

丹栀逍遥散 6 种有效成分的 HPLC 测定

杨永红*

(贵州省骨科医院检验科, 贵阳 550007)

[摘要] **目的:**建立丹栀逍遥散制剂中有效成分栀子苷、中京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚 6 种成分的测定分析方法。**方法:**采用 HPLC, Cosmosil 5C₁₈ 色谱柱, (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸水(15:85) 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 波长 230 nm。**结果:**根据上述方法可在 90 min 内成功地分离丹栀逍遥散中栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚 6 个指标成分, 在丹栀逍遥散中各成分质量分数为栀子苷 1.203 mg·g⁻¹, 京尼平苷 1.960 mg·g⁻¹, 芍药内酯苷 6.720 mg·g⁻¹, 甘草甜素 0.157 mg·g⁻¹, 芍药苷 0.012 mg·g⁻¹, 牡丹酚 0.127 mg·g⁻¹。**结论:**该方法可用于丹栀逍遥散中栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚的测定, 操作简单、结果准确、回收率高、重复性好, 可用于丹栀逍遥散及其相关制剂的质量控制。

[关键词] 丹栀逍遥散; 栀子苷; 京尼平苷; 芍药内酯苷; 甘草甜素; 芍药苷; 牡丹酚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0097-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014160097

Simultaneous Determination of Six Constituents in Danzhi Xiaoyaosan by HPLC

YANG Yong-hong*

(Guizhou Province Osteological Hospital, Guiyang 550007, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of gardenin, geniposide, albiflorin, paeoniflorin, liquiritigenin, paeonol in Danzhi Xiaoyaosan by HPLC. **Method:** The Cosmosil 5 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile (A) - 0.5% phosphoric acid solution (B) gradient elution, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, and the detection wave-lengths were set at 230 nm. **Result:** The linear ranges were 0.009 46-0.946 mg·L⁻¹ for gardenin, 0.009 58-0.958 mg·L⁻¹ for geniposide, 0.008 68-0.868 mg·L⁻¹ for albiflorin, 0.004 88-0.488 mg·L⁻¹ for paeoniflorin, 25.0-500 mg·L⁻¹ for liquiritigenin, 25.0-500 mg·L⁻¹ for paeonol respectively. The average recoveries of three constituents were 96.1%, 104.3%, 100.5%, 94.7%, 97.4%, 95.4% with the RSD of 1.32%, 2.55%, 0.67%, 1.29%, 1.36%, 2.38%. The contents of six compounds, gardenin, geniposide, albiflorin, paeoniflorin, liquiritigenin,

[收稿日期] 20140430(018)

[通讯作者] * 杨永红, 硕士, 副主任技师, 从事生化免疫学研究, Tel:13511905061, E-mail:2301444608@qq.com

- [3] 钱亚琴. 紫草醇提工艺优化研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5): 56.
- [4] 汪长钢, 李常营, 邱芳萍. 不同紫草中左旋紫草素含量比较及提取条件优化[J]. 长春工业大学学报: 自然科学版, 2010, 31(3): 251.
- [5] 徐萍, 张凤清, 周洪亮, 等. 微波辅助醇提法提取紫草总色素的工艺研究[J]. 长春工业大学学报: 自然科学版, 2009, 30(5): 484.
- [6] 白研, 毋福海, 罗碧莲等. 高效毛细管电泳法测定新疆紫草中左旋紫草素的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(19): 1790.
- [7] 刘玉梅. 高效液相色谱法同时测定紫草素及其衍生物[J]. 中国酿造, 2011, 1: 173.
- [8] 贺金华, 芦苇华, 王芳. 高效液相色谱法测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 39.
- [9] 林雄, 潘旭东, 黄燕, 等. HPLC 法测定紫草油中左旋紫草素含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(7): 83.

[责任编辑 顾雪竹]

paeonol in Danzhi Xiaoyaosan were 1.203, 0.960, 0.720, 0.157, 0.104, 0.127 mg · g⁻¹. **Conclusion:** Determination of Danzhi Xiaoyaosan could effectively control the product quality of Danzhi Xiaoyaosan.

[**Key words**] Danzhi Xiaoyaosan; HPLC; gardenin; geniposide; albiflorin; paeoniflorin; liquiritigenin; paeonol; determination

丹栀逍遥散是由白术、柴胡、当归、茯苓、甘草、牡丹皮等药组成,已有文献对丹栀逍遥散中栀子苷含量进行测定^[4],对于方中其他成分的质量控制报道较少。为了更好、更全面的提高丹栀逍遥散质量控制水平,本研究参考相关文献^[4-5],建立高效液相色谱法,测定丹栀逍遥散中的栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷及牡丹酚6种化学指标成分,以求推广应用于市售的丹栀逍遥散及其复方的质量鉴定。

1 材料

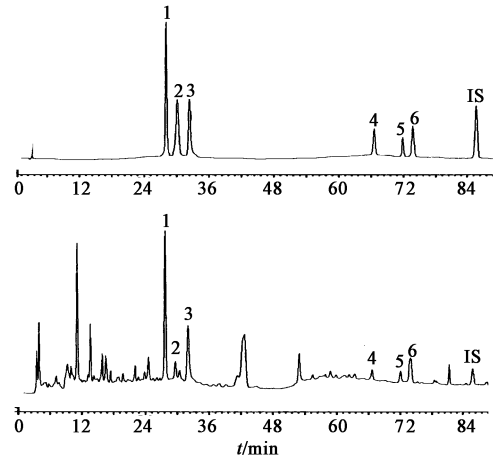
1.1 试药 对照品:京尼平苷(批号 E-0122)、芍药苷(批号 0715-200211)、牡丹酚(批号 0708-9003)购自 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan),甘草甜素(批号 110737-200312)购自 Sigma 公司,栀子苷(批号 10530-9412)购自 Aldrich 公司,芍药内酯苷自制,纯度 > 98%。丹栀逍遥散(江苏无锡制药厂,批号 1207319)。

1.2 仪器 AEL204 型电子微量分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Waters 高效液相色谱仪[(Applied Biosystems (ABI) 400 × 2 液相层析泵,Rheodyne Type 7125 注射阀(10 mL loop)];ABI 自动梯度流动相控制器;ABI 1000s 光二极管数组侦检器)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Cosmosil 5C₁₈ 色谱柱,(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)流动相乙腈-0.5% 磷酸水,梯度洗脱(0 ~ 30 min,15% A,30 ~ 60 min,15% ~ 25% A,60 ~ 90 min,25% ~ 30% A)流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 230 nm,理论塔数按栀子苷峰计算不低于 3 000,对称因子为 1.05,与相邻杂质峰的分度度 > 1.5。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精确量取 10.0 mg 的 BPB(B-butyl, P-hydroxy, B-benzoate)溶解于 10 mL 的 70% 甲醇水溶液中,以此作为内标(IS)溶液。分别各精密称取栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、约 5 mg,精密称定,甘草甜素、芍药苷、牡丹酚约 2.5 mg,精密称定,使用 70% 甲醇定容置 25 mL 量瓶中,分别得 0.189 2, 0.191 6, 0.173 6, 0.097 6, 0.083 6,



A. 对照品;B. 供试品;
1. 栀子苷;2. 京尼平苷;3. 芍药内酯苷;
4. 甘草甜素;5. 芍药苷;6. 牡丹酚

图 1 丹栀逍遥散 HPLC

0.099 2 g · L⁻¹的对照品母液。

2.3 供试品溶液的制备 精确称取 1.0 g 的丹栀逍遥散粉末置锥形瓶,加 70% 甲醇溶液 20 mL,超声提取 30 min,再经离心过滤,重复 3 次,合并萃取液浓缩至 10 mL。精确量取 5 mL 置 10 mL 量瓶中,70% 甲醇水定容至刻度,即得。

2.4 线性关系考察 将 2.2 项下每种对照品母液各精确量取 5,2,1,0.5,0.1,0.05 mL 并置于 10 mL 量瓶中,分别加入 1 mL 内标溶液,再以 70% 甲醇水定容。每次进样 10 μL。以对照品峰面积与内标品面积之比值作为纵坐标,以质量浓度作为横坐标,见表 1,表明各成分均具有良好的线性关系。

表 1 丹栀逍遥散中 6 个成分的线性

成分	线性方程	r	线性范围 /mg · L ⁻¹
栀子苷	Y = 8 409.4X + 3 223	0.999 6	0.009 46 ~ 0.946
京尼平苷	Y = 25 184X + 1 751.5	0.999 7	0.009 58 ~ 0.958
芍药内酯苷	Y = 1 362X + 71.95	0.999 4	0.008 68 ~ 0.868
甘草甜素	Y = 12 730X + 1 013	0.998 6	0.004 88 ~ 0.488
芍药苷	Y = 22 115X + 3 284	0.999 0	25.0 ~ 500.0
牡丹酚	Y = 13 442X + 3 744	0.999 5	25.0 ~ 500.0

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液,重复进样 6 次,栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷、牡丹酚峰面积 RSD 分别为 0.93%,0.76%,0.82%,0.87%,1.50%,1.83%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取配制好的供试品溶液分别在 0,2,4,6,8,16 h 进样,测定,供试品峰面积 RSD 0.37%,1.07%,0.68%,0.78%,0.37%,0.42%,说明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取批号为 20110930 的丹栀逍遥散粉末,按 2.3 项下制备供试品溶液 6 份,按含量测定方法进行测定,结果栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷及牡丹酚的峰面积 RSD 分别为 0.82%,1.02%,1.25%,0.82%,1.02%,0.93%,表明本法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号 20110930)6 份,每份 0.5 g,精密称定,置于锥形瓶中,分别精密加入对照品溶液适量(栀子苷 3 mL,京尼平苷 2.5 mL,芍药内酯苷 2 mL,甘草甜素 1 mL,芍药苷 0.5 mL 及牡丹酚 0.8 mL 对照品溶液),按供试品溶液制备项下操作,依法制备、进样,计算回收率。结果见表 2。

表 2 丹栀逍遥散中 6 种有效成分的加样回收率

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均 回收率 /%	RSD /%
栀子苷	0.507 3	0.574 0	0.567 6	1.119	96.1	1.32
京尼平苷	0.502 5	0.458 0	0.479 0	0.958	104.3	2.55
芍药内酯苷	0.503 7	0.368 0	0.347 2	0.717	100.5	0.67
甘草甜素	0.504 4	0.064 6	0.097 6	0.157	94.7	1.29
芍药苷	0.509 0	0.061 3	0.041 8	0.102	97.4	1.36
牡丹酚	0.505 4	0.049 3	0.079 4	0.125	95.4	2.38

2.9 样品含量测定 取市售丹栀逍遥散 1.0 g,按照 2.3 项下方法制备,进样 10 μ L,测定。结果栀子苷 1.203,京尼平苷 0.960,芍药内酯苷 0.720,甘草甜素 0.157,芍药苷 0.104,牡丹酚 0.127 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

对测定各成分进行了紫外全光谱扫描,结果发现栀子苷在 238 nm 有最大吸收,京尼平苷在 236 nm 有最大吸收,芍药苷、芍药内酯苷的最大吸收波长均在 230 nm,甘草甜素在 248 nm 有最大吸收波长,牡丹酚在 274 nm 有最大吸收波长。参考文献,并结合本研究实际情况,最终确定 230 nm 为测定波长^[6-10]。

考察了不同于流动相中不同比例的磷酸溶液(0.5%,1%,3%),并以流动相的梯度程序进行分析。结果显示较高的浓度的磷酸会降低管柱寿命以及增加泵浦的损耗,所以选取 0.5% 磷酸。

本文建立了一种可以同时测定丹栀逍遥散中栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷、及牡丹酚 6 种成分的方法。方法快速、准确、重复性好,可以为丹栀逍遥散的质量控制提供参考。

[参考文献]

- [1] 徐志伟,王文竹,苏俊芳,等.丹栀逍遥散四种提取物抗抑郁、焦虑作用的实验研究[J].中华中医药杂志,2006,21:302.
- [2] 徐志伟,王文竹,苏俊芳,等.逍遥散和丹栀逍遥散抗焦虑作用的实验研究[J].广州中医药大学学报,2006,23:330.
- [3] 李红娅,石延榜,蒋艳玲,等.丹栀逍遥散胶囊对慢性应激抑郁模型下丘脑单胺类神经递质的影响[J].中国医药导报 2007,30:321.
- [4] 姜勇.HPLC 法测定丹栀逍遥散中栀子苷的含量[J].中国药房,2014,25(12):1125.
- [5] 焦少珍,韩凤梅,陈勇.RP-HPLC 法同时测定加味逍遥口服液中栀子苷、芍药苷和丹皮酚的含量[J].湖北大学学报:自然科学版,2007,29(2):196.
- [6] Deng-Jye Yang, Lucy Sun Hwang. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea[J]. J Chromatography A, 2006(1119): 277.
- [7] Luis Martínez, Irene Cilla, José A Beltrán, et al. Antioxidant effect of rosemary, borage, green tea, pu-erh tea and ascorbic acid on fresh pork sausages packaged in a modified atmosphere: influence of the presence of sodium chloride[J]. J Sci Food and Agric, 2006, 86(9): 1298.
- [8] Guoliang Jie, Zhi Lin, Longze Zhang, et al. Free radicals scavenging and protective effect of Pu-erh tea extracts on the oxidative damage in the HPF-1 cell[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(21): 8058.
- [9] She-Ching Wu, Gow-Chin Yen, Bor-Sen Wang, et al. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea [J]. LWT-Food Sci Technol, 2007, (40): 506.
- [10] Zhongbing Lu, Guangjun Nie, Peter S Belton, et al. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives[J]. Neurochem Int, 2006, 48(4): 263.

[责任编辑 顾雪竹]