

# HPLC法同时测定脑血栓丸中芍药苷和阿魏酸的含量<sup>Δ</sup>

刘建萍\*, 陈涛(天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4714-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.37

**摘要** 目的:建立同时测定脑血栓丸中芍药苷和阿魏酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Sunfire™ C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-水-冰乙酸(17:82:1, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 20 μl。结果:芍药苷、阿魏酸检测质量浓度线性范围分别为 0.024~0.240、0.009 4~0.141 0 mg/ml(*r*均为 0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;加样回收率分别为 95.00%~97.90%、95.29%~98.24%, RSD 分别为 0.59%、0.54%(*n*=6)。结论:本方法操作简单、重复性好,可用于脑血栓丸的质量控制。

**关键词** 脑血栓丸;芍药苷;阿魏酸;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of Paeoniflorin and Ferulic Acid in Naoxueshuan Pill by HPLC

LIU Jian-ping, CHEN Tao(The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin and ferulic acid in Naoxueshuan pill. METHODS: HPLC was performed on the column of Waters Sunfire™ C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-water-glacial acetic acid (17:82:1, V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 230 nm, column temperature was 35 ℃, and the volume injection was 20 μl. RESULTS: The linear range was 0.024-0.240 mg/ml for paeoniflorin(*r*=0.999 9) and 0.009 4-0.141 0 mg/ml(*r*=0.999 9); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 95.00-97.90% (RSD=0.59%, *n*=6) and 95.29-98.24% (RSD=0.54%, *n*=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and reproducible, and can be used for the quality control of Naoxueshuan pill.

**KEYWORDS** Naoxueshuan pill; Paeoniflorin; Ferulic acid; HPLC

脑血栓丸(制剂批准文号:津药制字 Z20070720 号)是我院临床使用多年的医院制剂。该制剂由赤芍、当归、丹参、水蛭等 11 味中药组成,具有镇肝清心、活血通络的功效,临床主要用于脑血栓形成急性期促进肢体运动功能的恢复,疗效确切。该制剂原质量标准仅有薄层鉴别,而无有效成分含量测定。为更好地控制该制剂的质量、缩短检测时间,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法同时对其主药赤芍、当归的有效成分芍药苷和阿魏酸<sup>[1-2]</sup>的含量进行了测定,以为后期研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

600E 型 HPLC 仪,包括 2998 二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);AG135 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);DZKW-S-6 型电热恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

脑血栓丸(天津中医药大学第一附属医院制剂室,批号:121122、130520、131028,规格:9 g/丸);芍药苷对照品(批号:121093-200402)、阿魏酸对照品(批号:111703-200501)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;乙腈、冰乙酸均为色谱纯,甲醇、乙醚、正丁醇等均为分析纯,水为自制超纯水。

## 2 方法与结果<sup>[3-9]</sup>

### 2.1 色谱条件

<sup>Δ</sup> 基金项目:天津市科技创新专项资金项目(No.06FZZDSH04 08)

\* 主管药师。研究方向:中药制剂与质量标准。E-mail: 13920396977@163.com

色谱柱:Waters Sunfire™ C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:乙腈-水-冰乙酸(17:82:1, V/V/V);检测波长:230 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:35 ℃;进样量:20 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取芍药苷和阿魏酸对照品各适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 ml 含 0.60 mg 芍药苷和 0.47 mg 阿魏酸的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品 4 g,剪碎,精密称定,加甲醇 50 ml,索氏提取法提取 4 h;提取液回收甲醇并用水浴蒸干,残渣加热水 20 ml 使溶解,转移至分液漏斗中;用乙醚提取 3 次,每次 20 ml,合并乙醚提取液,水浴蒸干,残渣用适量甲醇溶解并稀释至 5 ml;水溶液继续用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 20 ml,合并正丁醇液,水浴蒸干,残渣用适量甲醇溶解并稀释至 10 ml。精密量取乙醚层溶液 3 ml 和正丁醇层溶液 1 ml,置于 5 ml 棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 取不含赤芍和当归药材的其他药味,按脑血栓丸的制备工艺制备成缺二者的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

### 2.3 专属性试验

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 20 μl,按“2.1”项下色谱条件注入 HPLC 仪,记录色谱,详见图 1。由图 1 可见,供试品色谱中在与混合对照品色谱芍药苷和阿魏酸峰相应保留时间处有相同色谱峰,而阴性对照在此保留时间处无干扰;并且芍药苷和阿魏酸峰与相邻峰分离度均符合要求,表明处方中其他成分对这 2 个成分含量测定无干扰。

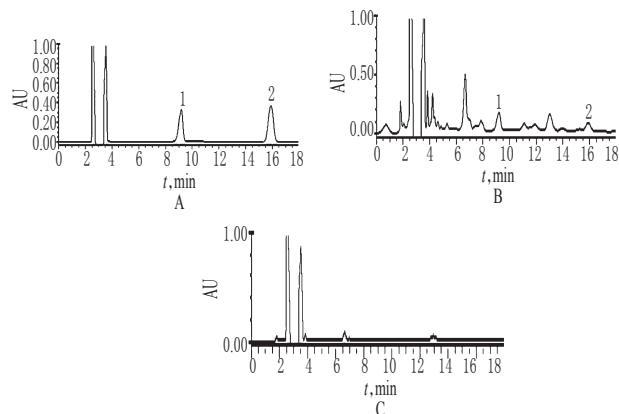


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.芍药苷;2.阿魏酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance;B.test sample;C.negative control;1.paeoni-florin; 2.ferulic acid

## 2.4 线性关系考察

精密吸取0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 ml的芍药苷对照品溶液(质量浓度0.60 mg/ml),0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 ml的阿魏酸对照品溶液(质量浓度0.47 mg/ml),分别置于5 ml棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,分别制成0.024、0.060、0.120、0.180、0.240 mg/ml的芍药苷系列对照品溶液和0.009 4、0.018 8、0.047 0、0.094 0、0.141 0 mg/ml的阿魏酸系列对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度( $x$ , mg/ml)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得芍药苷的回归方程为 $y=3.00x-1.58(r=0.999 9)$ ,阿魏酸的回归方程为 $y=1.12x-1.72(r=0.999 9)$ 。结果表明,芍药苷与阿魏酸检测质量浓度线性范围分别为0.024~0.240、0.009 4~0.141 0 mg/ml。

## 2.5 精密度试验

取芍药苷质量浓度为0.060 mg/ml和阿魏酸质量浓度为0.018 8 mg/ml的混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芍药苷、阿魏酸峰面积的RSD分别为1.37%、1.19%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

取样品(批号:131028)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于25℃下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、阿魏酸峰面积的RSD分别为1.76%、1.62%( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内较稳定。

## 2.7 重复性试验

取样品(批号:131028)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、阿魏酸峰面积的RSD分别为1.57%、1.49%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

精密称取芍药苷对照品6.20 mg和阿魏酸对照品3.40 mg,置于10 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,备用。称取已知含量的脑血栓丸(批号:131028,含芍药苷0.308 mg/g、阿魏酸0.171 mg/g)样品6份,每份2 g,精密称定,分别加入上述混合对照品溶液1 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收

率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $n=6$ )

| 待测成分 | 称样量, g | 样品含量, mg | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |
|------|--------|----------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 芍药苷  | 2.003  | 0.617    | 0.620   | 1.215   | 96.45    | 96.45      | 0.59   |
|      | 2.002  | 0.617    | 0.620   | 1.222   | 97.58    |            |        |
|      | 2.003  | 0.617    | 0.620   | 1.224   | 97.90    |            |        |
|      | 2.004  | 0.617    | 0.620   | 1.215   | 96.45    |            |        |
|      | 2.002  | 0.617    | 0.620   | 1.206   | 95.00    |            |        |
|      | 2.004  | 0.617    | 0.620   | 1.208   | 95.32    |            |        |
| 阿魏酸  | 2.003  | 0.343    | 0.340   | 0.668   | 95.59    | 96.42      | 0.54   |
|      | 2.002  | 0.342    | 0.340   | 0.670   | 96.47    |            |        |
|      | 2.003  | 0.343    | 0.340   | 0.677   | 98.24    |            |        |
|      | 2.004  | 0.343    | 0.340   | 0.669   | 95.88    |            |        |
|      | 2.002  | 0.342    | 0.340   | 0.672   | 97.06    |            |        |
|      | 2.004  | 0.343    | 0.340   | 0.667   | 95.29    |            |        |

## 2.9 样品含量测定

取3批脑血栓丸各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算芍药苷和阿魏酸的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of content determination of samples( $n=3$ )

| 批号     | 芍药苷含量, mg/g | 阿魏酸含量, mg/g |
|--------|-------------|-------------|
| 121122 | 0.310       | 0.176       |
| 130520 | 0.305       | 0.169       |
| 131028 | 0.308       | 0.171       |
| 平均值    | 0.308       | 0.172       |

## 3 讨论

### 3.1 提取方法的选择

本试验考察了超声提取、回流提取和索氏提取3种提取方法,结果表明索氏提取效果较好,不但含量较高,而且峰形和分离度也较好。故最终确定芍药苷和阿魏酸的提取方法为索氏提取法。

### 3.2 提取溶剂、次数的选择

笔者以有效成分的含量、峰形、分离度为考察指标,考察了石油醚、乙醚、乙酸乙酯、水饱和和正丁醇等不同提取溶剂组合。结果表明,乙醚-水饱和和正丁醇组合提取成分较完全,峰形和分离度较好。此外,笔者还对提取次数进行了考察,分别考察了提取2、3、4次有效成分含量。结果表明,随着提取次数的增加,有效成分含量随之增加,但是增加的幅度逐渐变小,考虑检测时间和成本,以乙醚、水饱和和正丁醇分别提取3次为宜。

### 3.3 流动相的选择

采用乙腈-水-冰乙酸的体系,选用不同配比进行试验,充分考虑峰形,二主成分峰出峰间隔时间,最终确定流动相为乙腈-水-冰乙酸(17:82:1, V/V/V)。

### 3.4 柱温的选择

先后在25、30、35、40℃下进样测定,其中35℃柱温条件下分离较好,且峰形对称,峰面积大小较为稳定,最终确定柱温为35℃。

### 3.5 波长的选择

芍药苷最大吸收波长为230 nm,阿魏酸为316 nm。芍药苷在316 nm下几乎无吸收,而阿魏酸在230 nm下吸收较大。经过进一步试验表明,供试品在230 nm和316 nm下测定的阿魏酸含量基本一致。故最终测定波长选择230 nm。

# 丹芪偏瘫胶囊挥发性成分的GC-MS指纹图谱研究<sup>Δ</sup>

宋洁瑾\*, 陈涛, 李进<sup>#</sup>(天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4716-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.38

**摘要** 目的:建立丹芪偏瘫胶囊挥发性成分的气相色谱-质谱联用(GC-MS)指纹图谱。方法:采用GC-MS法。色谱条件:色谱柱为BPX 5,进样口温度为250℃,程序升温,载气为氦气,流速为1 ml/min,分流进样,分流比为50:1,进样量为0.02 μl;质谱条件:离子源为电子轰击,轰击能量为70 eV,离子源温度为200℃,传输线温度为250℃,扫描范围为40~500 amu,溶剂延迟2 min。以色谱峰面积最大的色谱峰为参照峰,分析10批丹芪偏瘫胶囊的共有峰,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行相似度分析,采用美国国家标准与技术局(NIST)标准质谱数据库检索鉴定共有峰。结果:10批丹芪偏瘫胶囊有13个共有峰,相似度均>0.92;经验证,10批丹芪偏瘫胶囊指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。3号峰为当归独有,2、4、5、7、8、12号峰为石菖蒲独有。结论:所建立的指纹图谱专属性强、方法稳定,可为丹芪偏瘫胶囊质量评价提供依据。

**关键词** 丹芪偏瘫胶囊;挥发性成分;指纹图谱;气相色谱-质谱联用;质量控制

## Study on the GC-MS Fingerprint Spectrum of Volatile Components in Danqi Piantan Capsule

SONG Jie-jin, CHEN Tao, LI Jin (The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the GC-MS fingerprint spectrum of volatile components in Danqi piantan capsule. METH-ODS: GC-MS was performed. HPLC conditions: The column was BPX 5, temperature of injection was 250 °C, respectively; carrier gas was He, flow rate was 1 ml/min, split injection, split ratio was 50:1 and volume injection was 0.02 μl. MS conditions: ion source was EI, bombarding energy was 70 eV, temperature of ion source and transmission line was 200 °C and 250 °C, respectively; scan range was 40-500 amu, solvent delay of 2 min. The peak with largest chromatographic peaks areas was reference peak, common peaks of 10 batches of Danqi piantan capsule were analyzed. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was adapted for the similarity analysis and NIST standard MS database was used to retrieve and identify the common peak. RESULTS: There were totally 13 common peaks in the 10 batches of Danqi piantan capsule with similarity degree>0.92; according to the verification, the fingerprint spectrum was a dapted for the similarity analysis and reference fingerprint of 10 batches of Danqi piantan capsule showed good consistency. The No.3 peak was *Angelica sinensis* unique, the No.2, 4, 5, 7, 8, 12 peak was *Acorus tatarinowii* unique. CONCLUSIONS: The established method is specific and stable, and can provide basis for the quality assessment for Danqi piantan capsule.

**KEYWORDS** Danqi piantan capsule; Volatile components; Fingerprint; GC-MS; Quality control

综上所述,本方法操作简单、重复性好,可用于脑血栓丸的质量控制。

### 参考文献

- [1] 杨媛媛,周刚,马晓康,等.赤芍的研究进展[J].医药导报,2008,27(1):67.
- [2] 薄华本,陈启助,沈晗,等.当归补血汤调控骨髓造血机理及对造血微环境的影响[J].中国新药与临床杂志,2013,32(10):824.
- [3] 朱伟,王学美.反相高效液相色谱法同时测定补阳还五汤中芍药苷和阿魏酸的含量[J].医药导报,2006,25(1):60.
- [4] 李辉,任平,黄熙,等.高效液相色谱法同时测定健康人口服加味道遥散后血清阿魏酸和芍药苷含量及其药理学研究[J].中西医结合学报,2008,6(11):1178.
- [5] 葛志伟,贺庆,林云径,等.RP-HPLC法测定杭白芍及其饮片中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷[J].中草药,2008,39(3):378.
- [6] 甘洪全,黄熙,屈扬,等.RP-HPLC法同时测定冠心II号中的丹参素、原儿茶醛、芍药苷和阿魏酸[J].第四军医大学学报,2004,25(9):772.
- [7] 葛志伟,贺庆,水文波,等.HPLC测定双丹颗粒中丹酚酸B和芍药苷的含量[J].中国中药杂志,2006,31(13):1062.
- [8] 吕光华,程世琼,陈金泉,等.HPLC测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标[J].中国中药杂志,2010,35(2):194.
- [9] 李洋.高效液相色谱法测定活血定痛合剂中阿魏酸的含量[J].中国民族民间医药,2012,21(2):41.

Δ 基金项目:天津市西青区科技型中小企业发展专项资金项目(No.XQKC2013-022)

\* 主管药师,硕士研究生。研究方向:中药制剂分析。E-mail: jiejin song@163.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:中药制剂与炮制。电话:022-83969680。E-mail: yf@shitian.com

(收稿日期:2014-11-02 修回日期:2015-10-17)

(编辑:周 箐)