

多波长测定法在鳖甲煎丸提取物检测中的应用*

盛云杰, 付珍珠, 郑 婷, 秦 磊, 张永生[△]

(浙江中医药大学, 浙江杭州 310053)

摘要: 目的 建立同时测定鳖甲煎丸中芍药苷、黄芩苷、丹皮酚 3 种有效成分含量的 HPLC 方法。方法 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱(5 μ m, 4.6mm \times 150mm), 流动相为乙腈(A)和 0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速 1.0mL/min; 检测波长 240、274nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C。结果 芍药苷、黄芩苷、丹皮酚线性浓度范围分别是: 1.41~14.11 μ g/mL($r^2=0.9999$), 7.03~70.32 μ g/mL($r^2=0.9999$), 1.23~12.32 μ g/mL($r^2=0.9997$)对照品线性关系良好, 各成分的平均回收率($n=9$)分别为: 100.84%、99.07%、99.08%。结论 该方法准确、可靠、重现性好, 可用于鳖甲煎丸提取物的质量控制。

关键词: HPLC; 鳖甲煎丸; 芍药苷; 黄芩苷; 丹皮酚

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)05-0016-04

经典处方“鳖甲煎丸”出自东汉医家张仲景所著《金匮要略·疟病脉证并治第四》。本方攻补兼施, 多用于正虚邪实, 气虚血瘀之肝硬化的临床治疗, 软坚散结之功效。临床上常用于治疗肝纤维化、肝炎肝硬化、心绞痛、高脂血症、血吸虫病肝脾肿大等症, 具有确切的临床疗效^[1-4]。鳖甲煎丸原标准收载于中华人民共和国药典 1985 年版一部, 缺少含量测定项目, 李宝明^[5]、张庆^[6]分别对鳖甲煎胶囊中的厚朴酚和芍药苷、黄芩苷等含量进行检测, 但是未见对各含量用一种流动相体系同时进行检测的方法。笔者对方法进行了改进, 建立用同一种流动相体系, 实现对牡丹皮、黄芩、白芍的相关指标成分的含量测定, 既节约了时间, 又节约了物料, 同时可以更加严格有效地控制人参鳖甲煎丸的质量, 保证临床用药的有效性和安全性。现报告如下。

1 仪器与试剂

Waters e2695 液相色谱仪(美国沃特斯公司), 十万分之一分析天平(德国赛多利斯), 丹皮酚、黄芩苷、芍药苷(中国生物制品检定所); 鳖甲煎丸(武汉中联药业)、甲醇、乙腈(德国默克色谱纯)、乙醇(分析纯)、磷酸(分析纯)为国药集团化学试剂公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Eclipse XDB-C18 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm)美国安捷伦科技公司; 流动相 A 为 0.1%磷酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱: 0~10 min 流动相 A 为 13%, 流动相 B 为 87%; 10~20 min A 为 30%, B 为 70%; 20~30 min A 为 30%, B 为 70%; 30~33 min A 为 13%, B 为 87%; 33min 后 A 为 13%, B 为 87%。流速 1.0 mL/min, 检测波长 240 nm 及 274 nm, 进样量 10 μ L, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 混合对照品、供试品、阴性制剂的 HPLC 图谱见图 1-3。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取芍药苷、黄芩苷、丹皮酚对照品适量, 加甲醇至 50mL 容量瓶使溶解制成混合对照品储备溶液(浓度分别为 14.11, 70.32, 12.32 μ g/mL)。精密吸取各对照品溶液适量(1, 2, 3, 4, 5, 10 mL), 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.3 线性关系考察

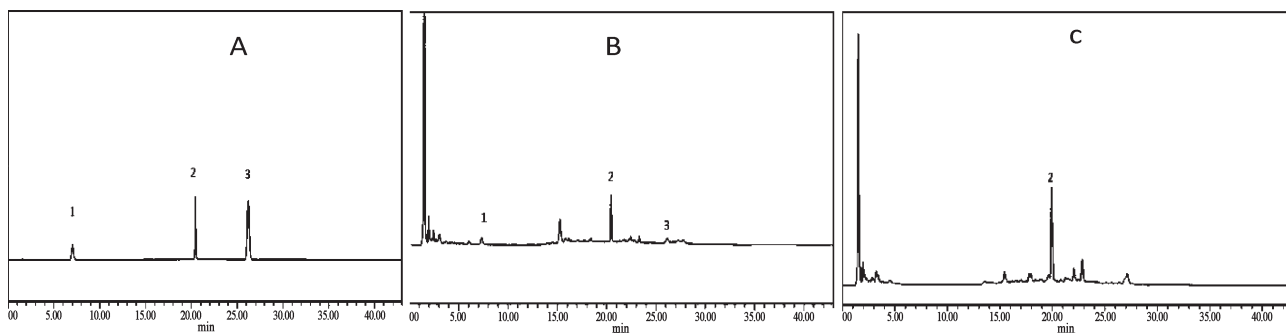
精密吸取上述混合对照品系列溶液 10 μ L, 分别注入液相色谱仪中测定, 以各对照品浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行回归, 回归方程及线性

* 基金项目: 浙江省重点科技创新团队项目(2012R10044-03)

收稿日期: 2014-08-29

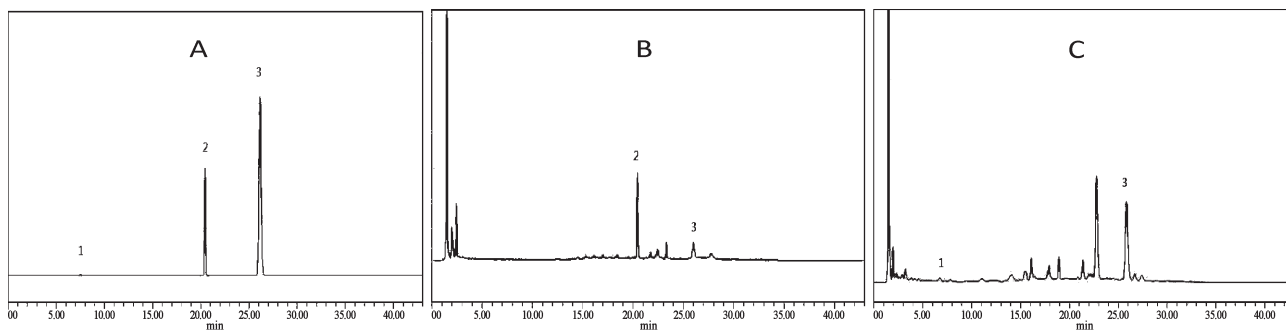
作者简介: 盛云杰(1982-), 男, 浙江杭州人, 实验师, 研究方向: 中药质量标准及抗肝纤维化。

[△]通信作者: 张永生, E-mail: alex.yzhang@zcmu.edu.cn



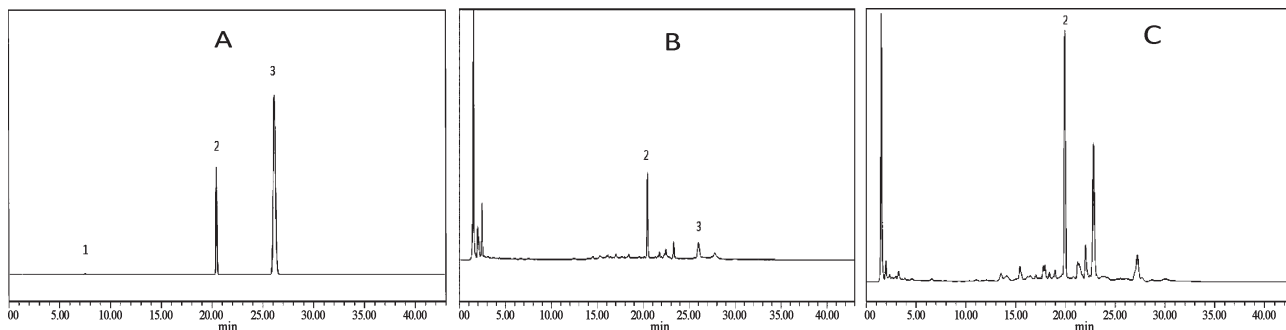
1.芍药苷;2.黄芩苷;3.丹皮酚

图 1 混合对照品(A)、样品溶液(B)和缺牡丹皮、白芍的阴性制剂(C)在 240nm 处的 HPLC 图谱



1.芍药苷;2.黄芩苷;3.丹皮酚

图 2 混合对照品(A)、样品溶液(B)和缺黄芩的阴性制剂(C)在 274nm 处的 HPLC 图谱



1.芍药苷;2.黄芩苷;3.丹皮酚

图 3 混合对照品(A)、样品溶液(B)和缺牡丹皮、白芍的阴性制剂(C)在 274nm 处的 HPLC 图谱

范围见表 1。

表 1 回归方程、相关系数及线性范围

| 检测成分 | 回归方程 | R^2 | 线性范围/($\mu\text{g/mL}$) |
|------|-------------------|--------|---------------------------|
| 芍药苷 | $Y=8952.7X+5807$ | 0.9999 | 1.41~14.11 |
| 黄芩苷 | $Y=38433X-20981$ | 0.9999 | 7.03~70.32 |
| 丹皮酚 | $Y=53969X+6824.1$ | 0.9997 | 1.23~12.32 |

由表 1 可见对照品浓度与峰面积关系结果表明各组线性关系良好。

2.4 供试品溶液制备

取鳖甲煎丸颗粒 0.5 g, 精密称定, 精密加入

50%乙醇 25 mL, 称定重量, 超声提取 120 min, 放冷, 用 50%乙醇补足减失的重量, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液 5mL 用 50%乙醇定容至 10 mL 过 0.22 μm 滤膜即为供试品溶液。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪中, 连续测定 6 针, 测定 3 个有效成分色谱峰面积, 计算各有效成分的 RSD 分别为 0.76%、0.47%、0.02%, 均小于 2%, 符合要求, 见表 2。

2.6 供试液稳定性考查

按“2.4”项下制备供试品溶液, 分别于放置

表2 各组分精密度峰面积及RSD

| 检测成分 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | RSD/% |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 芍药苷 | 55161 | 55098 | 55889 | 54880 | 56128 | 55322 | 0.76 |
| 黄芩苷 | 1056972 | 1054662 | 1043213 | 1045337 | 1045128 | 1042871 | 0.47 |
| 丹皮酚 | 266699 | 266708 | 266881 | 267136 | 267251 | 267286 | 0.02 |

0, 2, 8, 12, 24, 48 h, 精密吸取供试液 10 μ L, 注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 计算各有效成分的 RSD 分别为 0.67%、0.48%、1.8%, 说明各成分的稳定性较好, 供试品溶液制备后在 48h 内都可测定。

2.7 重复性试验

取鳖甲煎丸 0.5 g, 精密称定, 共计 6 份, 按“2.4”项下制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪中, 测定各峰面积, 计算各成分含量及 RSD, 结果芍药苷、黄芩苷、丹皮酚含量的 RSD 分别为 1.6%、1.5%、1.6%, 表明本法重现性良好, 见表 3。

表3 各组分测定结果(mg/g)

| 检测成分 | 试验号 | | | | | | RSD(%) |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 芍药苷 | 0.7593 | 0.7950 | 0.7649 | 0.7809 | 0.7790 | 0.7832 | 1.6 |
| 黄芩苷 | 2.092 | 2.182 | 2.106 | 2.144 | 2.1587 | 2.1401 | 1.5 |
| 丹皮酚 | 0.5577 | 0.5673 | 0.5504 | 0.5552 | 0.5708 | 0.5715 | 1.6 |

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品 9 份(批号 130140), 每份 0.1 g, 精密称定, 分别精密加入各对照品适量制成高中低 3 份, 每个浓度做 3 次, 计算回收率, 结果见表 4。

表4 芍药苷、黄芩苷、丹皮酚加样回收率测定结果(n=3)

| 组分名称 | 添加水平/ μ g | 平均回收率/% | 相对标准偏差/% | 芍药苷 | | 黄芩苷 | | 丹皮酚 | |
|------|---------------|---------|----------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | | | | 含量/(mg/g) | RSD/% | 含量/(mg/g) | RSD/% | 含量/(mg/g) | RSD/% |
| 芍药苷 | 44.10 | 97.25 | 1.03 | 0.7593 | | 2.092 | | 0.5570 | |
| | 88.20 | 101.54 | 0.93 | 0.7649 | 1.32 | 2.106 | 1.67 | 0.5504 | 1.86 |
| | 14.70 | 103.75 | 0.53 | 0.7790 | | 2.159 | | 0.5708 | |
| 黄芩苷 | 13.20 | 104.07 | 0.79 | 0.7279 | | 2.232 | | 0.4959 | |
| | 19.80 | 97.46 | 0.91 | 0.7395 | 0.89 | 2.268 | 0.81 | 0.5115 | 1.56 |
| | 26.40 | 95.68 | 0.78 | 0.7285 | | 2.254 | | 0.5056 | |
| 丹皮酚 | 30.80 | 98.23 | 2.90 | 0.9705 | | 2.590 | | 0.5859 | |
| | 61.60 | 98.18 | 1.84 | 0.95710 | 0.81 | 2.554 | 0.98 | 0.5967 | 1.95 |
| | 92.40 | 100.83 | 0.89 | 0.9569 | | 2.542 | | 0.6092 | |

结果表明, 芍药苷、黄芩苷、丹皮酚的回收率在 95%~104% 之间, 平均回收率为 100.84%、99.07%、99.08%, 且 RSD 均小于 3%, 说明本色谱分析方法是准确可信的。

2.9 样品含量测定

取不同批次鳖甲煎丸, 按“2.4”项下制备供试品溶

液, 精密吸取供试品溶液 10 μ L, 在“2.1”色谱条件下, 每个样品测 3 次, 结果见表 5。

表5 样品中三种成分的含量测定结果(n=3)

| 批号 | 芍药苷 | | 黄芩苷 | | 丹皮酚 | |
|--------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | 含量/(mg/g) | RSD/% | 含量/(mg/g) | RSD/% | 含量/(mg/g) | RSD/% |
| 130140 | 0.7593 | | 2.092 | | 0.5570 | |
| | 0.7649 | 1.32 | 2.106 | 1.67 | 0.5504 | 1.86 |
| | 0.7790 | | 2.159 | | 0.5708 | |
| 130460 | 0.7279 | | 2.232 | | 0.4959 | |
| | 0.7395 | 0.89 | 2.268 | 0.81 | 0.5115 | 1.56 |
| | 0.7285 | | 2.254 | | 0.5056 | |
| 140100 | 0.9705 | | 2.590 | | 0.5859 | |
| | 0.95710 | 0.81 | 2.554 | 0.98 | 0.5967 | 1.95 |
| | 0.9569 | | 2.542 | | 0.6092 | |

2.10 回流提取

取鳖甲煎丸颗粒 0.5 g(批号 130140), 精密称定, 加入 50%乙醇 25 mL 至圆底烧瓶中, 称定重量, 电热套加热回流提取 120 min, 放冷, 用 50%乙醇补足减失的重量, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液 5 mL 用 50%乙醇定容至 10 mL 过 0.22 μ m 滤膜即为供试品溶液。结果见表 6。

表6 各组分测定结果(mg/G)

| 检测成分 | 试验号 | | | 平均值 |
|------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 芍药苷 | 0.7825 | 0.7853 | 0.7920 | 0.7866 |
| 黄芩苷 | 2.061 | 2.051 | 2.069 | 2.059 |
| 丹皮酚 | 0.5112 | 0.5194 | 0.5293 | 0.5201 |

3 讨论

3.1 样品前处理方法的探讨

笔者认为,在预实验中热回流提取法和超声提取法有比较明显的区别,由于丹皮酚的热不稳定性易挥发^[7],热回流法对其影响较大,提取率与超声提取法相比下降了6%左右,芍药苷和黄芩苷2种方法未见明显区别,由于超声波辅助提取技术具有加快提取效率、节约能源以及环保的优势,所以笔者从热稳定性以及经济节能的角度上考虑选用超声波提取。考虑到提取溶剂选择方面的因素,笔者结合相关检测物质的特性分别采用了水提和50%乙醇以及无水乙醇提取进行了比较:试验中无水乙醇超声提取无法完全溶解鳖甲煎丸,同时从经济上考虑舍弃纯乙醇提取;在水提和50%乙醇2者比较发现,芍药苷2者区别不显著,但是在黄芩苷和丹皮酚的提取率上面,加了有机溶剂的溶媒提取率明显上升,这个与2个物质的溶剂极性也相吻合^[8-9],所以50%乙醇作为鳖甲煎丸最后的提取溶剂选择。

3.2 多组分同时检测技术

多组分同时检测是当今检测技术发展的方向,其能否实现同时检测,需满足如下条件^[10]:①组分是否适用于同一检测器;②在同一色谱柱上和同一流动相(梯度)下进行有效分离;③检测限和定量限是否达标。当今HPLC系统配置多通道紫外检测器已成标配,这为不同(双)波长下同时检测多组分提供了可能;HPLC中最常用的分析柱C₁₈,可实现多种有机物有效分离;流动相的配比及梯度条件成了多组分检测的唯一要点。鉴于3种组分在检测器、色谱柱以及流动相之间的相似性,本试验设计出以pH 2.5左右的磷酸水溶液和乙腈的混合溶液作为流动相,结合多通道紫外检测器与C₁₈色谱柱。波长选择上,最初考察了芍药苷考察230nm波长,但是发现基线波动比较大,故舍去一部分响应的情况先选取了240nm发现效果良好。而对于黄芩苷和丹皮酚我们选取了274nm,仪器响应都达到要求。试验

结果表明,采用C₁₈色谱柱,酸性低浓度乙腈流动相和多通道紫外检测器完全可以实现3种目标组分的同时分离检测,其准确性、精密度和检测限满足检测要求。

3.3 样品进样体积

HPLC实验过程中的进样体积一般首选为20μL,初试实验过程中黄芩苷和丹皮酚峰形符合要求,但芍药苷的峰形在该色谱流动相条件下进样20μL后出现严重的前沿峰,拖尾因子达不到实验要求。尝试用流动相稀释样品,以及降低样品浓度的方法都没有达到很好的效果。最后通过降低进样体积减少到10μL,达到实验要求,其可能为色谱柱承载量有一定的上限导致。

3.4 测定结果分析

本次实验所测定的3批次药材,显示单批次药材含量测定的RSD均符合要求,且同一年度的2批药材各成分含量差别很小,但2013年和2014年不同年度的药材成分含量差别过大,因此而造成的药效差异是否显著尚不得而知,需要进一步结合药理实验,其原因可能为原药材选取时的含量差别造成,也可能是制剂工艺过程中造成。所以有必要对鳖甲煎丸的相关指标成分进行质量标准控制,建立一个有效的,安全的,可控的质量标准体系。

4 小结

鳖甲煎丸临床疗效确切,使用方便,迄今为止其质量控制主要是通过性状、理化鉴别,一般检查项及薄层色谱鉴别作为质量指标,难以全面评价其质量,本次实验发现不同批次药材3成分含量有所差别,有必要建立一个质量标准方法。本实验建立了一种流动相条件下同时测定鳖甲煎丸中芍药苷、黄芩苷、丹皮酚的含量,实现了简单、快速、便捷的目的,从而为全面控制鳖甲煎丸与药效相关物质基础成分及组分的质量提供了方法,可为其应用和质量标准控制提供依据和参考。

参考文献:

- [1] 曾凡波,晏菊姣,万波,等. 鳖甲煎丸药理学研究[J]. 中成药,2002,24(7):529-532.
- [2] 陈礼华,沈慧琴,陈巍,等. 鳖甲煎丸联合干扰素治疗慢性乙型肝炎肝纤维化[J]. 现代中西医结合杂志,2007,16(33):4931-4932.
- [3] 缪京翔. 鳖甲煎丸治疗24例乙肝后肝纤维化疗效观察

(下转第23页)

- [8] 黄慧学,谭珍媛,邓家刚,等. 人类肠道细菌群对芒果苷体外代谢转化的研究. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 443-444.
- [9] 李菲,丁忠涛,曹秋娥. 5 中大黄蒽醌类衍生物解离常数的测定[J]. 中国中药杂志, 2007, 3(2): 166-168.
- [10] 范晓燕,于媛,徐嫔. 酸碱指示剂解离常数的测定[J]. 实验室科学, 2007, 3(2): 89-90.
- [11] 徐雅贞,杨兆祥,张伟. 紫外分光光度法测定曲札芪苷的解离常数[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(3): 43-46.
- [12] 张伟,严娟娟,杨兆祥. pH 色谱法测定灯盏花乙素离解常数[J]. 云南大学学报, 2010, 32(2): 196-200.
- [13] 董国胜. 几种解离常数测定方法的比较与评价 [J]. 试验研究, 2010, 10(10): 42-44.
- [14] 晁若冰,伍朝贯,贺晓英. 弱酸弱碱性药物 pKa 值得分光光度测定法[J]. 华西药学杂志, 1990, 5(2): 104-106.
- [15] 朱海涛,陈少秀,蔡华,等. Origin 软件在药学研究数据作图中的应用[J]. 医药导报, 2008, 27(9): 1089-1091.
- [16] 何冀川,李松,罗英. 紫外分光光度法测定莽草酸的解离常数[J]. 绵阳师范学院学报, 2006, 25(5): 40-42.

(编辑: 杨阳)

Determination of Dissociation Constants of Norathyriol by UV Spectrophotometry

SONG Ya-lin¹, PU Jun-xue³, ZHANG Wei³, SONG Li-ming³, GAO Xiao-hui²

(1. Dali University, Kunming 671003, China; 2. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China; 3. Yunnan Mangtai Hyperuricemia and Gout Research Center, Kunming 650100, China)

ABSTRACT: Objective To determine dissociation constants of norathyriol by UV spectrophotometry. **Methods** Norathyriol was dissolved in phosphate buffer solution of different pH values, and the pKa values were calculated according to the measured absorbance of the solutions. **Results** The pKa value was found to be 6.72 which the point of inflection using mapping software fitting curves using wavelengths 253 and 315 nm for the determination respectively. **Conclusion** The dissociation constant of norathyriol was determined using ultraviolet spectrometry. It has important reference significance for the investigations of absorption, distribution, metabolism and excretion of the drug. This method is simple, rapid, accurate and reliable.

KEY WORDS: Norathyriol; dissociation constant; UV spectrophotometry

(上接第 19 页)

- [J]. 实用中西医结合临床, 2010, 10(2): 29-30.
- [4] 罗庆东,姜德友. 鳖甲煎丸的临床研究与进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(6): 764-766.
- [5] 李宝明,何丽一. 高效液相色谱法测定鳖甲煎胶囊中厚朴酚与和厚朴酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 1999(2): 117-119.
- [6] 张庆,马骏,辛俐华. 高效液相色谱法测定鳖甲煎丸中芍药苷和黄芩苷的含量 [J]. 医药导报, 2013, 32(3): 356-359.
- [7] 邵进明,雷战霞,王道平,等. 清胃散不同汤剂和颗粒剂中丹皮酚的含量变化分析 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(5): 156-158.
- [8] 李芳,戴跃玲,廖克俭. 微波辅助乙醇回流法提取黄芩苷 [J]. 辽宁化工, 2010, 39(1): 8-11.
- [9] 付起凤,孟凡佳,苗青,等. 牡丹皮中丹皮酚提取工艺的研究进展[J]. 中医药信息, 2010, 27(6): 108-109.
- [10] 牛鹏飞,仇农学. RP-HPLC 同时检测苹果汁中乳酸、富马酸、5-HMF 和展青霉素 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 1158-1164.

(编辑: 杨阳)

Detection of Multi-wavelength Determination in the Extract of Biejiajian Pills

SHENG Yun-jie, FU Ling-zhu, ZHeng Ting, QIN Lei, ZHANG Yong-sheng

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Objective To establish a HPLC method for the determinations of paeoniflorin, baicalin and paeonol in Biejiajian pills. **Methods** Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 column (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm), mobile phase of acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid (B). Gradient elution, flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength of 240nm and 274nm, the column temperature was 35 $^{\circ}$ C. **Results** The linearity ranges of paeoniflorin, baicalin and paeonol was 1.41 ~ 14.11 μ g/mL ($r^2=0.9999$), 7.03 ~ 70.32 μ g/mL ($r^2=0.9999$), 1.23 ~ 12.32 μ g/mL ($r^2=0.9997$) respectively. The average recoveries ($n=9$) were 100.84%, 99.07%, 99.08%. **Conclusion** The results showed that the method can be used to control quality of Biejiajian pills.

KEY WORDS: HPLC; Biejiajian pills; Paeoniflorin; Baicalin; Paeonol