

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.10.11

高效液相色谱法测定刺五加甘草颗粒中紫丁香苷的含量

姚路路¹, 张聪¹, 潘贵珍¹, 周德刚¹, 田晓龙², 张晓会¹

(1. 洛阳惠中兽药有限公司, 洛阳 471000; 2. 普莱柯生物工程股份有限公司, 洛阳 471000)

[收稿日期] 2018-06-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 10-0078-05 [中图分类号] S853.7

[摘要] 建立并验证了刺五加甘草颗粒中紫丁香苷含量的测定方法。采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水梯度洗脱; 检测波长为 265 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃。试验结果表明紫丁香苷进样浓度在 0.01218 ~ 0.08120 mg/mL 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 加样回收率在 96.46% ~ 99.53% 之间, 平均回收率为 98.4% ($n=6$), RSD 为 1.2%。试验建立的方法简便、准确度高、专属性强, 可用于刺五加甘草颗粒中紫丁香苷含量的测定。

[关键词] 刺五加; 紫丁香苷; 高效液相色谱法; 含量; 甘草

Determination of Syringin in Acanthopanax Glycyrrhiza Granules by HPLC

YAO Lu-lu¹, ZHANG Cong¹, PAN Gui-zhen¹, ZHOU De-gang¹, TIAN Xiao-long², ZHANG Xiao-hui¹

(1. Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd, Luoyang 471000, China; 2. Pulike Biological Engineering Co., Ltd, Luoyang 471000, China)

Abstract: The method for determination of the content of syringin in Acanthopanax Glycyrrhiza granules by HPLC was developed and validated. The analysis was performed on an Agilent Zorbax SB-C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The gradient mobile phase was consisted of acetonitrile-water, and the detection wavelength was 265 nm. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 30 ℃. The linear range of the calibration curves for syringin was 0.01218~0.08120 mg/mL ($r=0.9999$), and the average recovery was 98.4% ($n=6$) with RSD of 1.2%. The method is simple and accurate with high specificity, which can be used to determine the content of syringin in Acanthopanax Glycyrrhiza granules.

Key words: Acanthopanax; syringin; HPLC; content; Glycyrrhiza

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎, 具有抗炎、提高机体免疫力、抗病毒、抗过敏等功效, 刺五加多糖对鸡免疫功能具有显著的增强作

用, 其中紫丁香苷是刺五加的重要活性成分^[1-2]。甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 为豆科植物甘草属的干燥根和根茎, 甘草中的甘草酸具有抗炎、抗过敏、免疫调节、抗病毒等多种生物活性^[3-4], 总黄

酮有抗慢性不可预知应激抑郁作用^[5],多糖具有调节机体免疫等作用^[6]。

刺五加甘草颗粒是由刺五加和甘草两味药材组成,采用水提醇沉法,上清液减压浓缩后,加入适量的辅料,制粒即得,可提高畜禽免疫力,用于鸡传染性支气管炎的治疗。

紫丁香苷作为刺五加的重要活性控制指标,文献中报道的刺五加中紫丁香苷含量测定主要为刺五加药材或刺五加单方制剂中紫丁香苷的含量测定^[7-13],对刺五加甘草颗粒中紫丁香苷的含量测定方法进行了相关研究,建立了刺五加甘草颗粒中紫丁香苷含量的高效液相色谱测定方法,可为刺五加甘草颗粒质量标准的建立提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 Waters e2695 高效液相色谱仪,配 2489 型紫外检测器,美国 Waters 公司;KQ-500 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司,AB135-S 型电子分析天平,瑞士梅特勒托利多公司;乙腈, HPLC 级, MERK 公司;水为超纯水。

1.2 试剂 紫丁香苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111574-200603,含量:100%)、刺五加甘草颗粒(洛阳惠中兽药有限公司,批号:20170801,20170802,20170803,规格:每 100 g 相当于原生药 160 g)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18(250 × 4.6 mm, 5 μm);梯度洗脱,流动相:乙腈-水(0-7 min,乙腈 11%;7-8 min,乙腈由 11%上升到 40%;8-13 min,乙腈 40%;13-14 min,乙腈由 40%下降到 11%;14-20 min,乙腈 11%),流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:265 nm;进样量:10 μL。理论板数按紫丁香苷峰计算应不低于 5000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 取紫丁香苷对照品适量,精密称定,加甲醇制溶解制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密吸取对照品贮备

液 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品,研细,称取粉末约 1.5 g,精密称定,置小烧杯中,用 50% 甲醇 20 mL,分次溶解,转移至 25 mL 量瓶中,超声处理(功率 250 W,频率 50k Hz)30 min,取出,放冷,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方制备缺刺五加的阴性对照样品,按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液,

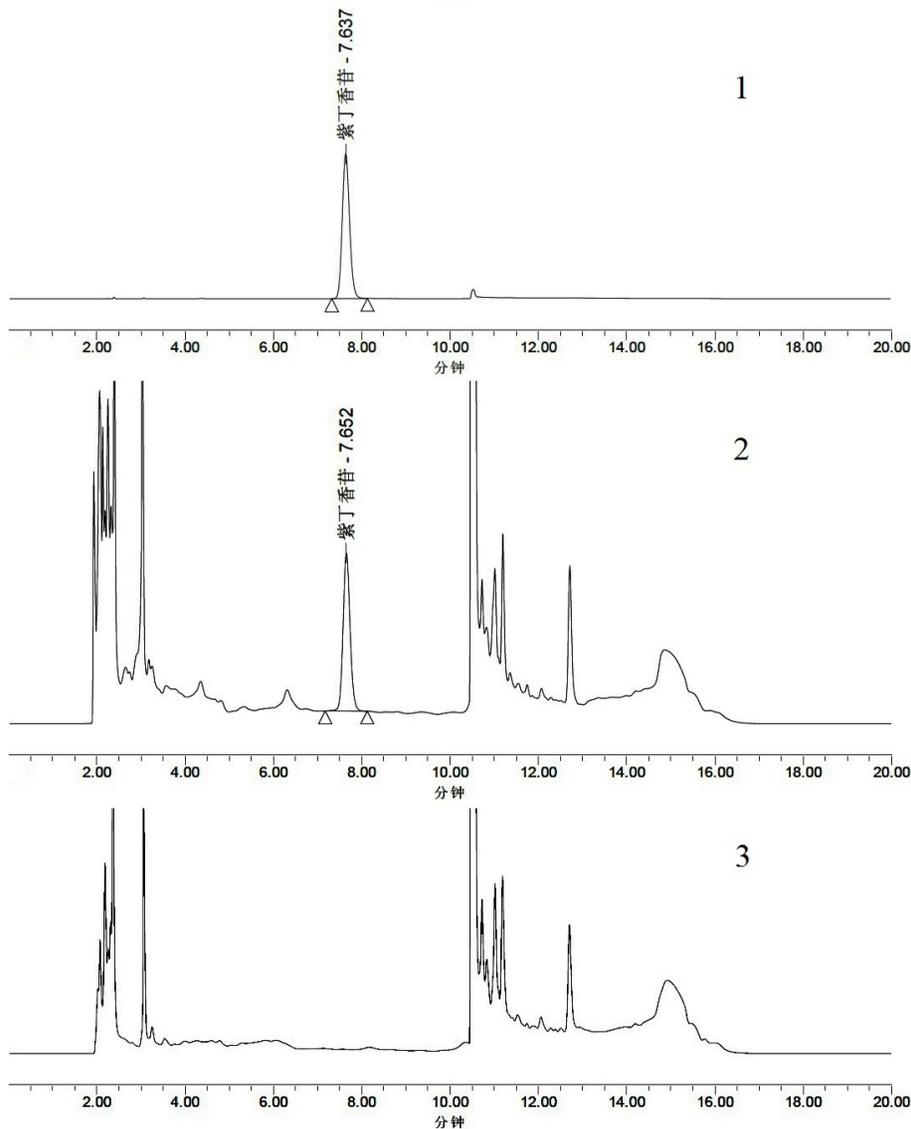
2.3 专属性试验 分别取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图(图 1)。从图中可见,供试品溶液在与对照品色谱中紫丁香苷相应的位置上,有相同保留时间的色谱峰,阴性对照在紫丁香苷相应保留时间处无干扰峰。

2.4 线性试验 取“2.2.1”项下对照品贮备液,分别精密量取对照品贮备液适量,加甲醇稀释,制得浓度为 0.01218,0.02030,0.04060,0.06090,0.08120 mg/mL 的一系列溶液,分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以进样浓度(C,mg/mL)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $A = 3 \times 10^7 C - 13800$, $r = 0.9999$ 。表明紫丁香苷进样量在 0.01218 ~ 0.08120 mg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取对照品溶液(0.04060 mg/mL),精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,连续进样 6 针,记录峰面积,结果 RSD 为 0.1%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取刺五加甘草颗粒(批号:20170801),按照“2.2.3”项制备供试品溶液,分别制备 6 份,精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积,结果 RSD 为 0.9%,表明方法重复性良好。

2.7 溶液稳定性试验 取刺五加甘草颗粒(批号:20170801),按照“2.2.3”项制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定峰面积,结果 RSD 为 0.6%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。



1. 紫丁香苷对照品 2. 供试品 3. 阴性对照

1. Reference Substance of Syringin 2. Test sample 3. negative control

图 1 专属性考察色谱图

Fig 1 The chromatogram of Specific inspection

2.8 加样回收率试验 取已知含量的刺五加甘草颗粒样品 6 份(批号:20170801,紫丁香苷含量:0.738mg/g),每份约 0.8 g,精密称定,置小烧杯中,各精密加入 0.1015 mg/mL 的紫丁香苷对照品溶液 5 mL,按照“2.2.3”项制备供试品溶液,按含量测定方法操作,精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,测定样品含量并计算回收率,结果见表 1,加样回收率在 96.46% ~ 99.53% 之间,平均值为 98.4%,RSD 为 1.2%,表明方法准确度良好。

2.9 耐用性试验 取刺五加甘草颗粒(批号:20170801),按照“2.2.3”项制备供试品溶液,当柱温、流速发生微小变化以及使用不同型号的色谱柱,分别测定样品的峰面积,精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见表 2。结果表明,当柱温、流速发生微小变化以及使用其他型号的色谱柱时,对含量测定结果基本无影响,表明方法耐用性良好。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 The results of recovery test

编号	样品称量/g	紫丁香苷含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得总量/mg	回收率/%	均值/%	RSD/%
1	0.84243	0.6218	0.5075	1.1269	99.53		
2	0.78348	0.5783	0.5075	1.0820	99.27		
3	0.78767	0.5813	0.5075	1.0840	99.04		
4	0.75158	0.5547	0.5075	1.0443	96.46	98.4	1.2
5	0.78263	0.5776	0.5075	1.0786	98.71		
6	0.75304	0.5558	0.5075	1.0499	97.35		

表 2 耐用性试验结果

Tab 2 The results of durability test

变化项目	变化情况	含量/(mg · g ⁻¹)
柱温/°C	25	0.741
	30	0.738
	35	0.739
流速/(mL · min ⁻¹)	0.8	0.742
	1.0	0.738
	1.2	0.739
色谱柱变化	Agilent Zorbax SB-C18	0.738
	Agilent Eclipse XDB-C18	0.741
	Agilent Xbridge C18	0.726

2.10 三批样品含量测定 取刺五加甘草颗粒样品(20170801,20170802,20170803),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算刺五加甘草颗粒中紫丁香苷的含量,三批样品测定结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

Tab 2 The results of sample content determination

批号	含量/(mg · g ⁻¹)
20170801	0.738
20170802	0.716
20170803	0.758

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 通过紫外扫描,紫丁香苷在 265 nm 处有最大吸收,因此选择 265 nm 为检测波长。

3.2 提取溶剂及提取时间的选择 参考《中国兽药典》二部中刺五加药材及刺五加浸膏含量测定项下供试品的处理方法,比较了甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇作为提取溶剂对紫丁香苷含量的影响,结果 50% 甲醇对紫丁香苷的提取效果最好,因此选择 50% 甲醇作为提取溶剂;同时考察了超声 10、20、30 min 对紫丁香苷含量的影响,结果超声 30 min 紫丁香苷的提取效果最好,因此选择超声 30 min。

3.3 色谱条件的考察 本试验考察了甲醇-水(20 : 80)、乙腈-水(11 : 89)、乙腈-0.1% 磷酸溶液,结果发现甲醇-水(20 : 80)、乙腈-0.1% 磷酸溶液条件下,阴性对照品在紫丁香苷对照品相应的保留时间处有干扰,乙腈-水(11 : 89)条件下阴性对照品在紫丁香苷对照品相应的保留时间处无干扰,重复进样发现阴性对照品在紫丁香苷对照品相应保留时间处会有干扰,研究发现阴性对照品中干扰峰保留时间过长,在第二针色谱图中出峰,因此为确保阴性对照品中色谱峰能被完全洗脱,将流动相改为梯度洗脱,紫丁香苷的保留时间为 8 min 左右,与相邻峰分离度好,峰型良好。

采用高效液相色谱法测定刺五加甘草颗粒中紫丁香苷的含量,方法简便、准确度高、专属性强、重现性好。

参考文献:

- [1] 白雪, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 刺五加活性成分的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016(4): 378-381.
Bai X, Hu W Z, Jiang A L, *et al.* Research advance on acanthopanax structure and the content of active ingredient[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016(4): 378-381.
- [2] 张英楠, 杨树宝, 单春兰, 等. 刺五加多糖对雏鸡脾脏中 T、B 淋巴细胞定位分布的影响[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(4): 35-40.
Zhang Y N, Yang S B, Shan C L, *et al.* Effects of Acanthopanax senticosus polysaccharide on distribution of T and B lymphocytes in chicken spleen[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(4): 35-40.
- [3] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695-2700.
Gao X Y, Wang W Q, Wei S L, *et al.* Research advance on pharmacological activities of Glycyrrhiza and the content of active ingredient[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(21): 2695-2700.
- [4] 韩瑶聃, 王彬, 王政雨, 等. 甘草酸药理作用的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21): 2499-2505.
Han Y D, Wang B, Wang Z Y, *et al.* Recent research progress in pharmacological effects of glycyrrhizic acid[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2012, 21(21): 2499-2505.
- [5] 华冰, 程瑞凤, 景晶, 等. 甘草总黄酮抗大鼠应激抑郁作用及对突触可塑性关键蛋白 SYP/PSD-95 的调节作用[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(10): 1180-1187.
Hua B, Cheng R F, Jing J, *et al.* Antidepressant effect of licorice flavonoids from Glycyrrhiza uralensis on stress-induced depression and the key protein SYP/PSD95 associated with synaptic plasticity in rats[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(10): 1180-1187.
- [6] 刘三侠, 吴俊伟, 林永乐. 甘草多糖药理作用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(1): 64-67.
Liu S X, Wu J W, Lin Y L. Research progress in pharmacological effects of Glycyrrhiza polysaccharide[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(1): 64-67.
- [7] 杨红. 刺五加胶囊中紫丁香苷含量的 HPLC 测定[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 404-405.
Yang H. Determination of syringin in Acanthopanax capsule. Lishizhen Medicine and Material Medica Research[J]. 2013, 24(2): 404-405.
- [8] 任晋, 廖娴, 谢镇山, 等. HPLC 法测定刺五加、五加皮与红毛五加皮中 3 种成分的含量[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(5): 602-606.
Ren J, Liao X, Xie Z S, *et al.* Determination of three constituents in Acanthopanax senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis, Acanthopanax Cortex and Acanthopanax giraldii Cortex by HPLC[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2015, 31(5): 602-606.
- [9] 赵敏, 郭天琦, 唐金艺, 等. 刺五加片剂质量标准提高的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(5): 59-62.
Zhao M, Guo T Q, Tang J Y, *et al.* Study on improving the quality standards of Acanthopanax tablet. Research and Practice on Chinese Medicines, 2015, 29(5): 59-62.
- [10] 王绍青. 刺五加浸膏指纹图谱及多成分含量测定方法的研究[D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2014: 17-57.
Wang S Q. Method for the determination of Acanthopanax senticosus extract fingerprint and multi ingredient content [D]. Heilongjiang: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2014: 17-57.
- [11] 刘莹. 刺五加浸膏中指标性成分的含量测定及富集方法研究[D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2012: 25-32.
Liu Y. Acanthopanax senticosus extracts ingredients indexes in the determination and enrichment methods research [D]. Heilongjiang: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2012: 25-32.
- [12] 孔祥臣, 闫秋野, 林兰波, 等. HPLC 法测定刺五加浓缩液中紫丁香苷的含量[J]. 中国实用医药, 2010, 5(6): 65-66.
Kong X C, Yan Q Y, Lin L B, *et al.* Determination of syringin in ciwujia concentrated liquid by HPLC [J]. China Practical Medical, 2010, 5(6): 65-66.
- [13] 史磊, 张涛, 李峰, 等. RP-HPLC 法测定刺五加滴丸中紫丁香苷含量研究[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(11): 926-928.
Shi L, Zhang T, Li F, *et al.* Determination of content of syringin in ciwujia dropping pill by HPLC [J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 33(11): 926-928.

(编辑:陈希)