

HPLC法同时测定跌打丸中芍药苷和丹皮酚的含量

窦红允*,黄东杰,王孟阳,张洁,王晓琦,田永庆(沧州市食品药品检验所,河北沧州 061001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3870-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.42

摘要 目的:建立同时测定跌打丸中芍药苷和丹皮酚含量的方法,为提高其质量控制标准提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为ZORBAX C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为230 nm(芍药苷)、274 nm(丹皮酚),柱温为35℃,进样量为20 μl。结果:芍药苷和丹皮酚的检测进样量线性范围分别为0.514 8~1.544 5 μg($r=0.999 2$)、0.643 2~1.960 4 μg($r=0.999 8$);定量限分别为0.135 6、0.126 4 μg、检测限分别为0.067 8、0.063 2 μg;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为95.78%~97.27%(RSD=0.62%, $n=6$)、97.38%~98.38%(RSD=0.42%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、重复性好、灵敏度高,可用于同时测定跌打丸中芍药苷和丹皮酚的含量。

关键词 跌打丸;芍药苷;丹皮酚;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Paeoniflorin and Paeonol in Dieda Pill by HPLC

DOU Hongyun, HUANG Dongjie, WANG Mengyang, ZHANG Jie, WANG Xiaoqi, TIAN Yongqing (Cangzhou Institute for Drug and Food Control, Hebei Cangzhou 061001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin and paeonol in Dirda pill, and provide reference for improving its quality control standard. METHODS: HPLC was performed on the column of ZORBAX C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elutio) at a flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 230 nm (paeoniflorin), 274 nm (paeonol), column temperature was 35℃, injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 0.514 8-1.544 5 μg for paeoniflorin ($r=0.999 2$) and 0.643 2-1.960 4 μg for paeonol ($r=0.999 8$); the limits of quantification were 0.135 6, 0.126 4 μg, limits of detection were 0.067 8, 0.063 2 μg; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 95.78%-97.27% (RSD=0.62%, $n=6$) and 97.38%-98.38% (RSD=0.42%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple with good reproducibility and high sensibility, and can be used for the simultaneous determination of paeoniflorin and paeonol in Dirda pill.

KEYWORDS Dieda pill; Paeoniflorin; Paeonol; Content determination; HPLC

跌打丸是2015年版《中国药典》(一部)收录的常用复方中药,由三七、赤芍、白芍、牡丹皮、血竭、骨碎补、乳香、没药、甘草等24味中药材组成,具有活血散瘀、消肿止血之功效,可用于跌打损伤、筋断骨折、瘀血肿痛、闪腰岔气等证^[1]。赤芍和白芍基源相近,主成分相同,现代药理学研究表明,赤芍和白芍具有抗炎、抗凝血、免疫调节等作用^[2],是跌打丸中起活血散瘀、消肿止血的重要药物。牡丹皮具有清热凉血、活血化瘀的功能^[1],是跌打丸中的有效成分之一。赤芍和白芍其主要活性成分为芍药苷、芍药内酯苷和苯甲酰芍药苷等单萜类成分。牡丹皮主要含有丹皮酚等酚酸类成分和芍药苷等糖苷类成分^[3]。在2015年版《中国药典》(一部)中只用血竭素高氯酸盐定量,考虑到芍药苷和丹皮酚是与跌打丸功效相关的重要活性成分,笔者参考相关文献^[4-7],采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定跌打丸中芍药苷和丹皮酚的含量,为提高其质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括1260ALS自动进样器、1260VWD检测器、hp-5工作站(美国Agilent公司);XS105DU型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-300VED型双频数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:45 kHz)。

*主管药师。研究方向:药品检验。电话:0317-2063949-8202。
E-mail:43995455@qq.com

1.2 药品与试剂

跌打丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号:14010074、13012817、13012033,规格:3 g/丸);芍药苷对照品(批号:110736-201337,纯度:94.9%)、丹皮酚对照品(批号:110708-200506,置五氧化二磷减压干燥器中干燥12 h以上使用)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,乙醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.8 ml/min;检测波长:230 nm(芍药苷)、274 nm(丹皮酚);柱温:35℃;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 gradient elution program

时间,min	A,%	B,%	检测波长,nm
0	15	85	230
15	15	85	230
20	20	80	274
25	40	60	274
40	40	60	274
50	15	85	230

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芍药苷对照品0.010 85 g、丹皮酚对照品0.010 12 g,分别置于50 ml量瓶中,加50%乙醇

溶解并定容, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.217 0、0.202 4 mg/ml 的单一对照品贮备液。分别精密量取上述芍药苷对照品贮备液 25 ml、丹皮酚对照品贮备液 5 ml, 置于同一 100 ml 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并定容, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量, 剪碎, 取约 3.0 g, 精密称定, 置于 100 ml 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 50 ml, 精密称定, 超声处理 40 min, 放冷, 精密称定, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺分别制备不含白芍、赤芍、牡丹皮的阴性样品, 再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液, 即得。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, 在该色谱条件下各成分均能达到基线分离, 分离度 > 1.5; 理论板数以芍药苷峰计为 5 000; 保留时间为 12 min。结果表明, 其他成分对测定无干扰。

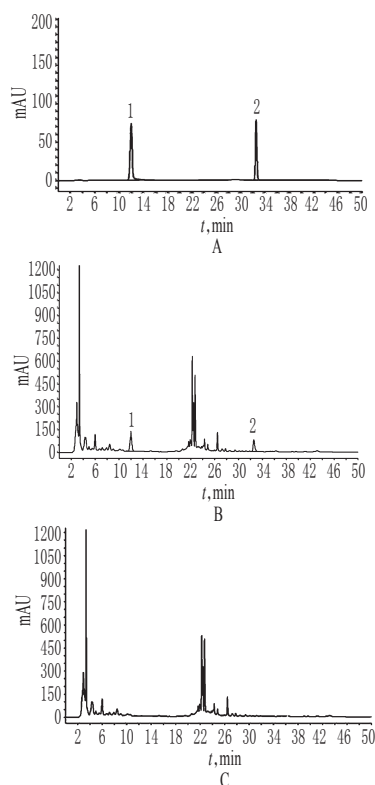


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 芍药苷; 2. 丹皮酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference; B. test sample; C. negative control; 1. paeoniflorin; 2. paeonol

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0、10、15、20、25、30 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以进样量(x, μ g)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 $y = 1.92x - 52.25$ ($r = 0.999 2$)、丹皮酚的回归方程为 $y = 6.48x - 5.80$ ($r = 0.999 8$)。结果表明, 芍药苷和丹皮酚的进样量线性范围分别为 0.514 8~1.544 5、0.643 2~1.960 4 μ g。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 等倍逐步稀释, 按

“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 10:1 时, 得芍药苷和丹皮酚的定量限分别为 0.135 6、0.126 4 μ g; 当信噪比为 3:1 时, 得芍药苷和丹皮酚的检测限分别为 0.067 8、0.063 2 μ g。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件重复进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 芍药苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.36% 和 0.57% ($n = 6$), 表明仪器精密密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、12 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 芍药苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.2% ($n = 5$), 表明供试品溶液在室温下 12 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号: 14010074)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 芍药苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.64%、0.83% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号: 14010074)适量, 共 6 份, 每份约 3.0 g, 精密称定, 精密加入芍药苷对照品 3.34 mg、丹皮酚对照品 5.82 mg, 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, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果详见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 ($n = 6$)
Tab 2 Results of recovery tests ($n = 6$)

待测成分	取样量, 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	3.001 2	3.238	3.345	6.532	95.78	96.55	0.62
	3.043 6	3.285	3.345	6.501	96.14		
	3.021 8	3.249	3.345	6.503	97.27		
	3.007 8	3.195	3.345	6.416	96.29		
	3.014 7	3.171	3.345	6.405	96.68		
丹皮酚	3.032 5	3.222	3.345	6.473	97.18	97.83	0.42
	3.001 2	5.801	5.820	11.469	97.38		
	3.043 6	5.882	5.820	11.556	97.49		
	3.021 8	5.853	5.820	11.555	97.97		
	3.007 8	5.815	5.820	11.530	98.19		
3.014 7	5.827	5.820	11.553	98.38			
3.032 5	5.861	5.820	11.541	97.59			

2.10 样品含量测定

取 3 批样品各适量, 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, 记录峰面积并按外标法以峰面积计算样品中芍药苷和丹皮酚的含量, 结果详见表 3。

表 3 样品含量测定结果 ($n = 3$, mg/g)

Tab 3 Results of contents determination of samples ($n = 3$, mg/g)

样品批号	芍药苷	丹皮酚
14010074	1.08	1.93
13012817	1.07	1.92
13012033	1.02	1.90

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

笔者通过查阅相关文献^[9], 并根据待测成分的理化性质, 对提取溶剂进行了考察和比较。结果发现, 采用 50% 乙醇提

HPLC法同时测定疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的含量

李 昂^{1*}, 阚红玉², 张 因¹(1.天津市儿童医院, 天津 300134; 2.天士力制药集团股份有限公司, 天津 300193)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3872-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.43

摘要 目的:建立同时测定疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为SAGA Tri-Sal C₁₈,流动相为乙腈-0.5%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为320 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:绿原酸、橙皮苷、黄芩苷的检测质量浓度线性范围分别为2.463~240.5 μg/ml($r=0.999\ 9$)、6.577~642.3 μg/ml($r=0.999\ 8$)、1.708~166.8 μg/ml($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.8%;加样回收率分别为97.02%~102.40%(RSD=1.9%, $n=6$)、96.55%~100.20%(RSD=1.6%, $n=6$)、97.51%~100.70%(RSD=1.2%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于疏表灵颗粒中绿原酸、橙皮苷、黄芩苷含量的同时测定。

关键词 疏表灵颗粒;绿原酸;橙皮苷;黄芩苷;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Hesperidin and Baicalin in Shubiaoling Granule by HPLC

LI Ang¹, KAN Hongyu², ZHANG Nan¹(1.Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China; 2.Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, hesperidin and baicalin in Shubiaoling granule. METHODS: HPLC was performed on the column of SAGA Tri-Sal C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.5% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 320 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 2.463-240.5 μg/ml for chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 6.577-642.3 μg/ml for hesperidin ($r=0.999\ 8$) and 1.708-166.8 μg/ml for baicalin ($r=0.999\ 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.8%; recoveries were 97.02% -102.40% (RSD=1.9%, $n=6$), 96.55% -100.20% (RSD=1.6%, $n=6$) and 97.51% -100.70% (RSD=1.2%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate with high sensitivity and good reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of chlorogenic acid, hesperidin and baicalin in Shubiaoling granule.

KEYWORDS Shubiaoling granule; Chlorogenic acid; Hesperidin; Baicalin; HPLC

取时色谱峰杂质较少,分离度更佳。因此,本试验选用50%乙醇为提取溶剂。

3.2 流动相的选择

文献报道采用HPLC法测定中药复方制剂中芍药苷和丹皮酚的流动相系统有甲醇-1.5%冰乙酸^[4]、甲醇-0.05%磷酸^[5]、乙腈-0.1%磷酸^[6-8]、乙腈-1%冰乙酸^[9]、乙腈-水^[10]、甲醇-水等,本试验比较了几种流动相的检测情况,结果以乙腈-0.1%磷酸为流动相时,样品中芍药苷和丹皮酚的色谱峰能达到基线分离,峰形良好,阴性对照无干扰;而采用其他流动相,样品分离度均不够理想。因此,本试验选用乙腈-0.1%磷酸为流动相。

综上所述,本方法操作简便、重复性好、灵敏度高,可用于同时测定跌打丸中芍药苷和丹皮酚的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1 590、172.
- [2] 杨琪伟, 杨莉, 熊爱珍, 等. 赤芍和白芍抗炎作用的UPLC-MS代谢组学初步研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3):694.
- [3] 孟庆焕, 祖元刚, 王化. 牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的优

化提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(7):68.

- [4] 赵佳丽, 肖国栋, 徐宏祥, 等. HPLC法测定咽炎片中的黄芩苷、芍药苷和丹皮酚[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(4):476.
- [5] 李向阳, 屠万倩. HPLC法测定六味地黄丸中丹皮酚、芍药苷和乌苏酸[J]. 中成药, 2012, 34(2):277.
- [6] 毛晓敏, 张晓波, 陈小青, 等. HPLC法测定十二乌鸡白凤丸中芍药苷、阿魏酸和丹皮酚含量[J]. 中成药, 2008, 30(5):678.
- [7] 冯发青, 王恩源, 伍庆, 等. HPLC法同时测定麦味地黄胶囊中马钱苷、芍药苷和丹皮酚含量[J]. 中成药, 2012, 34(12):2 339.
- [8] 李智慧, 吴素香, 石森林, 等. HPLC法测定不同厂家桂枝茯苓丸中丹皮酚及芍药苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):121.
- [9] 徐灿辉, 何维为, 何云飞. HPLC法测定六味地黄胶囊毛蕊花糖苷、马钱苷和丹皮酚[J]. 药物评价研究, 2014, 37(3):257.
- [10] 杜蓉, 张孟佑. HPLC法测定加味逍遥丸中芍药苷与甘草苷的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(18):2 571.

*主管药师, 硕士。研究方向:药物制剂。电话:022-87199759。
E-mail:andyli100@sina.com

(收稿日期:2015-11-13 修回日期:2016-07-07)

(编辑:刘 柳)