

# HPLC同时测定糖敏灵丸中5种成分的含量

雷定超<sup>1,2</sup>, 鄂秀辉<sup>2</sup>, 张兰兰<sup>2\*</sup>, 周水平<sup>2</sup>, 闫希军<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津天士力集团有限公司, 天津 300410)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定糖敏灵丸中芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷及黄芩苷含量的方法。方法:采用 Aglient ZorbaxSB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以 0.05% 磷酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱,流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 230 nm,柱温 30 °C。结果:芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷及黄芩苷的线性范围分别为 0.008 ~ 0.320, 0.021 ~ 0.832, 0.088 ~ 3.52, 0.124 ~ 4.96, 0.086 ~ 3.44 μg ( $r \geq 0.9999$ ,  $n = 7$ ); 平均回收率( $n = 6$ )分别为 99.7% (RSD 2.0%), 100.1% (RSD 1.8%), 100.1% (RSD 1.5%), 100.0% (RSD 2.4%), 103.6% (RSD 2.4%)。结论:所建立的 HPLC 方法简便,结果准确、可靠,重复性好。

**[关键词]** 高效液相色谱法;糖敏灵丸;芍药内酯苷;芍药苷;柚皮苷;新橙皮苷;黄芩苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0070-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1224.026.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-04 12:24

## Simultaneous Determination of Five Components in Tangminlingwan by HPLC

LEI Ding-chao<sup>1,2</sup>, E Xiu-hui<sup>2</sup>, ZHANG Lan-lan<sup>2\*</sup>, ZHOU Shui-ping<sup>2</sup>, YAN Xi-jun<sup>2</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;  
2. Tianjin Tasy Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of albiflorin, paeoniflorin, naringin, neohesperidin and baicalin in Tangminlingwan. **Method:** The chromatographic method was carried out on an Aglient Zorbax SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution as the mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup>. The detection was set at the wavelength of 230 nm. The column temperature was at 30 °C. **Result:** The linear ranges of albiflorin, paeoniflorin, naringin, neohesperidin and baicalin were 0.008-0.320, 0.021-0.832, 0.088-3.52, 0.124-4.96 and 0.086-3.44 μg ( $r \geq 0.9999$ ,  $n = 7$ ), respectively. The average recoveries were 99.7% (RSD 2.0%), 100.1% (RSD 1.8%), 100.1% (RSD 1.5%), 100.0% (RSD 2.4%) and 103.6% (RSD 2.4%), respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible.

**[Key words]** HPLC; Tangminlingwan; albiflorin; paeoniflorin; naringin; neohesperidin; baicalin

**[收稿日期]** 20111214(002)

**[基金项目]** 国家“十一五”重大新药创制课题(2010ZX09401-406);天津科技计划项目(112CKFSY01400);天津科技计划项目(11ZCKFSY01400)

**[第一作者]** 雷定超,硕士生,从事药物分析, Tel: 022-26736549, E-mail: leidingchao@163.com

**[通讯作者]** \* 张兰兰,从事药物化学研究, Tel: 022-86342608, E-mail: zhanguz@tasy.com

[8] 刘伟,郭蕾,崔永霞,等. HPLC 测定不同产地野生与栽培地骨皮中总东莨菪内酯[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 73.

[9] 刘波,张浩科,宫海燕. 反相高效液相色谱法测定新疆枸杞叶茶中芦丁和槲皮素的含量[J]. 中国实验方

剂学杂志, 2011, 17(14): 92.

[10] 李清民,王晓中,周洪玉,等. HPLC 法测定人参叶中人参黄酮苷的质量分数[J]. 吉林大学学报:理学版, 2010, 48(5): 865.

[责任编辑 顾雪竹]

糖敏灵丸是由白芍、枳实、黄芩等组成的复方制剂(在研中药六类新药),具有开郁清胃、滋阴降火、通腑泻浊之功效,适用于肝胃郁热型消渴病(II型糖尿病),安全性较好<sup>[1]</sup>。芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷及黄芩苷在糖敏灵丸中含量较高,且具有降血糖、降血脂、抗炎、抗氧化等作用<sup>[2-6]</sup>,故测定这几种活性成分的含量对于糖敏灵丸的质量控制具有非常重要的意义。已有报道HPLC分别同时测定制剂中的芍药内酯苷、芍药苷和柚皮苷<sup>[7]</sup>,芍药苷和黄芩苷<sup>[8]</sup>,黄芩苷和柚皮苷<sup>[9]</sup>,芍药苷、柚皮苷和新橙皮苷<sup>[10]</sup>,但同时测定这5种成分尚未见报道。本文利用HPLC同时测定糖敏灵丸中这几种活性成分的含量,为糖敏灵丸的质量标准提供依据。

## 1 仪器与试剂

XS205DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),KQ-250VDB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Agilent 1200型液相色谱仪、Agilent DAD检测器(美国Agilent公司),芍药内酯苷(批号10052128,天津一方科技有限公司),芍药苷(批号110736-200422,含量测定用)、柚皮苷(批号110722-200610,含量测定用)、新橙皮苷(批号111857-201102,含量测定用)、黄芩苷(批号110715-200514,含量测定用)均由中国药品生物制品检定所提供,乙腈(色谱纯,Merck公司),磷酸(色谱纯,天津光复精细化工研究所),甲醇(分析纯,天津化学试剂有限公司),水为Milli Q制备超纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZorbaxSB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,0.05%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min,10%~14% B;5~15 min,14%~16% B;15~16 min,16%~19% B;16~35 min,19% B;35~46 min,19%~22% B;46~55 min,22% B),流速1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长230 nm,进样量15 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取芍药内酯苷对照品、芍药苷对照品、柚皮苷对照品、新橙皮苷对照品、黄芩苷对照品适量,加50%甲醇分别制成每1 mL含芍药内酯苷16 μg、芍药苷41.6 μg、柚皮苷176 μg、新橙皮苷248 μg、黄芩苷172 μg的混和溶液,即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取糖敏灵丸适量,研细,取约62 mg,精密称定,置25 mL量瓶中,加50%甲醇25 mL,超声处理(功率300 W,频率45 kHz)30 min,放冷,加50%甲醇至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

**2.2.3 阴性样品溶液的制备** 按糖敏灵丸的制备工艺分别制得不含白芍、枳实及黄芩的阴性样品,按2.2.2项下操作方法分别制得各阴性样品溶液。

**2.3 专属性考察** 取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各15 μL,在上述色谱条件下进行测定。结果阴性样品溶液在与对照品相同的保留时间位置上未见色谱峰,说明阴性无干扰,见图1。取上述5种对照品适量,以50%甲醇分别溶解,按2.1项色谱条件进样,记录结果,在所得的色谱图上提取各成分的DAD特征光谱图,并添加到新建的“糖敏灵成分对照品”光谱库,将供试品溶液所得的HPLC色谱与“糖敏灵成分对照品”光谱库进行谱库匹配,结果表明匹配度良好。

**2.4 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液0.5,1,3,6,10,15,20 μL,进样测定其峰面积。以峰面积值Y为纵坐标,进样量(μg)为横坐标作图,进行线性回归,得出糖敏灵丸中5个指标成分的标准曲线方程、相关系数及线性范围(表1)。结果表明,5个成分在各自线性范围内,峰面积值与进样量具有良好的线性关系。

表1 糖敏灵丸5种成分的回归方程和线性范围

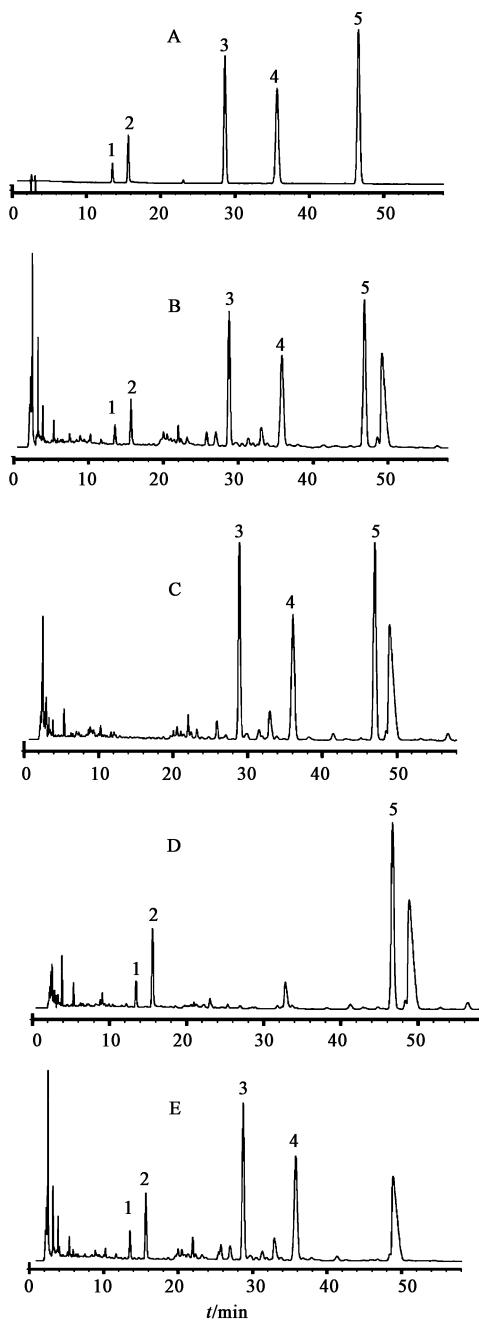
成分	回归方程	r	线性范围/μg
芍药内酯苷	$Y = 3.045X - 2.099$	0.999 9	0.008 ~ 0.320
芍药苷	$Y = 446.8X - 1.034$	0.999 9	0.021 ~ 0.832
柚皮苷	$Y = 2.259X - 1.095$	0.999 9	0.088 ~ 3.52
新橙皮苷	$Y = 2.199X - 7.043$	0.999 9	0.124 ~ 4.96
黄芩苷	$Y = 1.317X - 3.048$	0.999 9	0.086 ~ 3.44

**2.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液15 μL,按上述色谱条件连续进样6次,测定峰面积,计算芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.43%,0.39%,0.41%,0.42%,0.38%。结果表明该仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取同一批次的样品6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,结果芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的含量分别为2.12,5.08,12.89,13.15,28.79 mg·g<sup>-1</sup>;RSD分别为0.91%,0.79%,0.64%,0.86%,0.76%。结果表明,本方法的重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液分别在0,2,4,6,12,24 h进样,按上述色谱条件测定峰面积,结果样品中芍药内酯苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.63%,0.48%,0.55%,1.75%,0.41%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.8 回收率试验** 精密称取已知含量的糖敏灵丸



A. 混合对照品; B. 样品; C. 缺白芍阴性样品;  
D. 缺枳实阴性样品; E. 缺黄芩阴性样品

1. 芍药内酯苷; 2. 芍药苷; 3. 柚皮苷; 4. 新橙皮苷; 5. 黄芩苷

图 1 对照品、糖敏灵丸及阴性样品色谱

粉末(批号 20100501)约 32 mg,共 6 份,分别精密加入混合对照品溶液(每 1 mL 含芍药内酯苷 16.4  $\mu\text{g}$ 、芍药苷 41.5  $\mu\text{g}$ 、柚皮苷 97.3  $\mu\text{g}$ 、新橙皮苷 103.5  $\mu\text{g}$ 、黄芩苷 244.9  $\mu\text{g}$ )4 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试溶液并测定,计算回收率,结果见表 2。

**2.9 样品的测定** 按 2.2.2 项制备 3 批中试样品的供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,精密吸取 15  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,测定峰面积,计算芍药内酯

表 2 糖敏灵丸中 5 处成分加样回收率试验 ( $n=6$ )

成分	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
芍药内酯苷	0.065 6	0.065 6	0.131 3	100.2	99.7	2.0
	0.066 2	0.065 6	0.131 2	99.1		
	0.066 2	0.065 6	0.133 1	102.0		
	0.066 5	0.065 6	0.129 6	96.1		
	0.065 8	0.065 6	0.131 8	100.7		
	0.066 6	0.065 6	0.132 2	100.0		
芍药苷	0.158	0.166	0.325	100.9	100.1	1.8
	0.159	0.166	0.327	101.2		
	0.159	0.166	0.329	102.1		
	0.160	0.166	0.320	96.7		
	0.158	0.166	0.323	99.3		
	0.160	0.166	0.327	100.5		
柚皮苷	0.400	0.389	0.791	100.5	100.1	1.5
	0.404	0.389	0.792	99.9		
	0.403	0.389	0.799	101.6		
	0.405	0.389	0.784	97.2		
	0.401	0.389	0.793	100.7		
	0.406	0.389	0.799	100.9		
新橙皮苷	0.408	0.414	0.820	99.5	100.0	2.4
	0.412	0.414	0.822	99.2		
	0.412	0.414	0.829	100.9		
	0.414	0.414	0.814	96.7		
	0.409	0.414	0.822	99.8		
	0.414	0.414	0.845	104.0		
黄芩苷	0.893	0.980	1.917	104.5	103.6	2.4
	0.901	0.980	1.922	104.2		
	0.901	0.980	1.872	99.1		
	0.905	0.980	1.928	104.4		
	0.896	0.980	1.924	104.9		
	0.907	0.980	1.932	104.7		

苷、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰含量,结果见表 3。

表 3 糖敏灵丸含量测定

批号	芍药内酯苷	芍药苷	柚皮苷	新橙皮苷	黄芩苷
20100501	2.12	5.09	12.94	13.22	29.28
20100502	2.08	4.95	11.59	11.88	28.03
20100801	2.16	5.18	12.84	13.59	30.34

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 采用DAD全波长扫描,芍药内酯苷和芍药苷最佳吸收波长分别为230 nm,柚皮苷、新橙皮苷、黄芩苷最佳吸收波长280 nm,而在230 nm处这5个成分都有吸收且共同吸收最大基线平稳、干扰较小,故选择230 nm为检测波长。

**3.2 流动相的选择** 在流动相选择中,当溶剂系统为水-乙腈时,芍药内酯苷和芍药苷峰形尖锐,分离度好,但黄芩苷峰形差。为改善黄芩苷峰形,在水相中加入少量酸,分别考察了0.02%磷酸溶液-乙腈、0.05%磷酸溶液-乙腈、0.10%磷酸溶液-乙腈、0.20%磷酸溶液-乙腈等流动相。随着磷酸浓度的增加,芍药内酯苷和芍药苷逐渐出现拖尾,而黄芩苷峰形更尖锐,分离度更高,柚皮苷、新橙皮苷峰形变化不明显。综合考虑这5个成分,选择0.05%磷酸溶液-乙腈为本试验的流动相。

**3.3 提取溶剂及提取时间的选择** 由于芍药苷受热不稳定<sup>[11]</sup>,为避免加热回流提取中过高的温度对样品中芍药苷的破坏,故采用超声提取。本试验考察了水、50%甲醇,甲醇3种溶剂的超声提取效果,发现以50%甲醇效果最好;进而考察了分别用0.25,0.125,0.0625 g在25 mL 50%甲醇提取的效果,结果表明加入0.0625 g在25 mL 50%甲醇时样品中待测指标成分已提取较完全。本试验曾采用超声20,30,40 min,3个时间进行样品提取,结果显示,超声处理30 min各成分含量已达到较大值,继续增加超声时间对提取效果影响很小。综合以上考察,选择用50%甲醇超声提取30 min为宜。

**3.4 小结** 本试验采用HPLC同时测定糖敏灵丸中5种活性成分的含量,方法简便,结果准确可靠,可为更加全面控制糖敏灵丸质量提供了科学依据。

#### [参考文献]

[1] 仝小林,倪青,连凤梅,等. 糖敏灵丸治疗2型糖尿病

随机双盲平行对照多中心临床试验[J]. 中国临床药理学杂志,2009,25(2): 104.

- [2] Punithavathi V R, Anuthama R, Prince P S. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats[J]. J Appl Toxicol, 2008, 28(6): 806.
- [3] 时雪峰. 柚皮苷提取纯化及其降血糖活性研究[D]. 南宁:广西医科大学,2008.
- [4] FU J, LI Y, WANG L, et al. Paeoniflorin prevents diabetic nephropathy in rats[J]. Comp Med, 2009, 59(6): 557.
- [5] LI H T, WU X D, DAVEY A K, et al. Antihyperglycemic effects of baicalin on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats[J]. Phytother Res, 2011, 25(2): 189.
- [6] 刘金凤,彭红丽. 黄芩苷对链脉佐菌素诱导的糖尿病模型大鼠血糖和血脂及腺苷酸活化蛋白激酶的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2011,25(2): 145.
- [7] 吴赛伟,水文波,葛志伟,等. RP-HPLC法测定气滞胃痛颗粒中4种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2009,29(8): 1301.
- [8] 杨燕飞. RP-HPLC同时测定坤泰胶囊中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量[J]. 中成药, 2010,32(6): 958.
- [9] 郭丽红,郑国钧,苗爱东,等. 高效液相色谱法测定解表清肺丸中柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(9): 1493.
- [10] 王跃生,饶毅,魏惠珍,等. HPLC-“内标”多控法测定四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷[J]. 中草药,2008,39(9): 1316.
- [11] 解江纯,刘志东,田慧,等. 芍药苷稳定性研究[J]. 天津中医药,2010,27(4):344.

[责任编辑 顾雪竹]