维普资讯 http://www.cqvip.com

技术与方法 文章编号:0253-3626(2007)03-0268-03

RP-HPLC 法同时测定清胰汤颗粒中栀子苷、芍药苷的含量

周 卿[1,2],兑丹华[3],代广会[1],尚京川[1]

(1.重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016;2.贵州遵义医学院药学系;
3.贵州遵义医学院附属医院肝胆胰外科,遵义 贵州 563003)

【摘 要】目的:建立清胰汤颗粒中栀子苷和芍药苷含量的 RP-HPLC 测定方法。方法:Angilent Eclipse XDB-C18 柱(4.5×150mm,5μm),流动相:乙腈-0.1%磷酸(12∶88,V/V),流速:1ml/min,检测波长:230nm,柱温:30℃。结果:栀子苷和芍药苷得到完全分离,两种成分线性关系良好。栀子苷高、中、低 3 个浓度平均加样回收率(n=3)分别为 106.2%,97.5%,98.1%,RSD 分别为 0.96%,1.23%,1.62%;芍药苷高、中、低 3 个浓度平均加样回收率(n=3)分别为 101.3%,99.5%,98.2%,RSD 分别为 1.19%,1.33%,1.58%。结论:本法操作简便,重复性好,结果准确可靠。

【关键词】RP-HPLC;清胰汤颗粒;栀子苷;芍药苷;含量测定
【中国图书分类法分类号】R927.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-18

Simultaneous determination of jasminoidin and paeoniflorin in Qiyitang granules by RP-HPLC

ZHOU Qing, et al

(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method for the determination of jasminoidin and paeoniflorin in Qiyitang Granules. *Methods*: The analytical column was a Agilent Eclipse XDB-C18 column (4.5×150mm,5μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1%H3PO4 (12:88,V/V), flow rate was 1.0ml/min. The detection wavelength was 230 nm. *Rusults*: Jasminoidin and paeoniflorin were separated utterly and the linear correlation was good. The average recoveries of high, middle and low concentration of jasminoidin were 106.2%, 97.5% and 98.1% respectively with RSD of 0.96%, 1.23% and 1.62% (n=3) respectively. The average recoveries from paeoniflorin were 101.3%, 99.5% and 98.2% respectively with RSD being 1.19%, 1.33% and 1.58% (n=3), respectively. *Conclusions*: The method is simple, reproducible, accurate and reliable. It may be used for the quality control of this granules.

【Key words】HPLC; Qingyitang granules; Jasminoidin; Paeoniflorin; Determination

清胰汤由栀子、芍药、大黄、丹皮、芒硝等八味中药加工为汤剂而成,具有疏肝利胆,清热泻下、行气化瘀,降逆护胃,缓急止痛的作用。主要用于重症急性胰腺炎(SAP)的治疗,该药经多年临床疗效显著。本课题对其进行了剂改研究,经药理实验及临床研究表明,剂型改为颗粒剂后,既能保证疗效,又便于病人服用,为临床用药提供了方便。组方中栀子、芍药具有清热解毒,抗炎镇痛之功效,其主要成分为栀子苷和芍药苷[1],可作为该制剂的质量控制标准,本实验采用 RP-HPLC 法对栀子苷和芍药苷的含量进行同时测定,为该制剂的质量控制提供了快速、准确、可靠的方法。

1 仪器与试药

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪、UV 检测器及色谱数据处理系统;KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);栀子苷和芍药苷对照品(批号 110749-200511,110736-200424,中国药品生物制品检定所)、清胰汤颗粒(遵义医学院附属医院制剂室);乙腈(色谱纯,天津市四友生物医学技术有限公司);重蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:美国 Agilent Eclipse XDB-C18 柱(4.5×150 mm,5μm)色谱柱;流动相:乙腈-0.1%磷酸(12:88,V/V);流速:1ml/min;检测波长:230 nm;柱温:30℃;进样量 10μl。在上述色谱条件下,

作者介绍:周 卿(1978-),女,讲师,硕士,
主要研究方向:天然产物及体内药物分析。

基金项目:贵州省科技厅中医药现代化资助项目(2003-13)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

分别取对照品混合溶液和样品溶液以及阴性样品溶液进样，所得色谱图见图 1。栀子苷和芍药苷与相邻其他组分峰分离完全，分离度大于 3；理论板数均大于 3000；保留时间分别为 5.6min 和 9.8min。

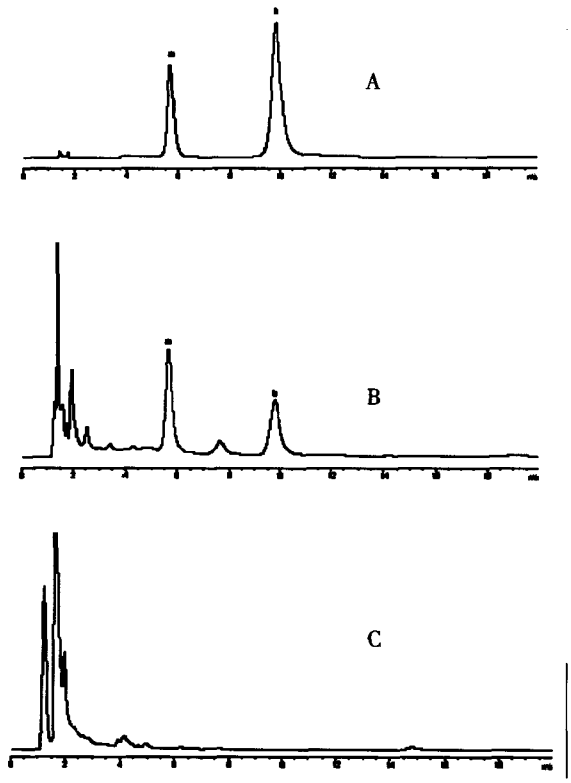


图 1 对照品(A)、样品(B)、阴性样品(C)的 HPLC 色谱图
a 栀子苷　　b 芍药苷

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备　精密称取栀子苷和芍药苷的对照品各 10mg，分别置于 10ml 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得浓度为 1mg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 对照品混合溶液的制备　取上述栀子苷和芍药苷对照品溶液各 200μl。置于 2ml 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得浓度为 100μg/ml 的对照品混合溶液。

2.2.3 样品溶液的制备　取清胰汤颗粒适量，研细，精密称取该药细粉约 2g，置 50ml 量瓶中，加甲醇 40ml，称定质量。在水浴中超声 30min，放置室温，用甲醇补足失去重量，摇匀，经 0.45μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备　按处方比例制备缺栀子苷和芍药苷药材的阴性样品，依“2.2.3”项下制备阴性样品溶液。

2.3 线性关系

分别精密吸取上述栀子苷对照品溶液 120，180，240，300，360，400μl，芍药苷对照品溶液 100，120，140，160，180，200μl，置于同一 2ml 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得每 1ml 含栀子苷 60，90，120，150，180，200μg，含芍药苷 50，60，70，80，90，100μg 的对照品混合溶液。各取 10μl 进样，以上述色谱条件进行测定。以峰面积(Y)与对照品浓度(X)进行线性回归，得栀子苷和芍药苷回归方程分别为：

栀子苷：$Y = 9.1842X - 101.96$，$r=0.9998$

芍药苷：$Y = 24.667X - 319.81$，$r=0.9990$

结果表明，栀子苷在 60~200μg/ml，芍药苷在 50~100μg/ml 范围内，与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.2”项下对照品混合溶液进样 10μl，重复 5 次，栀子苷、芍药苷峰面积积分值的 RSD 值分别为 0.71%和 0.71%($n=5$)。

2.5 重复性试验

取同一批号(050203)清胰汤颗粒 5 份，每份约 2.0g，按“2.2.3”项下方法制备样品溶液，以上述色谱条件测定，计算含量，RSD 分别为 0.76%和 1.04%。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一批号(050203)的样品溶液，分别于 0，2，4，6，8，10 h 进样 1 次，测定含量，结果表明在 10h 内栀子苷、芍药苷含量无明显变化。RSD 值分别为 0.94%和 1.01%。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量（栀子苷 2.50mg/g，芍药苷 1.22 mg/g)清胰汤颗粒 9 份，每份 0.10g，置 50ml 量瓶中，分别精密加入栀子苷对照品溶液 300，250，200μl，芍药苷对照品溶液 144，120，96μl，按“2.2.3”项下方法样制成所需溶液，进样测定含量，计算回收率，得栀子苷高、中、低 3 个浓度平均加样回收率分别为 106.2%，97.5%，98.1%，RSD 值分别为 0.96%，1.23%，1.62%；芍药苷高、中、低 3 个浓度平均加样回收率分别为 101.3%，99.5%，98.2%($n=3$)，RSD 值分别为 1.19%，1.33%，1.58%($n=3$)。

2.8 样品含量测定

精密吸取同一批号的 3 份样品溶液及“2.2.2”项下对照品混合溶液，按上述色谱条件，分别进样 10μl，按外标法计算含量，结果见表 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 清胰汤颗粒中栀子苷和芍药苷含量测定结果(n=3)

批号	栀子苷		芍药苷	
	$\bar{x}$(mg/g)	RSD(%)	$\bar{x}$ (mg/g)	RSD(%)
050203	2.50	2.20	1.22	1.23
050204	2.38	2.78	1.18	1.41
050205	2.92	1.86	1.61	2.90

3 讨 论

3.1 检测波长的选择

栀子苷与芍药苷的最大吸收波长分别为238nm[2]及 230nm[3],为确保检测灵敏度,取"2.2.3"项下样品溶液于不同波长下进样分析,结果在波长为230nm 下,两者的检测灵敏度均较好,峰面积值变化较小。故本实验选用 230nm 作为检测波长,同时测定两种组分的含量。

3.2 提取条件的选择

本实验曾分别采用 50%,80%,100%甲醇作为提取溶剂,超声提取法进行试验,结果认为以 100%甲醇作为提取溶剂,超声 30min 即可较好去除干扰杂质,所得栀子苷和芍药苷的含量最大,提取较完全,效果最佳。

3.3 流动相的选择

本实验曾比较了多种流动相系统,比较两组分的保留时间与分离度,结果乙腈 -0.1%磷酸(12:88)以及甲醇 -0.1%磷酸(15:85)的分离效果较好,但前者的稳定性、峰形均较好。故选择乙腈 -0.1%磷酸作为本实验的流动相。

本文建立了同时测定清胰汤颗粒中栀子苷和芍药苷含量的方法, 在 10min 内两组分可完全分离,大大缩短检测时间,且实验结果表明本法简便,准确,灵敏度高,重现性好,阴性样品对照无干扰,可作为该药品质量控制的标准。

(通讯作者:尚京川,男,副教授,硕士生导师,主要研究方向:药物分析。Tel:023-86880938)

参 考 文 献

[1] 中国药典[M].一部,2005.

[2] 冉桂梅,杨 凌,张才华,等.高效液相色谱法测定新雪颗粒中栀子苷的含量[J].色谱,2004;22(6):639-640.

[3] 张孝法.HPLC 法测定逍遥软胶囊中芍药苷的含量 [J]. 中草药,2004;35(10):1137.

(上接第 267 页)

vivin、$P16^{INK4a}$ 的表达状态对非小细胞肺癌的诊断和预后有一定的参考价值,survivin 和 $P16^{INK4a}$ 可能会成为非小细胞肺癌的一个重要诊断指标和治疗靶点。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G,Adida C,Altieri DC.A novel anti-apoptosis gene, survivin,expressed in Cancer and Lymphoma[J].Nat Med,1997;3(8):917-921.

[2] Mesri M,Morales-Ruiz M,Ackermann EJ,et al.Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting[J].Am J Pathol,2001;158(5):1757-1765.

[3] Serrano M,Hannon GL,Beach D.A new regulatory motify in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4[J].Nature,1993;366(6456):704-707.

[4] Monzo-M,Rosell-R,Felip-E,et al.A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as aprognosis marker in non-small-cell lung cancers[J].J-Clin-Oncol,1999;17(7):2100-2104.

[5] Sarela AI,Macadam RCA,Farmery SM,et al.Expression of the antiapoptosis gene,survivin,predicts death from recurrent colorectal carcinomal[J].Gut,2000;46:645-650.

[6] Vischioni B,van der Valk P,Span SW,et al.Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small-cell lung cancer[J].Ann Oncol,2004;15(11):1654-1660.

[7] Lu B,Gonzalez A,Massion PP,et al.Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer[J].Br J Cancer,2004;91(3):537-540.

[8] Gessner C,Liebers U,KuhnH,et al.BAX and P16INK4a are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of nonsmall cell lung cancer[J].Eur Respir J,2002;19(1):134.

[9] Kim DM,Nesson HH,Wienike JK,et al.p16(INK4a)and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer[J].Cancer Res,2001;61(8):3419-3424.

[10] Belinsky SA,Palmisano WA,Gilliland FD,et al.Aberrant promoter methlation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers[J].Cancer Res,2002;62(8):2370-2377.

[11] Li F,Ackermann EJ,Bennett CF,et al.Pleiotropic cell division defects and apoptosis induced by interference with survivin function [J].Nat Cell Biol,1999;1(8):461-466.

[12] Suzuki A,Hayashida M,Ito T,et al.Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 (INK4a)and Cdk2/cyclin E complex activation[J].Oncogene,2000;19(29):3225-3234.