1 项色谱条件进样, 结果见表 2。

表 2 加味道遥提取物中 6 种成分加样回收率

Table 2 Recoveries of six constituents in Extract of modified Xiaoyao extract

成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
栀子苷	0.104 8	1 107.82	433.72	1 537.54	99.08	100.39	1.7
	0.094 8	1 002.11	433.72	1 428.00	98.19		
	0.094 5	998.94	433.72	1 425.70	98.39		
	0.101 2	1 069.77	1 084.29	2 149.23	99.55		
	0.099 0	1 046.51	1 084.29	2 134.95	100.38		
	0.099 6	1 052.85	1 084.29	2 158.31	101.95		
	0.102 0	1 078.22	1 734.86	2 830.78	101.02		
	0.098 2	1 038.05	1 734.86	2 816.52	102.51		
	0.097 2	1 027.48	1 734.86	2 803.69	102.38		
芍药内酯苷	0.100 2	145.68	58.34	203.10	98.40	101.01	1.9
	0.097 4	141.61	58.34	199.10	98.54		
	0.098 7	143.50	58.34	204.60	104.71		
	0.101 3	147.28	145.86	294.40	100.86		
	0.098 7	143.50	145.86	293.05	102.53		
	0.096 9	140.89	145.86	288.73	101.36		
	0.096 4	140.16	233.37	375.33	100.77		
	0.100 5	146.12	233.37	381.44	100.83		
	0.101 9	148.16	233.37	384.04	101.07		

续表 2

成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芍药苷	0.097 0	789.92	346.34	1 123.77	96.40	98.29	2.6
	0.099 2	807.84	346.34	1 144.35	97.16		
	0.099 1	807.02	346.34	1 142.68	96.92		
	0.100 0	814.35	865.84	1 651.34	96.67		
	0.098 9	805.40	865.84	1 638.10	96.17		
	0.102 2	832.27	865.84	1 668.89	96.62		
	0.101 5	826.57	1 385.35	2 209.54	99.83		
	0.100 9	821.68	1 385.35	2 236.04	102.09		
	0.099 4	809.47	1 385.35	2 232.40	102.71		
甘草苷	0.101 9	165.57	108.93	268.36	94.36	99.94	3.8
	0.099 0	160.86	108.93	265.39	95.96		
	0.098 9	160.69	108.93	267.21	97.78		
	0.102 4	166.38	272.33	430.94	97.15		
	0.097 8	158.91	272.33	444.18	104.75		
	0.101 7	165.24	272.33	444.16	102.42		
	0.100 4	163.13	435.73	614.91	103.68		
	0.098 9	160.69	435.73	609.54	103.01		
	0.097 0	157.61	435.73	594.91	100.36		
苯甲酰芍药苷	0.101 3	77.92	30.77	109.08	101.27	100.94	2.5
	0.100 4	77.22	30.77	107.77	99.27		
	0.097 2	74.76	30.77	106.29	102.46		
	0.099 8	76.76	76.94	150.51	95.85		
	0.101 9	78.38	76.94	156.21	101.17		
	0.101 7	78.22	76.94	158.70	104.60		
	0.102 9	79.15	123.10	205.42	102.58		
	0.095 3	73.30	123.10	198.67	101.84		
	0.101 3	77.92	123.10	200.26	99.39		
甘草酸	0.099 5	258.44	82.89	340.82	99.39	101.67	2.0
	0.097 9	254.28	82.89	339.43	102.72		
	0.102 1	265.19	82.89	349.52	101.74		
	0.098 0	254.54	207.23	468.68	103.34		
	0.101 3	263.11	207.23	480.44	104.88		
	0.099 6	258.70	207.23	471.17	102.53		
	0.098 8	256.62	331.56	590.32	100.64		
	0.098 4	255.58	331.56	591.69	101.37		
	0.098 6	256.10	331.56	582.34	98.40		

2.11 样品测定 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样 2 μL ,按上述条件测定,见表 3。

3 讨论

加味逍遥丸收载于《中国药典》,为了提高加味

逍遥方的质量标准,在选取指标物时,参考《欧洲药典》、《英国药典》和《中国药典》对于加味逍遥方中药材的收载,对本方中的 10 味药材指标性成分筛选,见表 4。但是在实际检测过程中,柴胡皂苷 a, d

表 3 加味逍遥提取物样品中 6 种成分含量测定 (n=2)

批号	栀子苷	芍药内酯苷	芍药苷	甘草苷	苯甲酰芍药苷	甘草酸
20150507	12.669	1.695	6.835	2.085	0.581	2.514
20150508-1	12.812	1.761	6.922	2.180	0.587	2.659
20150508-2	12.886	1.715	6.947	2.135	0.600	2.610
20150603-1	19.008	1.976	7.406	0.956	0.602	3.837
20150603-2	9.241	0.835	4.941	1.458	0.683	2.091
20150603-3	14.125	0.969	5.111	1.222	0.618	3.174
20150608-1	13.790	0.725	4.490	2.128	0.584	2.568
20150608-2	13.413	0.680	4.370	2.115	0.589	2.606
20150608-3	13.674	0.731	4.431	2.184	0.574	2.630
20150618-1	15.382	1.304	6.509	1.215	0.676	3.876
20150618-2	15.750	1.687	6.987	1.192	0.624	4.101

均检测不到,阿魏酸峰型不佳且不稳定^[5],丹皮酚在提取和浓缩过程中降解和随水蒸气蒸发^[6],均无法进行含量检测。含量检测摸索过程中也检测到微量的白术内酯Ⅲ和 6-姜辣素,但 2 种成分含量均较低,不适合作为指标性成分,主要原因为 2 种药材占全方药材量较小,且全方水提,此 2 种成分水溶性不佳。但芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷和甘草苷含量均较高,峰型较好,所以最终选定了栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸作为指标性成分,以上 6 种成分均有药理活性^[7],选择成为指标性成分有意义。

表 4 加味逍遥方中药材在各国药典中的指标性成分

Table 4 Index components of the prescription of modified Xiaoyao in pharmacopoeia

药材	HPLC 含量检测
柴胡(君药)《中国药典》	柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的总量不得少于 0.30%
当归(臣药)《欧洲药典》	含阿魏酸不得少于 0.05%
白芍(臣药)《英国药典》	含芍药苷不得少于 1.6%
丹皮(臣药)《中国药典》	含丹皮酚不得少于 1.2%
栀子(臣药)《中国药典》	含栀子苷不得少于 1.8%
甘草(使药)《欧洲药典》	含 18β-甘草酸不得少于 4.0%

对提取物进行全波长扫描,6 种指标性物质在 230 nm 处均有吸收,且接近芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷的最大吸收波长,甘草苷最大吸收波长 < 230 nm,甘草酸最大吸收波长 > 230 nm,但在 230 nm 处均有较强吸收。综合考虑 6 种指标性物质的吸收波长,选择 230nm 作为检测波长。

分别选取 0.1% 磷酸,0.05% 磷酸和水作为水

相进行考察,发现水的洗脱能力较差;而 0.05% 磷酸的图谱基线较 0.1% 磷酸平稳,故选择乙腈-0.05% 磷酸为流动相。另对多个洗脱梯度进行考察和优化,最终选定此梯度,时间较短,分离度良好。

本试验运用 UPLC 在加味逍遥提取物中,同时检测栀子苷、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、苯甲酰芍药苷、甘草酸 6 种指标性成分的含量,可以更好的控制加味逍遥提取的质量,为完善该提取物的质量标准提供了依据。

[参考文献]

- [1] 李增明. 邢月朋运用丹栀逍遥散治疗早期高血压 48 例临床观察 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (2): 476-477.
- [2] 运强,付焯. 丹栀逍遥散治疗更年期综合征 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(5): 495-497.
- [3] 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: 992.
- [4] 陈玉杰. 高效毛细管电泳法测定加味逍遥丸中芍药苷、栀子苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (10): 146-149.
- [5] 任淑萌. 阿魏酸的降解作用规律和机理研究及其在药物质量控制中的应用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.
- [6] 张晓东,唐进法,李学林. 不同煎煮时间牡丹皮汤液中丹皮酚和芍药苷含量变化分析 [J]. 中医研究, 2009, 22(6): 18-20.
- [7] 高雪岩,王文全,魏胜利,等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695-2700.

[责任编辑 顾雪竹]