

HPLC 测定疏经防痛胶囊中芍药苷和丹参酮 II_A 含量

唐安玲¹, 郑琰^{2*}, 宋英², 朱聪², 贺宝莹¹

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定疏经防痛胶囊中芍药苷、丹参酮 II_A 含量的方法, 为该制剂的临床推广提供参考。方法: 芍药苷和丹参酮 II_A 的色谱柱分别选择 Luna 5u C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相分别为 0.05% 磷酸二氢钾-乙腈 (85:15) 和甲醇-水 (80:20), 检测波长分别为 230 nm 和 270 nm, 进样量分别为 10 μL 和 20 μL, 柱温均为 25 °C。结果: 芍药苷、丹参酮 II_A 的线性范围分别为 0.020 4 ~ 0.204, 0.043 2 ~ 0.864 μg; 平均加样回收率分别为 99.89% (RSD 1.5%), 100.43% (RSD 1.1%), 重复性、稳定性、精密度的 RSD 均 < 2%。结论: 建立的方法简便、定量准确、重复性好, 适用于疏经防痛胶囊的质量控制。

[关键词] 疏经防痛胶囊; 芍药苷; 丹参酮 II_A

[中图分类号] R284.1; R944.5; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2015) 03-0041-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030041

Determination of Paeoniflorin and Tanshinone II_A in Shujing Fangtong Capsules by HPLC TANG An-ling¹, ZHENG Yan^{2*}, SONG Ying², ZHU Cong², HE Bao-ying¹ (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China; 2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of paeoniflorin and tanshinone II_A in Shujing Fangtong capsules. **Method:** Chromatographic test on paeoniflorin was performed on Luna 5u C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% monopotassium phosphate (15:85), detection wavelength was 230 nm, column temperature was 25 °C, injection volume was 10 μL, flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. Similarly, chromatographic test on tanshinone II_A was performed on Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-water (80:20), detection wavelength was 270 nm, column temperature was 25 °C, injection volume was 20 μL and flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. **Result:** Linear ranges of paeoniflorin and tanshinone II_A were 0.020 4-0.204, 0.043 2-0.864 μg, average recoveries of them were 99.89% (RSD 1.5%) and 100.43% (RSD 1.1%), respectively. RSDs of repeatability, stability and precision test were less than 2%. **Conclusion:** This method is simple, accurate with good repeatability, which is suitable for quality control of Shujing Fangtong capsules.

[Key words] Shujing Fangtong capsules; paeoniflorin; tanshinone II_A

疏经防痛胶囊源于杨家林主任医师经验方四逆散合活络效灵丹加减化裁而成, 由白芍、丹参、竹叶柴胡、枳壳、甘草、没药等 8 味中药组成, 主治肝郁血瘀型痛经。痛经为妇科常见疾病, 治疗已取得一定进展, 非甾体抗炎药、口服避孕药、解痉镇静剂和受体激动剂等西药都是有效的常用治疗药物, 但容易引起人体内分泌失调及其他不良反应; 中药比西药

副作用小且价格低廉, 用于治疗痛经的临床效果较好, 内治法有少腹逐瘀汤、桃红四物汤、木香调经胶囊和行气化瘀汤等, 外治法有痛经散、痛经贴、中药灌肠治疗和针灸治疗等, 还有中西医结合治疗等^[1-3]。白芍为方中君药, 具有养血调经、柔肝止痛、平抑肝阳等功效, 主要有效成分为芍药苷^[4]; 丹参为臣药, 具有活血祛瘀、通经止痛等功效, 主要活

[收稿日期] 20140623 (017)

[第一作者] 唐安玲, 在读硕士, 从事中药新药与新剂型研究, Tel: 13438021065, E-mail: 434391498@qq.com

[通讯作者] * 郑琰, 主任药师, 从事医院制剂和临床药学研究, Tel: 028-87783714, E-mail: zhengyan609@sina.com

性成分为丹参酮Ⅱ_A^[5]。原方以散剂形式用于临床多年,疗效确切,在前期剂型研究中曾考虑制成大蜜丸、合剂或颗粒剂,但临床效果不佳,而制成胶囊剂效果较好,故确定改制为疏经防痛胶囊剂。为有效控制该制剂的内在质量,本实验采用 HPLC 建立有效成分——芍药苷和丹参酮Ⅱ_A 的含量测定方法,为该制剂质量标准的制定提供参考。

1 材料

HP-1100 型高效液相色谱仪(美国惠普公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),CXP-500A 型高速多功能粉碎机(上海市中晟喜制药机械有限公司)。白芍、丹参等药材均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学药鉴教研室严铸云教授鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部相关项下标准;芍药苷(纯度 94.9%)、丹参酮Ⅱ_A 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-201337,110766-200619),疏经防痛胶囊(自制,批号 140410,140411,140412),乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 芍药苷 Luna 5u C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.05% 磷酸二氢钾-乙腈(85:15),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 10 μL,检测波长 230 nm。理论塔板数按芍药苷峰计算不低于 2 000。

2.1.2 丹参酮Ⅱ_A Diamonsil C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(80:20),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 20 μL,检测波长 270 nm。理论塔板数按丹参酮Ⅱ_A 峰计算不低于 2 000。

2.2 对照品溶液的制备

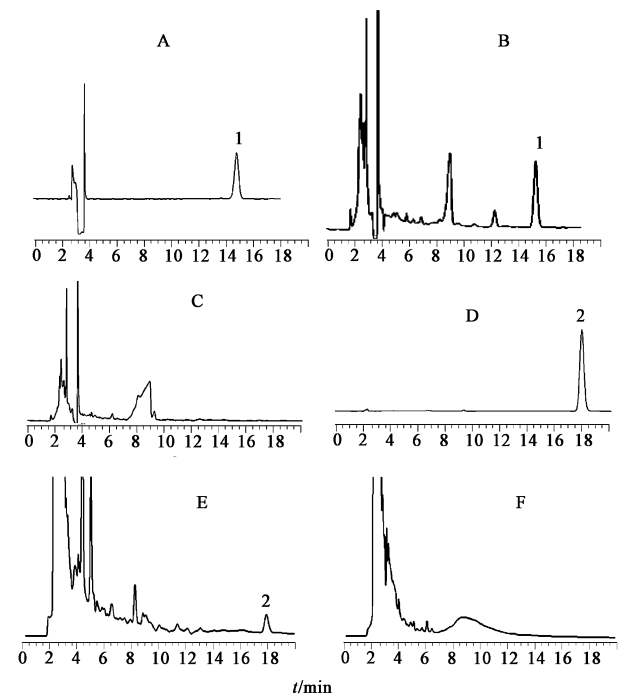
2.2.1 芍药苷 精密称取芍药苷对照品 1.02 mg,置于 50 mL 棕色瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得 20.4 mg·L⁻¹ 芍药苷贮备液。

2.2.2 丹参酮Ⅱ_A 精密称取丹参酮Ⅱ_A 对照品 1.08 mg,置于 25 mL 棕色瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得 43.2 mg·L⁻¹ 丹参酮Ⅱ_A 贮备液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物,研细,精密称取粉末约 0.25 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL,称定质量,超声处理 15 min,放冷,加 50% 甲醇补足失重,摇匀,滤过,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得芍药苷含量测定的供试品溶液。

精密称取粉末约 0.8 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声处理 20 min,放冷,加甲醇补足失重,摇匀,滤过,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得丹参酮Ⅱ_A 含量测定的供试品溶液。

2.4 阴性样品的制备 称取缺白芍、丹参药材的本品内容物,按 2.3 项下方法制备阴性样品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果表明阴性样品无干扰,见图 1。



A, D. 对照品; B, E. 供试品; C. 缺白芍阴性样品; F. 缺丹参阴性样品; 1. 芍药苷; 2. 丹参酮Ⅱ_A

图1 疏经防痛胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC of Shujing Fangtong capsules

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察 精密吸取 2.2.1 项下芍药苷贮备液 1, 3, 5, 7, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 15\,393.337X - 4.660$ ($r = 0.999\,9$), 线性范围 0.020 4 ~ 0.204 μg。精密吸取 2.2.2 项下丹参酮Ⅱ_A 贮备液 0.5, 1, 3, 5, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 按 2.1.2 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 5\,343.277X - 8.558$ ($r = 0.999\,9$), 线性范围 0.043 2 ~ 0.864 μg。

2.5.2 精密度试验 精密吸取 2.2 项下芍药苷贮备液 10 μL 和丹参酮Ⅱ_A 贮备液 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件分别连续进样 6 次, 结果芍药苷、丹参酮

II_A 峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同批疏经防痛胶囊,按 2.3 项下方法制备芍药苷供试品溶液和丹参酮 II_A 供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果芍药苷、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.6%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一份样品,按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果样品中芍药苷、丹参酮 II_A 平均质量分数分别为 8.30, 1.13 mg·g⁻¹, RSD 依次为 1.2%, 1.1%, 表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已知芍药苷含量(8.30 mg·g⁻¹)的样品共 6 份,每份约 0.04 g,各精密加入 0.468 g·L⁻¹ 芍药苷对照品溶液 1 mL,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液;精密称取已知丹参酮 II_A 含量(1.13 mg·g⁻¹)的样品 6 份,每份约 0.37 g,各精密加入 0.462 g·L⁻¹ 丹参酮 II_A 对照品溶液 1 mL,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,见表 1。

表 1 疏经防痛胶囊中芍药苷、丹参酮 II_A 加样回收率试验

Table 1 Recovery experiments of paeoniflorin and tanshinone II_A

成分	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
芍药苷	0.329	0.468	0.796	99.79	99.89	1.5
	0.342	0.468	0.812	100.43		
	0.356	0.468	0.821	99.36		
	0.327	0.468	0.783	97.44		
	0.341	0.468	0.812	100.64		
	0.359	0.468	0.835	101.71		
丹参酮 II _A	0.561	0.462	1.018	98.92	100.43	1.1
	0.565	0.462	1.032	101.08		
	0.656	0.462	1.116	99.57		
	0.587	0.462	1.050	100.22		
	0.653	0.462	1.124	101.95		
	0.640	0.462	1.106	100.87		

2.6 样品测定 取 3 批样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果样品中芍药苷质量分数分别为 8.415, 8.214, 8.297 mg·g⁻¹, 丹参酮 II_A 质量分数分别为 1.006, 0.941, 0.956 mg·g⁻¹, 表明建立的含量测定方法稳定可靠。

3 讨论

采用 HPLC 测定芍药苷含量时,参照文献[6-8] 筛选色谱条件,分别考察了不同色谱柱型号和流动相比,结果不同型号的色谱柱对试验结果影响不大,流动相选择乙腈-0.05% 磷酸二氢钾溶液(15:

85)时,各峰分离效果较好且峰型对称性好;测定丹参酮 II_A 含量时,参照文献[9-11],考察了不同型号色谱柱和流动相比,结果确定 Diamonsil C₁₈(2) 色谱柱的分离效果较好,流动相选取甲醇-水(80:20) 时,分离效果较好且其他成分无干扰。

在样品处理过程中,分别对提取方法、提取溶媒、提取时间进行了考察。在芍药苷提取过程中^[12-13],分别以水,甲醇,50% 甲醇,95% 乙醇及稀乙醇为提取溶媒,提取时间考察了 5, 10, 15, 20, 25, 30 min,分别以静置、回流、超声、温浸作为提取方法进行考察,结果发现采用 50% 甲醇超声提取 15 min 时,效果最佳。同法对丹参酮 II_A 的提取进行考察,结果选择加甲醇超声处理 20 min 时效果较好。

[参考文献]

[1] 郑雪凌. 痛经及其药物治疗的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(8): 491-492.

[2] 张凯, 杨建宇, 李彦珍, 等. 痛经的经方研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(12): 152-155.

[3] 赵化国. 中药治疗原发性痛经 52 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 5(10): 179-180.

[4] 刘鹰翔, 王玉卓. 白芍的化学成分与药理研究进展[J]. 中草药, 1995, 26(8): 437.

[5] 艾青. 丹参化学成分及药理作用[J]. 中华医学杂志, 2003, 10(9): 847-849.

[6] 盛蓉, 宋英, 郑琰, 等. HPLC 测定止血消瘀胶囊中芍药苷的含量[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(1): 34-35.

[7] 王哲. HPLC 法测定心炎平胶囊中芍药苷的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2): 306-307.

[8] 倪立坚, 严锦贤, 郑笈, 等. HPLC 法测定透骨消痛胶囊中芍药苷的含量[J]. 福建中医药, 2014, 45(1): 50-51.

[9] 于百青, 杨敏, 孙鹏云. 高效液相色谱法测定心舒丸中丹参酮 II_A 含量[J]. 中国药业, 2012, 21(13): 36-37.

[10] 姚雪梅, 刁立春, 覃信满. 心舒丸中丹参酮 II_A 的含量测定方法改进[J]. 中国药物经济学, 2014, 18(9): 214-215.

[11] 孙娟, 吴宏丽. 通络活血胶囊中丹参酮 II_A 含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(6): 68-69.

[12] 谢晓梅, 廖自荣. 芍药中芍药苷提取方法的比较研究[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(2): 98-99.

[13] 于定荣, 顾雪竹, 张村, 等. 白芍中芍药苷提取工艺的对比研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 49-51.

[责任编辑 刘德文]