

HPLC 测定复方昆丹胶囊中芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖

冯兵¹, 陈婷^{1,2}, 赵瑞芝^{1,2}, 王婷³, 彭辉¹, 杨海峰¹, 郑广娟^{1,2*}

(1. 广东省中医院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广州 510006;
3. 山东绿叶制药有限公司, 山东烟台 264003)

[摘要] 目的: 建立昆丹胶囊中芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖的含量测定方法。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-甲醇-0.1% 磷酸为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 芍药内酯苷、芍药苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷及五没食子酰葡萄糖浓度分别在 0.02~1.84, 0.03~1.65, 0.03~3.44, 0.01~0.81 mg(*r*>0.999 9) 线性关系良好。低、中、高 3 个浓度的平均加样回收率分别为 99.5%~102.6% (RSD 1.3%~2.1%), 98.5%~103.5% (RSD 0.5%~2.4%), 98.3%~104.2% (RSD 0.5%~2.2%)。结论: 方法准确, 灵敏, 能有效测定昆丹胶囊中芍药内酯苷、芍药苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷及五没食子酰葡萄糖成分的含量。

[关键词] 昆丹胶囊; 高效液相色谱; 芍药内酯苷; 芍药苷; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷; 五没食子酰葡萄糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0112-05

HPLC Analysis of the Composition of Albiflorin, Paeoniflorin, 2, 3, 5, 4'-Tetrahydro Xystilbene-2-O-β-D-Glucoside and Penta-O-Galloyl-β-D-Glucoside in Kundan Capsule

FENG Bing¹, CHEN Ting^{1,2}, ZHAO Rui-zhi^{1,2}, WANG Ting³,
PENG Hui¹, YANG Hai-feng¹, ZHENG Guang-juan^{1,2*}

(1. Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
3. Shandong Lvye Pharmaceutical Co. Ltd, Yantai 264003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of albiflorin, paeoniflorin, 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside and penta-O-galloyl-β-D-glucoside in Kundan Capsule. **Method:** The analysis was carried out on an Agilent TC-C₁₈ column (4.6 nm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile (A) -methanol (B) -0.1% phosphoric acid aqueous (C) with gradient elution; the detection wavelength was set at 230 nm; the column temperature was at 30 °C; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The calibration curves of albiflorin, paeoniflorin, 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside and penta-O-galloyl-β-D-glucoside were linear in the ranges of 0.02-1.84, 0.03-1.65, 0.03-3.44, 0.01-0.81 mg (*r*>0.999 9) respectively. The mean recoveries of low, middle and high concentration of the four

[收稿日期] 2011-12-07

[基金项目] 广东省科技厅重大项目(2009B080701024)

[第一作者] 冯兵, 硕士, 从事中西医结合治疗心脑血管疾病的研究, Tel:020-39318470, E-mail:bing19831@163.com

[通讯作者] * 郑广娟, 博士生导师, 教授, 从事中西医结合治疗心脑血管疾病和肿瘤转移研究, E-mail:zhengguangjuan@163.com

components were among 99.5% -102.6% (RSD 1.3% -2.1%), 98.5% -103.5% (RSD 0.5% -2.4%), 98.3% -104.2% (RSD 0.5% -2.2%). **Conclusion:** The method is accurate and sensitive, which can be used in the quality control of Kundan capsule.

[**Key words**] Kundan capsule; HPLC; albiflorin; paeoniflorin; 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -*D*-glucoside; penta-*O*-galloyl- β -*D*-glucoside

昆丹胶囊由白芍、制首乌等药物组成,具有降糖、降脂、降压、纠正代谢紊乱的功效。白芍中芍药苷能有效的降低血糖含量,具有抗心肌缺血作用^[1],对心血管疾病有一定的预防作用。制首乌中二苯乙烯苷对动脉粥样硬化^[2]和高脂血症^[3]有良好的防治作用。芍药内酯苷、芍药苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和五没食子酰葡萄糖在此方中含量较高,药效活性较为明确,本文建立高效液相色谱法对这几种成分进行含量测定,快速准确,可以为该制剂的质量控制提供依据。

1 仪器和试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪, Waters 2998PDA 检测器, METTLER AB135-S 型电子分析天平, BRANSON 8510 型超声清洗仪。

芍药内酯苷对照品(天津一方科技有限公司, 20100910), 芍药苷对照品(广州市药检所, 110736-201035), 二苯乙烯苷对照品(广州市药检所, 110844-200607), 五没食子酰葡萄糖对照品(Sigma 公司, 080M4745V), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯, 昆丹胶囊为实验室自制。

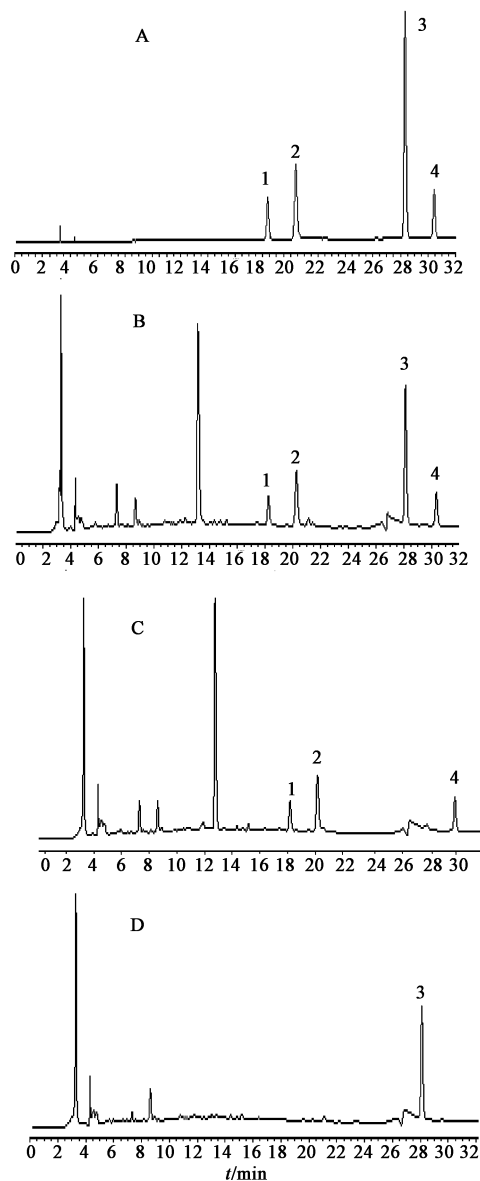
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 以乙腈(A)-甲醇(B)-0.1% 磷酸(C)为流动相, 进行梯度洗脱(0 ~ 7 min, 5% ~ 13% A, 95% ~ 83% C, 7 ~ 13 min, 13% ~ 16% A, 87% ~ 84% C, 13 ~ 21 min 16% ~ 17% A, 84% ~ 83% C, 21 ~ 22 min, 17% ~ 20% A, 83% ~ 80% C, 22 ~ 30 min, 20% A, 80% ~ 75% C, 30 ~ 40 min, 20% ~ 21% A, 75% ~ 76% C), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 230 nm。

2.2 溶剂的制备

2.2.1 混合对照品的制备 取芍药内酯苷对照品、芍药苷对照品、二苯乙烯苷对照品及五没食子酰葡萄糖对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加甲醇制成含芍药内酯苷对照品 0.040 6 g·L⁻¹、含芍药苷对照品 0.066 8 g·L⁻¹、含二苯乙烯苷对照品 0.082 1 g·mL⁻¹及含五没食子酰葡萄糖对照品 0.018 1 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品制备 取本品适量, 精密称取, 置 100 mL 平底烧瓶中, 加入 10 倍量的 75% 乙醇浸泡 1 h, 加热回流提取 1 h, 趁热过滤, 残渣加入 8 倍量的 75% 乙醇加热回流 1 h, 趁热过滤, 合并提取液, 定容至 100 mL 量瓶中。取 10 mL 75% 乙醇液, 水浴蒸干, 甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 并稀释至刻



A. 对照品; B. 样品; C. 缺何首乌阴性样品; D. 缺白芍阴性样品;
1. 芍药内酯苷; 2. 芍药苷; 3. 二苯乙烯苷; 4. 五没食子酰葡萄糖

图1 昆丹胶囊中对照品和样品 HPLC

度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按 2.2.2 项下方法制成分别缺制首乌和白芍的 2 份阴性样品溶液,在上述色谱条件下吸取 10 μL 进样。结果表明,阴性样品图谱中,在与样品图谱中 4 种被测成分相同位置上无峰出现,表明无阴性干扰。对照品、样品及阴性样品色谱图见图 1。

2.3 系统适应性溶液 分别吸取对照品溶液和供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件记录色谱图,结果芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖的保留时间分别为 18,20,28,30 min 左右,阴性对照样品对测定无干扰,色谱图见图 1,芍药内酯苷峰、芍药苷峰、二苯乙烯苷峰、五没食子酰葡萄糖峰与邻近峰达到基线分离,分离度良好($R > 1.5$)。

2.4 线性范围 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 μL 进样,以对照品进样量(μg)对峰面积进行线性回归。芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖回归方程分别为:

$$Y = 7.66 \times 10^{-5} X + 6.70 \times 10^{-2} (r = 0.9999)$$

$$Y = 1.88 \times 10^{-6} X - 1.63 \times 10^{-4} (r = 0.9999)$$

$$Y = 2.09 \times 10^{-6} X + 2.52 \times 10^{-4} (r = 0.9999)$$

$$Y = 2.02 \times 10^{-6} X + 7.49 \times 10^{-3} (r = 0.9999)$$

结果表明芍药内酯苷在 0.02 ~ 1.84 mg,芍药苷在 0.03 ~ 1.65 mg,二苯乙烯苷在 0.03 ~ 3.44 mg,五没食子酰葡萄糖在 0.01 ~ 0.81 mg 与峰面积

具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖和橙皮苷混合对照品 10 μL,连续进样 6 次,芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷和五没食子酰葡萄糖对照品 RSD($n = 6$)分别为 2.5%,0.4%,0.4%,0.4%,0.6%,0.8%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0,2,4,8,10,12 h 进样测定,结果芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷和五没食子酰葡萄糖峰面积的 RSD($n = 6$)分别为 2.3%,2.1%,2.6%,1.8%。表明供试品溶液中芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖和橙皮苷在 12 h 内均稳定。

2.7 重复性试验 取 6 份昆丹胶囊样品,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,依法测定,进样量为 10 μL,结果样品中芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷和五没食子酰葡萄糖平均质量分数分别为 0.71,0.64,1.30,0.35 mg·g⁻¹; RSD 分别为 1.5%,0.9%,2.3%,1.9%。

2.8 加样回收率试验 精密称定已知含量的样品适量,共 9 份,按对照品加入量为样品中相应成分含有量的 80%,100%,120% 分别精密加入芍药内酯苷对照品 1.90,2.37,2.84 mg,芍药苷对照品 1.73,2.16,2.59 mg,二苯乙烯苷对照品 3.56,4.45,5.34 mg,五没食子酰葡萄糖对照品 0.90,1.13,1.36 mg,各 3 份。按上述供试品溶液的制备方法制备,依法测定,计算加样回收率,见表 1。

表 1 加样回收率试验

样品	药材含量 /mg	1/2 药材含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	回收率平均值 /%	RSD/%
芍药内酯苷	4.74	2.37	1.90	4.18	95.5	99.5	1.3
	4.74	2.37	1.90	4.31	102.3		
	4.74	2.37	1.90	4.28	100.7		
	4.74	2.37	2.37	4.79	102.1		
	4.74	2.37	2.37	4.65	96.2	100.3	2.2
	4.74	2.37	2.37	4.67	97.0		
	4.74	2.37	2.84	5.18	98.8		
	4.74	2.37	2.84	5.14	97.4		
芍药苷	4.74	2.37	2.84	5.35	104.8	103.5	0.5
	4.32	2.16	1.73	3.90	100.7		
	4.32	2.16	1.73	3.95	103.6		
	4.32	2.16	1.73	3.95	103.6		
	4.32	2.16	2.16	4.40	103.7		
	4.32	2.16	2.16	4.37	102.3		

续表 1

样品	药材含量 /mg	1/2 药材含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	回收率平均值 /%	RSD/%
二苯乙烯苷	4.32	2.16	2.16	4.42	104.6		
	4.32	2.16	2.59	4.79	101.5	98.4	1.6
	4.32	2.16	2.59	4.70	98.0		
	4.32	2.16	2.59	4.64	95.7		
	8.9	4.45	3.56	7.94	98.0	101.6	1.4
	8.9	4.45	3.56	8.17	104.5		
	8.9	4.45	3.56	8.09	102.2		
	8.9	4.45	4.45	8.84	98.7	99.0	1.2
	8.9	4.45	4.45	8.96	101.3		
	8.9	4.45	4.45	8.76	96.9		
五没食子酰葡萄糖	8.9	4.45	5.34	9.93	102.6	102.6	1.3
	8.9	4.45	5.34	9.80	100.2		
	8.9	4.45	5.34	10.06	105.1		
	2.26	1.13	0.90	2.01	97.3	99.6	1.6
	2.26	1.13	0.90	2.01	97.3		
	2.26	1.13	0.90	2.07	104.0		
	2.26	1.13	1.13	2.21	95.6	101.2	2.4
	2.26	1.13	1.13	2.31	104.4		
	2.26	1.13	1.13	2.30	103.5		
	2.26	1.13	1.36	2.55	104.7	104.2	0.5
2.26	1.13	1.36	2.53	103.2			
2.26	1.13	1.36	2.55	104.7			

2.9 样品含量测定 取 3 个批号的样品,按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,结果见表 2。

含量计算公式:

$$\text{含量测定} = \frac{(A_{\text{样}} - b) \times V_{\text{样}} \times X}{a \times 10 \mu\text{L} \times M_{\text{样}}}$$

$A_{\text{样}}$: 供试品峰面积; $V_{\text{样}}$: 提取液总体积 mL; X : 稀释倍数; $M_{\text{样}}$: 供试品中药材取样量, 单位 g; a : 对照品回归曲线斜率; b : 对照品回归曲线截距。

表 2 样品测定结果

批号	芍药内酯苷		芍药苷		二苯乙烯苷		五没食子酰葡萄糖	
	质量浓度 /g·L ⁻¹	RSD /%	质量浓度 /g·L ⁻¹	RSD /%	质量浓度 /g·L ⁻¹	RSD /%	质量浓度 /g·L ⁻¹	RSD /%
100911	0.85	2.4	0.77	2.9	1.58	2.7	0.40	1.8
100915	0.84	1.5	0.76	1.8	1.59	1.4	0.42	2.3
100919	0.87	2.1	0.76	1.9	1.61	2.5	0.39	2.6

3 讨论

中药材和中药复方成分种类复杂, 研究中常会碰到同时测定多个成分且各成分的紫外吸收不同的

问题, 本文中采用 230 nm 为检测波长, 能够很好的兼顾复方中各类成分。

考察提取溶剂时, 分别采用乙醇、甲醇超声提取

HPLC 测定呈味核苷酸二钠中 IMP 和 GMP 的含量

李阳杰¹, 龚志强^{2*}, 黄敏²

(1. 郑州华信学院, 郑州 451100; 2. 广西中医学院赛恩斯新医药学院, 南宁 530222)

[摘要] 目的: 建立呈味核苷酸二钠的含量测定方法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(含 0.005 mol·L⁻¹ 四丁基溴化铵及 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾)(2:98), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温常温。结果: 5'-肌苷酸二钠(IMP)的线性范围为 0.50 ~ 4.00 μg($r=0.9999$), 平均加样回收率为 99.12% ($n=6$), RSD 0.56%; 5'-鸟苷酸二钠(GMP)的线性范围为 0.50 ~ 4.00 μg($r=0.9999$), 平均加样回收率 99.18% ($n=6$), RSD 0.45%。结论: 该方法灵敏度高、重复性好, 可用于呈味核苷酸二钠的含量检测。

[关键词] 高效液相色谱法; 5'-肌苷酸二钠; 5'-鸟苷酸二钠; 呈味核苷酸二钠

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0116-03

Determination of IMP and GMP in Flavor Nucleotides by HPLC

Li Yang-Jie¹, Gong Zhi-Qiang^{2*}, Huang Min²

(1. Zhengzhou Huaxin University, Zhengzhou 451100, China; 2. Faculty of Chinese Medical Science Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530222, China)

[Abstract] **Objective:** Establish a method of determination for flavor nucleotides. **Method:** Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was employed. Acetonitrile-water (containing 0.005 mol·L⁻¹ tetrabutyl ammonium bromide and 0.05 mol·L⁻¹ monobasic potassium phosphate) (2:98) was used as mobile phase, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Ultraviolet detection wave length was 250 nm. **Result:** The IMP (disodium inosinate) was linear in the concentration range of 0.50-4.00 μg ($r=0.9999$). The average recovery rate ($n=$

[收稿日期] 20110930(010)

[第一作者] 李阳杰, 硕士研究生, 从事药事管理学和药学质量控制研究

[通讯作者] * 龚志强, 硕士研究生, 从事药物化学及药学质量控制研究, E-mail: gong150645259@126.com

和水浴加热回流, 结果显示 75% 乙醇水浴加热回流提取可以将大多数成分提取出来, 且各成分含量较高, 故确定 75% 乙醇回流为提取方案。

实验表明, 流动相的组成和比例对样品峰的峰形和比例都有很大的影响, 甲醇-水, 甲醇-磷酸做流动相时, 峰形差, 分离差, 将甲醇换为乙腈后, 峰形和分离度都得到明显的改善, 其次流动相中不加酸峰会出现拖尾现象, 加入酸后可改善峰形, 在酸的选择上, 比较了相同浓度的甲酸、冰醋酸、和磷酸溶液, 发现加入甲酸和冰醋酸后, 基线噪音大且漂移严重, 而磷酸可降低基线噪音和漂移现象, 基线平稳, 故选用磷酸。研究中曾试过 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2% 的磷酸, 结果表明 0.1% 的磷酸效果最佳, 故确定

0.1% 磷酸作为流动相。

[参考文献]

- [1] 王晓明, 李付彪, 吕文伟, 等. 白芍总苷对犬急性心肌缺血的保护作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2006, 32(3): 393.
- [2] 徐承水, 王文房. 何首乌提取物对大鼠血脂水平的影响[J]. 曲阜师范大学学报: 自然科学版, 2004, 30(3): 85.
- [3] Chart Y C, Cheng F C, Wang M F. Beneficial effects of different *Polygonum multi-florum* Thunb. extracts on memory and hippocampus morphology [J]. J Nutr Sci Vita-minol(Tokyo), 2002, 48(6): 491.

[责任编辑 蔡仲德]