

HPLC 测定清肝疏郁颗粒剂中 4 种成分的含量

姜海, 张妍妍, 孟永海, 杨柳, 杨炳友, 王秋红*, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 黑龙江省中药及天然
药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**建立清肝疏郁颗粒中胡黄连苷 I, II, 芍药内酯苷和芍药苷的 HPLC 定量分析方法。**方法:**超声提取目标物;采用 HPLC-DAD 系统, Diamonsil(2)-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05% 甲酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 264 nm(胡黄连苷 I, II), 230 nm(芍药苷, 芍药内酯苷)。**结果:**胡黄连苷 I, II, 芍药苷, 芍药内酯苷的线性范围分别为 0.067 2 ~ 6.72 μg($r=0.999 6$), 0.017 4 ~ 17.4 μg($r=0.999 8$), 0.01 ~ 10.00 μg($r=0.999 5$), 0.06 ~ 6.00 μg ($r=0.999 1$)。加样回收率分别为 98.55%, 100.95%, 97.90%, 97.90%; RSD 分别为 1.7%, 2.4%, 1.4%, 1.7%。**结论:**该方法准确、灵敏、简便、重复性好, 为清肝疏郁颗粒剂的质量控制提供了科学基础。

[关键词] 清肝疏郁颗粒; 胡黄连苷 I; 胡黄连苷 II; 芍药苷; 芍药内酯苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0063-04

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2016170063

Determination of Four Components in Qinggan Shuyu Granule by HPLC

JIANG Hai, ZHANG Yan-yan, MENG Yong-hai, YANG Liu, YANG Bing-you,
WANG Qiu-hong*, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Northern Medicine base and Application Research Under Ministry of Education,
Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine
Pharmacodynamic Material Base Research, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid HPLC-DAD method for the simultaneous determination of four compounds, namely picroside I, II, paeoniflorin and albiflorin std in Qinggan Shuyu granule. **Method:** The analytes were extracted by ultrasonic. The separation of the compounds was performed on Diamonsil (2) -C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.05% formic acid solution as mobile phase at the wavelength of 264 nm (picroside I, II) and 230 nm (paeoniflorin, albiflorinstd). **Result:** The four analytes demonstrated a good linearity ($r > 0.999 1$) within a relatively wide concentration range (0.067 2-6.72 μg for picroside I, 0.017 4-17.4 μg for picroside II, 0.01-10.00 μg for paeoniflorin and 0.06-6.00 μg for albiflorin std), and the recoveries ranged between 97.90% -100.95%, with RSD of 1.7%, 2.4%, 1.4%, 1.7%, respectively. **Conclusion:** The method was found to be accurate, simple and sensitive for the quantitative analysis on the four compounds in Qinggan Shuyu granule.

[Key words] Qinggan Shuyu granule; picroside I; picroside II; paeoniflorin; albiflorin std

清肝疏郁颗粒剂由胡黄连、柴胡和白芍 3 味中药组成, 其组方及临床应用是我校国医大师段富津

[收稿日期] 20150813(004)

[基金项目] 黑龙江中医药大学校科研项目(2014xy02)

[第一作者] 姜海, 博士, 副教授, 从事中药炮制、中药化学研究, Tel: 13946125679, E-mail: jianghai_777@126.com

[通讯作者] * 匡海学, 博士, 教授, 从事中药药效学物质基础研究, 中药性味理论研究, Tel: 0451-82193001, E-mail: hxkuang56@163.com;

* 王秋红, 博士, 教授, 从事中药炮制研究, Tel: 0451-87266856, E-mail: qhwang668@sina.com

教授在几十年临床治疗慢性肝炎中总结出来的有效配伍,临床证明对慢性乙型肝炎有确切疗效。方中以胡黄连为君,取其味苦性寒,入肝胆胃经,善祛肝胆湿热。柴胡味苦性微寒,入肝胆经,善疏肝解郁,条达肝气。柴胡可协助胡黄连清肝泄热,又可疏肝解郁,防止苦寒碍湿。白芍柔肝助柴胡疏肝解郁,白芍养肝血可防胡黄连苦燥耗伤阴血。现代药理研究证实胡黄连具有良好的护肝作用^[1-4]。杨错等^[5]研究发现柴胡可以预防肝纤维化,何燕等^[6]研究发现柴胡皂苷 D 对肝纤维化过程中脂质过氧化表现出抑制作用,从而发挥保肝作用。戴俐明,郑琳颖与周艳丽等^[7-9]研究者发现白芍总苷在治疗肝损伤、脂肪肝和肝炎方面具有显著效果。清肝疏郁颗粒剂多年来临床应用疗效显著,但关于组方中《中国药典》规定的指标性成分的定量分析未见报道,为实现清肝疏郁颗粒质量的可控性,以达到安全有效的目的,本研究用高效液相色谱法对清肝疏郁颗粒中芍药苷、芍药内酯苷与胡黄连苷 I、II 进行含量测定,来控制清肝疏郁颗粒的质量,并为此方日后开发新药奠定基础。

1 材料

2695 型液相色谱仪(美国 Waters,包括 PDA 检测器,Empower 工作站),NewClassicMF 型分析天平(Mettler Toledo Switzerland),Milli-Q 系列纯水仪(Millipore, USA)。

对照品芍药苷(批号 736-200934)购于中国食品药品检定研究院,胡黄连苷 I、II(批号 27409-30-9,39012-20-9)购于成都曼斯特生物科技有限公司,芍药内酯苷(批号 20100910)购于天津一方科技有限公司;处方饮片由黑龙江中医药大学第一附属医院饮片库提供,清肝疏郁颗粒由本实验室自制;乙腈,甲醇色谱纯,蒸馏水为自制,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil (2)-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 14% A; 15~16 min, 14%~17% A; 16~30 min, 17% A; 30~31 min, 17%~18% A; 31~60 min, 18% A),运行时间 60 min,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35℃,进样量 10 μL,检测波长 264 nm(胡黄连苷 I、II),230 nm(芍药苷、芍药内酯苷)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取胡黄连苷 I、II 和芍

药苷、芍药内酯苷对照品适量,加甲醇溶解并配制成质量浓度分别为 672.00, 1 740.00, 1 000.00, 600.00 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备溶液,并用甲醇依次稀释成系列对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取清肝疏郁颗粒 0.5 g,置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,密封称重,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),冷却至室温,用甲醇补足减失的质量,混匀,取适量样品溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,密封备用。

2.2.3 阴性样品溶液 按照清肝疏郁颗粒的处方比例和制备工艺,分别制备缺胡黄连和白芍的阴性样品,以及缺胡黄连、白芍双阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备各阴性样品溶液。

2.2.4 专属性试验 取 2.2 项下混合对照品溶液、阴性样品溶液和供试品溶液,在上述色谱条件进行测定。结果表明胡黄连苷 I、II 和芍药苷与其他峰分离度良好,各色谱峰理论塔板数均 > 3 000,阴性无干扰,见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系的考察 分别精密吸取胡黄连苷 I、II 和芍药苷、芍药内酯苷系列混合对照品溶液各 10 μL(每个浓度重复 3 次),在上述色谱条件下进样测定。以平均峰面积为纵坐标,进样浓度为横坐标,绘制标准曲线,得胡黄连苷 I、II 和芍药苷、芍药内酯苷的线性回归方程,见表 1。

表 1 4 个成分的回归方程,相关系数和线性范围

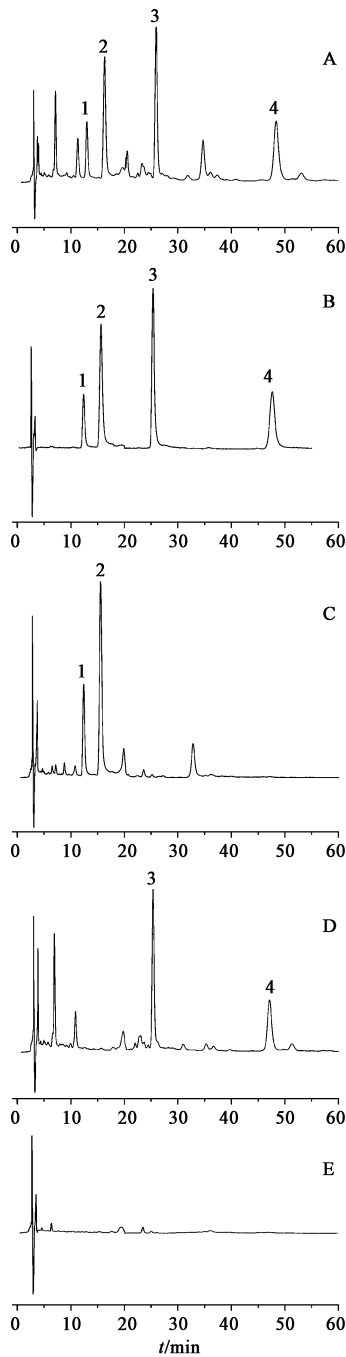
Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of four components

对照品	回归方程	r	线性范围/μg
胡黄连苷 I	$Y = 11\ 244.73X - 104\ 589.21$	0.999 6	0.067 2 ~ 6.72
胡黄连苷 II	$Y = 6\ 030.86X - 108\ 084.69$	0.999 8	0.017 4 ~ 17.4
芍药苷	$Y = 16\ 535.56X + 586\ 708.26$	0.999 5	0.01 ~ 10.00
芍药内酯苷	$Y = 11\ 970.13X + 162\ 688.84$	0.999 1	0.06 ~ 6.00

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,测定胡黄连苷 I、II 和芍药苷、芍药内酯苷的峰面积,结果该 4 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.0%, 1.1%, 1.3%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取清肝疏郁颗粒样品 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进样。结果胡黄连苷 I、II 和芍药苷、芍药内酯苷的平均质量分数为 215.93, 549.82, 135.35, 76.01 mg·L⁻¹, RSD 分别为 2.6%, 2.3%,

2.0%, 2.3%, 表明方法重复性良好。



A. 供试品; B. 对照品; C. 胡黄连阴性对照; D. 白芍阴性对照; E. 胡黄连、白芍阴性对照; 1. 芍药内酯苷; 2. 芍药苷; 3. 胡黄连苷 II; 4. 胡黄连苷 I

图 1 清肝疏郁方 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of the Qinggan Shuyu granule

2.3.4 稳定性试验 分别取同一批次 4℃ 下保存的清肝疏郁颗粒供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定,记录胡黄连苷 I, II 和芍药苷,芍药内酯苷色谱峰峰面积,其 RSD 分别为 2.4%, 2.6%, 1.3%, 1.5%, 表明样品溶液

在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收试验 称取 6 份已知含量的清肝疏郁颗粒 0.25 g,分别精密吸取 4 种对照品溶液适量,相当于胡黄连苷 I 1 310.40 μg,胡黄连苷 II 3 062.40 μg,芍药苷 700.00 μg 和芍药内酯苷 372.00 μg,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液并测定,见表 2。

表 2 胡黄连苷 I, II, 芍药苷和芍药内酯苷的加样回收率试验
Table 2 Recovery test for picroside I, II, paeoniflorin and albiflorin std

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)/%
胡黄连苷 I	0.251 1	1 084.4	1 310.4	2 378.5	98.75	98.55
	0.248 9	1 074.9	1 310.4	2 330.3	95.80	(1.7)
	0.247 8	1 070.3	1 310.4	2 351.7	97.80	
	0.241 7	1 043.8	1 310.4	2 350.4	99.71	
	0.236 1	1 019.6	1 310.4	2 340.4	100.80	
	0.260 6	1 125.4	1 310.4	2 415.5	98.45	
胡黄连苷 II	0.251 1	2 761.2	3 062.4	5 771.7	98.31	100.95
	0.248 9	2 737.0	3 062.4	5 787.5	99.61	(2.4)
	0.247 8	2 725.0	3 062.4	5 807.0	100.64	
	0.241 7	2 657.8	3 062.4	5 816.4	103.14	
	0.236 1	2 596.2	3 062.4	5 797.7	104.55	
	0.260 6	2 865.6	3 062.4	5 910.4	99.42	
芍药苷	0.251 1	679.7	700.0	1 354.7	96.42	97.90
	0.248 9	673.8	700.0	1 353.3	97.07	(1.4)
	0.247 8	670.8	700.0	1 353.0	97.46	
	0.241 7	654.3	700.0	1 356.3	100.30	
	0.236 1	639.1	700.0	1 324.2	97.86	
	0.260 6	705.4	700.0	1 393.2	98.26	
芍药内酯苷	0.251 1	381.7	372.0	744.5	97.50	97.90
	0.248 9	378.4	372.0	742.7	97.92	(1.7)
	0.247 8	376.7	372.0	734.1	96.08	
	0.241 7	367.5	372.0	739.5	100.02	
	0.236 1	358.9	372.0	716.5	96.12	
	0.260 6	396.2	372.0	767.2	99.73	

2.4 样品测定 取 10 批样品,制备供试品溶液,每个样品按确定的色谱条件进行分析,外标法计算样品中胡黄连苷 I, II 和芍药苷、芍药内酯苷的含量,结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取工艺优化 比较了回流、索氏、超声 3 种方法对提取效率的影响,结果表明 3 种方法对颗粒

表 3 10 批清肝疏郁颗粒中 4 种成分质量分数测定
Table 3 Determination results of ten batch samples in Qinggan Shuyu granule μg

No.	胡黄连苷 I	胡黄连苷 II	芍药苷	芍药内酯苷
1	2 180.28	5 478.53	1 304.77	720.92
2	2 178.73	5 507.52	1 363.26	737.61
3	2 179.44	5 502.72	1 366.94	722.54
4	2 187.25	5 578.08	1 433.25	735.42
5	2 137.91	5 504.15	1 348.08	763.82
6	2 141.36	5 436.72	1 343.02	767.72
7	2 150.76	5 482.80	1 351.26	690.47
8	2 212.64	5 614.58	1 397.76	797.15
9	2 236.84	5 641.40	1 396.38	724.83
10	2 199.75	5 616.76	1 390.66	809.20

中 4 种成分含量无明显差别,而超声提取简单方便。采用 30%、50%、70% 及甲醇为溶剂进行超声提取,甲醇提取率最高。采用甲醇为溶剂,分别超声提取 10、20、30 min,30 min 时颗粒中 4 种成分提取完全,因此选择 30 min 作为提取时间。

3.2 测定波长的选择 采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 分别扫描 4 种对照品、供试品溶液中胡黄连苷 I、II 和芍药苷、芍药内酯苷的紫外吸收,对照品和供试品中的胡黄连苷 I、II 均在 264 nm 有最大吸收,芍药苷、芍药内酯苷均在 230 nm 处有最大吸收,故选用 264、230 nm 作为测定波长。

3.3 流动相的选择 分别以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水-磷酸,乙腈-0.1% 甲酸水和乙腈-0.05% 甲酸

水溶液为流动相比较分离效果。结果表明乙腈-0.05% 甲酸水分离效果最佳,故选择乙腈-0.05% 甲酸水为流动相。

[参考文献]

[1] 刘洁,刘保林.西藏胡黄连保肝利胆作用的研究[J].中国新药杂志,2002,11(6):459-461.

[2] 郭鹏,孔伟.胡黄连抗药物性肝损伤的临床研究[J].山东中医药大学学报,2006,30(3):208-210.

[3] 杨洁,李萍,张玉萌,等.胡黄连的药理作用研究进展[J].解放军药科学报,2003,19(3):217-218.

[4] 王晓燕,庞建新.胡黄连总甙对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].广西医科大学学报,2002,19(4):524-526.

[5] 杨错,邢立国,刘玉兰.柴胡对大鼠实验性肝纤维化的预防作用[J].实用药物与临床,2006,8(5):12-14.

[6] 何燕,胡志峰,李平,等.柴胡皂苷 d 抗肝纤维化大鼠脂质过氧化作用的研究[J].中国中药杂志,2008,33(8):915-919.

[7] 郑琳颖,潘竞镨,吕俊华.白芍总苷对脂肪肝大鼠增强胰岛素敏感性及其抗脂肪肝作用[J].中国中药杂志,2008,33(20):2385-2390.

[8] 戴俐明,陈学广,徐叔云.白芍总甙对实验性肝炎的保护作用[J].中国药理学通报,1993,9(6):449-453.

[9] 周艳丽,张磊,刘维.白芍总苷对雷公藤多苷片所致小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究[J].天津中医药,2007,24(1):61-62.

[责任编辑 顾雪竹]