

HPLC 法测定冠脉康片中芍药苷的含量

高春晖 方 艳

(安康北医大制药股份有限公司, 陕西 安康 725000)

摘 要: 目的 建立冠脉康片质量标准的含量测定法。方法 采用 Welchrom - C18(5 μm 4.6 \times 250 mm) 色谱柱, 以甲醇 - 水(30:70)为流动相 检测波长为 230nm 流速 1 mL \cdot min⁻¹。结果 在此色谱条件下 超声提取 15 min 能较完全地提取冠脉康片中的芍药苷。芍药苷在 9.5 ~ 152 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内 峰面积与浓度呈良好的线性关系($r = 0.9999$) 回收率均值为 98.43% RSD < 2.0%。结论 按上述条件 采用 HPLC 法测定冠脉康片芍药苷的含量 方法简便、专属强, 能较好的控制冠脉康片质量。

关键词: 高效液相色谱法; 冠脉康片; 芍药苷; 含量测定

中图分类号: R 284 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 168X(2010)00 - 0085 - 03

冠脉康片由三七、赤芍、佛手、泽泻、甘草等组成, 能活血化瘀, 理气止痛, 具有扩张冠状血管, 增加血流量等药理作用, 用于冠心病的胸闷和心绞痛, 对高胆固醇血症和高甘油三酯血症亦有一定疗效。在原质量标准中, 未建立含量测定方法^[1], 因此提高质量标准, 建立含量测定非常必要。芍药苷为处方中赤芍的有效成分, 因此, 选芍药苷为测定对象, 建立 HPLC 的测定方法^[2]。

1 材料

1.1 试药与试剂 冠脉康片, 安康北医大制药股份有限公司生产, 批号 20101101、20101102、20101103。芍药苷对照品, 由中国药品生物制品检定所提供, 批号 0736 - 9912。所用试剂除高效液相用甲醇为色谱醇外, 其他均为分析纯。

1.2 主要仪器设备 LC2000 型高效液相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司); LC2000 色谱工作站; Welchrom - C18(5 μm 4.6 \times 250 mm) 色谱柱; SJ5200 超声波清洗机(上海洁净超声波设备厂); TG332A 型分析天平(上海天平仪器厂); TG328A 型分析天平(上海天平仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welchrom - C18(5 μm 4.6 \times 250 mm) 色谱柱, 填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶; 甲醇 - 水(30:70)为流动相; 检测波长 230 nm 流速 1 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 系统适用性试验 色谱柱的理论板数(n)按芍药苷峰计算应不低于 3×10^3 , 分离度(R)大于 1.5, 重复性及拖尾因子(T)应符合 2010 年版中国药典的相关规定。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 36 小时的芍药苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.038 mg 的溶液, 即得。

2.4 供试品溶液的制备 取本品 10 片, 精密称定, 研细, 取粉末约 0.3 g, 精密称定, 置 25 mL 容量

瓶中, 精密加甲醇至刻度, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 Hz) 15 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 上清液用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 再精密吸取 5 mL 续滤液, 精密加甲醇至 25 mL, 即得。

2.5 最大吸收波长的选择 对照品溶液的制备(贮备液): 精密称取经五氧化二磷减压干燥 36 h 的芍药苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.152 mg 的溶液, 即得; 光谱扫描条件, 狭缝: 2 nm。扫描范围: 200 ~ 300 nm。芍药苷对照品溶液的在 230 nm 处有最大吸收, 故用 230 nm 作为本品的测定波长。

2.6 提取完全性考察 取本品 10 片, 精密称定, 研细, 精密称取粉末约 0.3 g, 共取 3 份, 分别置 25 mL 容量瓶中, 精密加甲醇至刻度, 称定重量, 分别超声(功率 250 W, 频率 50 Hz) 处理 10、15、20 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 上清液用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 再精密吸取 5 mL 续滤液, 精密加甲醇至 25 mL, 即得。分别进样 20 μL 测定, 结果见表 1。

表 1 不同提取时间对芍药苷含量的影响

提取时间(min)	芍药苷的含量(mg/片)
10	1.89
15	2.27
20	2.30

结果表明, 通过超声提取, 15 min 就较完全的提取出样品中的芍药苷。

2.7 干扰性考察 制备对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液, 分别吸取 20 μL , 进样, 测定。图谱表明, 在对照品溶液、供试品溶液的主峰(芍药苷)位置, 阴性对照无峰出现。故阴性对照无干扰。

2.8 线性考察 取贮备液, 加甲醇制成不同浓度梯度溶液, 作为对照品溶液, 浓度分别为

152 μg/mL、76 μg/mL、38 μg/mL、19 μg/mL、9.5 μg/mL。精密吸取不同浓度对照品溶液 20 μL 进样测定,以芍药苷的浓度作为横坐标(X),以芍药

苷峰面积积分值作为纵坐标(Y),绘制标准曲线,并对所测得的数据进行回归分析,结果见表2。

表2 芍药苷对照品线性考察结果

进样量(X)	9.5	19	38	76	152
峰面积积分值(Y)	286790	583920	1161612	2295615	4550733
回归方程	Y = 29874.06X + 16151.80				
r	0.9999				

结果表明,芍药苷在 9.5 ~ 152 μg/mL 范围,呈良好的线性关系。

2.9 稳定性试验 取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,每隔 2 小时进样一次,共 5 次,测定,结果见表3。

表3 供试品溶液的稳定性试验结果

进样时间(h)	对照品峰面积	供试品峰面积
0	1148059	569890
2	1140612	572971
4	1137993	554053
6	1122267	565649
8	1129407	578962
平均值	1135668	568305
RSD(%)	0.89	1.64

结果表明,对照品和供试品溶液均在 8 h 内稳定,RSD 分别为 0.89 % 和 1.64 %。

2.10 精密度试验 取批号为 20101101 样品制备供试品溶液,连续进样 5 次,测定,结果见表4。

表4 精密度试验结果

试验号	1	2	3	4	5
峰面积	566981	567667	565257	564693	567815
平均值	566483				
RSD(%)	0.26				

结果表明,样品芍药苷含量测定精密度良好,

表6 回收率试验结果

编号	样品中芍药苷的量(mg)	芍药苷加入量(mg)	测得芍药苷总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1.151	0.98	2.1091	97.76	98.43	1.52
2	1.151	0.97	2.1043	98.25		
3	1.135	1.15	2.2440	96.46		
4	1.135	1.11	2.2470	100.17		
5	1.130	1.49	2.6241	100.24		
6	1.130	1.52	2.6152	97.71		

2.13 样品的含量测定

2.13.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 36 h 的芍药苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.038 mg 的溶液,即得。

2.13.2 供试品溶液的制备 20101101、20101102、20101103 每批各取 10 片,精密称定,研细,取粉末约 0.3 g,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,精密加甲醇至刻度,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 50 Hz) 15 min,取出,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,静置,上清液用微孔滤

RSD = 0.26 %。

2.11 重复性试验 取同一批号样品五份,按制备供试品溶液的方法制备供试品溶液,进样测定,计算,结果见表5,RSD = 1.35 %。

表5 重复性试验结果

进样号	1	2	3	4	5
芍药苷的含量	2.31	2.27	2.24	2.26	2.35
平均含量	2.27				
RSD(%)	1.37				

结果表明,同一批样品中芍药苷含量测定重现性良好,RSD = 1.37 %。

2.12 回收率试验 取同一批样品约 0.3 g,精密称定五份,分别加入芍药苷对照品适量,照供试品溶液的制备的方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,按下列公式计算回收率,结果见表6。

膜(0.45 μm)滤过,再精密吸取 5 mL 续滤液,精密加甲醇至 25 mL,即得。

2.13.3 测定 分别取对照品溶液和供试品溶液 20 μL,进样测定,结果见表7。

表7 样品中芍药苷的含量测定

样品号	芍药苷含量(mg/片)
20100401	2.29
20100402	2.31
20100403	2.38

结果表明,拟订方法可行、可控。

3 讨论

冠脉康片由三七、赤芍、佛手、泽泻、甘草等组成,赤芍中的芍药苷具有扩张血管、抑制血小板聚集和抗心肌缺血等药理作用,是冠脉康片主要有效成分之一,故作为冠脉康片含量测定指标。

本文采用 HPLC 法测定了冠脉康中的芍药苷含量,并对方法学进行了系统研究^{[3][4][5]},结果线性范围 9.5 ~ 152 μg/mL,相关系数 r = 0.9999;稳定性试验结果表明,本品在 8 h 内稳定,对照品与样品的 RSD 分别为 0.89 % 和 1.64 %。5 次重复性试验的相对标准偏差 RSD = 1.37 %。6 次试验的平均回收率为 98.43 %,相对标准偏差 RSD = 1.52 %。在实际生产中,用于冠脉康片的质量控

制表明,该方法能满足质量分析的需要。该方法准确、简便、专属,能有效控制冠脉康片质量。

参考文献

- [1] 卫生部. 国家中成药标准汇编·冠脉康片质量标准.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社 2010.
- [3] 姚仲青, 朱虹, 姚海峰. 温度及 pH 值对赤芍总苷稳定性的影响[J]. 时珍国医国药. 2006, 17(7): 1214 - 1215.
- [4] 水文波. 高效液相色谱-质谱联用法研究芍药苷的大鼠小肠吸收[J]. 中国药理学杂志. 2007, 42(14): 1098 - 1101.
- [5] 凌宁生, 孙婕, 李林. 白芍中芍药苷测定方法的比较[M]. 中草药. 2004: 1372 - 1373.

(收稿日期: 2012-00-00)

(上接第 81 页)

的制备方法制备,平行 6 份,结果均值为 3.0022 mg/g, RSD 为 1.12 %,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的供试品,精密称取 6 份,每份约 0.25 g,分别精密加入绿原酸

对照品溶液(39.76 μg/mL) 20 mL,按供试品溶液同法制备,测定含量,平均回收率为 100.36 %, RSD 为 1.79 %,表明该方法回收率较好。结果见表 1。

表 1 绿原酸回收率测定结果

取样量(g)	样品中绿原酸含量(mg)	加入量绿原酸(mg)	测得量绿原酸(mg)	回收率%	平均回收率%	RSD%
0.2535	0.7611	0.7952	1.5600	100.46	100.36	1.79
0.2508	0.7530	0.7952	1.5485	100.04		
0.2512	0.7542	0.7952	1.5708	102.69		
0.2496	0.7493	0.7952	1.5605	102.01		
0.2500	0.7506	0.7952	1.5289	97.87		
0.2505	0.7521	0.7952	1.5402	99.11		

2.9 样品测定 对 6 批样品进行 2.2 项下的方法测定含量,结果见表 2。

表 2 样品测定结果

批号	含量(mg/g)
1	3.5679
2	2.8765
3	3.0986
4	4.1105
5	3.1243
6	2.6902

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 曾尝试乙腈-0.4 % 磷酸溶液、甲醇-0.4 % 磷酸溶液、甲醇-水-冰醋酸作流动相,结果乙腈-0.4 % 磷酸溶液做流动相分离效果好且峰形较好。

3.2 提取方法的选择 本实验比较了不同提取法

(超声、回流、索氏提取)以及提取时间(20、30、60 min)对药材提取的影响,结果发现提取时间 30 min 以后随时间延长,目标成分含量几乎没有变化。本实验还考察了 50 %、70 % 的甲醇两种溶剂的提取效果,最终确定以 50 % 的甲醇,超声 30 min 作为药材的提取方法。

参考文献

- [1] 李世全. 秦岭巴山天然药物志[M]. 西安: 陕西科学技术出版社. 1987: 22.
- [2] 陕西省生产力促进中心. 陕西中药现代化[M]. 陕西科学技术出版社. 2007: 191.
- [3] 刘文斌, 何振辉, 宾漫容. 中药白芍的 HPLC 含量测定及指纹图谱研究[J]. 光谱实验室, 2010, 7(2): 695 - 697.
- [4] 石丽, 杨海燕, 张成. 蝎子七的质量控制方法研究[J]. 药物分析杂志. 2005, 25(11): 1343 - 1345.

(收稿日期: 2012-01-08)