

HPLC 法测定牛芍熏洗散中芍药苷的含量

杨朝晖 余永红*

衡阳冉东中药材有限责任公司 湖南 421001

摘要：目的 建立 HPLC 法测定牛芍熏洗散中芍药苷的含量。方法 采用 Agilent5 TC-C18(2) (250mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液 (15: 85)；检测波长 230nm；流速：1.0mL·min⁻¹；柱温：30℃。结果 芍药苷的线性范围为 0.219 ~ 2.192 μg (r=0.9996, n=6)；芍药苷平均回收率为 93.75%，RSD (n=9) 为 1.83%。结论 该方法可用于牛芍熏洗散中芍药苷的含量测定。

关键词：HPLC 法；芍药苷

牛芍熏洗散是由当归、白芍、红花、牛膝、乳香、没药、三七七味组成，牛膝和白芍是镇肝熄风汤、清肝引经汤和壮筋养血汤等五十余首方剂中的常见药对配伍，民间根据该药对活血祛瘀、补肝肾、强筋骨、调经止痛、敛阴平抑肝阳等功效和作用，配以活血化瘀、止痛消肿的其它药如当归、三七等对跌打损伤包括刀枪、跌仆、殴打、闪挫、刺伤、擦伤、运动损伤等，伤处多有疼痛、肿胀、出血或骨折、脱臼等进行熏洗，来缓解症状、消肿止痛。方中白芍养血调经，敛阴止汗，柔肝止痛，为重要臣药^[8]，其有效成份为芍药苷，作者根据民间习用方法，将牛膝、白芍等以上七味药经过粉碎混合制成熏洗药包，对该民间验方进行前期研究。本文采用高效液相色谱法对牛芍熏洗散中芍药苷进行了含量测定研究。该方法稳定、可靠，可为该产品建立质量控制方法提供参考。

1. 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (日本岛津 SPD-M20A 二极管阵列检测器, LC-20AT 双元泵)；芍药苷对照品 (批号 110736-202246, 含量 96.7%, 供含量测定用) 由中国食品药品检定研究院提供；水为双重蒸馏水；乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯。牛芍熏洗散 (自制 批号: 220126, 220513, 220612)

2. 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent5 TC-C18(2) C18 柱 (250mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (15: 85)；检测波长 (采用二极管阵列检测器): 在 230nm 处测定芍药苷, 流速:

1.0mL·min⁻¹；柱温: 30℃。进样量 20μL, 采用外标法定量。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取芍药苷对照品 14.17mg, 置 25mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成芍药苷对照品储备溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 10 袋, 倾去内容物, 粉碎成细粉、混合均匀, 取细粉约 1.4g, 精密称定, 置 150ml 锥形瓶中, 加甲醇 50mL, 称定重量, 超声处理 (功率 300W, 频率 50kHz) 30 分钟, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取滤液 25mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 加水 (15mL, 15mL, 10mL, 10mL, 10mL), 置水浴中加热使溶解, 转移至 D101 型大孔吸附树脂柱^[4] (内径 1.5 cm, 柱高 12 cm,), 用水 150mL 洗脱, 弃取洗脱液, 继用 50% 甲醇溶液 120mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇溶液使溶解, 分次转移至 25mL 量瓶中, 加甲醇溶液至刻度, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 2mL, 置上述 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 经 0.45μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液备用。

2.4 专属性试验

按牛芍熏洗散处方比例及工艺制成不含白芍的阴性样品, 照“2.3”项方法制备阴性样品溶液。取供试品溶液、对照品溶液及阴性样品溶液按上述色谱条件测定, 结果表明处方中其他药味不干扰芍药苷的测定, 分离良好。样品中芍药苷吸收光谱曲线分别与对照品保持一致, 芍药苷的理论板数均为 10000 以上, 见图 1。

2.5 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下的芍药苷储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0mL，分别置 50mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成梯度对照品溶液，按上述色谱条件测定芍药苷峰面积，以进样量 (μg) 为横坐标 (X)，峰面积 A 为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线。芍药苷回归方程为： $Y=1.548 \times 10^6 X - 2.100 \times 10^3$ ($r=0.9996$, $n=6$)。结果表明芍药苷的进样量在

0.219 ~ 2.192 μg ，与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取同一份供试品溶液，重复进样 6 次，芍药苷峰面积积分值的 RSD 为 0.5%。

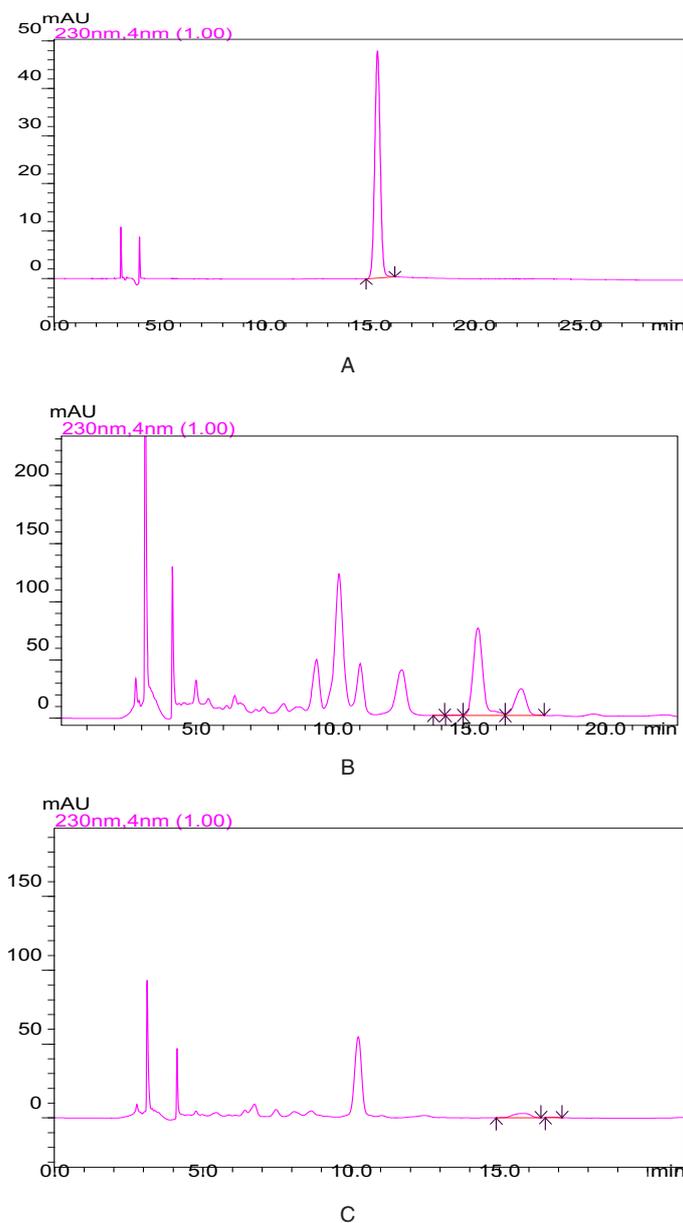


图 1 芍药苷洗脱 HPLC 色谱图

A. 芍药苷对照品 (reference substance of paeoniflorin); B. 样品 (sample); C. 阴性样品 (negative sample)

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液，在 12 小时内每隔 2 小时进样 1 次，结果芍药苷峰面积积分值的 RSD 为 1.1%。

2.8 重复性试验

取批号为 220126 的样品 6 份，按“2.3”项下方法及上述色谱条件测定，结果芍药苷含量的 RSD 分别为 1.6%。

2.9 加样回收率试验

取批号为220126的样品(样品芍药苷含量为 $1.607\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)9份,设低、中、高三个量,每个量3份,分别精密加入芍药苷对照品溶液(芍药苷浓度为 $0.5668\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)2、3、4mL,按“2.3”项下方法及上述色谱条件测定,计算回收率。结果芍药苷平均回收率为92.68%,RSD为0.83%。见表1。

表1 芍药苷加样回收率结果(n=9)

No	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
1	1.272	1.134	2.230	92.68
2	1.340	1.134	2.280	92.16
3	1.326	1.134	2.264	92.03
4	1.824	1.700	3.266	92.68
5	1.809	1.700	3.262	92.96
6	1.831	1.700	3.286	93.06
7	2.407	2.267	4.348	93.03
8	2.291	2.267	4.238	92.98
9	2.408	2.267	4.326	92.53

表2 样品测定结果

No	样品批号	样品含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD %
1	220126	1.607	1.6
2	220513	1.562	1.9
3	220612	1.613	1.7

2.10 样品测定

取三个批号的样品,按“2.3”项方法及上述色谱条件测定,结果见表2。

3. 讨论

3.1 提取条件的选择^[1-7]

供试品溶液过D101型大孔吸附树脂以提取、富集芍药苷。既能提高提取率又能除去许多杂质,保护了色谱柱。

考察了水对芍药苷的不良影响:收集水洗脱液,蒸干,加甲醇2mL使溶解,经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,按上述色谱条件测定,结果未检出芍药苷。

考察了洗脱剂(40%甲醇、80%甲醇、甲醇)及用量(80、120、150mL),结果选择了80%甲醇120mL。

3.2 流动相的选择^[1-7]

曾试验了甲醇-水、乙腈-水及乙腈-0.1%磷酸溶液,结果表明乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85)、柱温 30°C 的色谱条件最佳。

3.3 检测波长的选择^[1-7]

应用二极管检测器在190~400nm范围内进行扫描,芍药苷在230nm处有最大吸收。

3.4 本法耐用性考察

分别考察了流动相比比例变化 $\pm 5\%$,柱温变化 $\pm 5^{\circ}\text{C}$,检测波长 $\pm 5\text{nm}$,流速相对值变化 $\pm 20\%$,采用三根不同品牌的色谱柱(Agilent5TC-C18(2)柱、Hypersil ODS2柱、Inertsil ODS-3柱)进行了试验,结果系统适用性参数符合要求。

中医所用的活血散瘀熏洗药多由当归、三七、红花、白芍、牛膝、没药、乳香等中草药配伍而成。牛膝疏通筋脉、滋养肝肾、引火下行、下血降气,具有抗高血脂、抗氧化、抗炎等特性。白芍滋养阴液,柔润熄风,具有抗炎、镇静、免疫抑制作用。有研究结果显示,如果只损伤了软组织,适当的时候采用中草药熏洗,有益于缓解症状。

跌打损伤刚刚发生,不宜用药物洗治,此时如果用药物熏洗,患处血管就会加剧扩张,渗血、水肿也会随之加重,不仅会造成软组织粘连和局部功能减弱,而且还极易增强疼痛感。因此,应在发生损伤后立即采用冷敷,这样可使患处血管收缩并减少出血、水肿和疼痛。到损伤的第三四天后再采用活血散瘀的中药外敷洗,连用几日,便可达到活血化瘀、止痛消肿的效果。

参考文献:

- [1] 中国药典2020年版.一部[S].2020:1053
- [2] 董清,杜攀,李培.高效液相色谱法测定面煨肉豆蔻中去氢二异丁基酚含量[J].中国药业,2022,31(3):91-92
- [3] 张玉莹,徐玲玲,刘爱军,等.生肌化瘀凝胶质量标准[J].中国药业,2022,31(6):61-65
- [4] 周琳.炎立消片含量测定方法的改进[J].中国药品标准,2018,19(6):61-65
- [5] 吴勇,刘燕.,丁茹,等.HPLC法同时测定金胆片中龙胆苦苷等4种主成分的含量[J].中国药品标准,2024,24(1):94-98
- [6] 周琳.胃肠健胶囊含量测定方法的改进[J].中南药学,2008,6(5):571-573
- [7] 李木子,王京辉,郭洪祝,等.HPLC法测定白术饮片中多种化学成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(9):1585-1592
- [8] 唐于平,尚尔鑫,陈艳琰,等.药对配伍效应与功效物质现代研究方法策略[J].药学报,2019,54(9):1564-1573.