

# HPLC-DAD 同时测定脉管炎合剂 I 号中 4 种药效成分的含量

曾蔚欣<sup>1</sup>, 刘礼斌<sup>1</sup>, 段松冷<sup>1</sup>, 金锐<sup>1</sup>, 吴彬<sup>2</sup>, 杨丽<sup>2</sup>, 孙路路<sup>1\*</sup>

(1. 首都医科大学 附属北京世纪坛医院, 北京 100038;

2. 北京市食品药品监督管理局, 北京 100053)

**[摘要]** **目的:**建立 HPLC 同时测定脉管炎合剂 I 号中咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷 4 种主要药效成分含量的方法。**方法:**采用 Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 ℃, 咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的检测波长分别为 323, 230, 280, 334 nm。**结果:**咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的线性范围分别为 0.044 8~0.224 μg( $r=0.999\ 8$ ), 0.532 8~2.664 μg( $r=0.999\ 8$ ), 0.678 4~3.392 μg( $r=0.999\ 9$ ), 0.100 0~0.500 0 μg( $r=0.999\ 8$ ); 平均加样回收率分别为 100.67% (RSD 1.7%), 99.36% (RSD 0.9%), 101.50% (RSD 1.4%), 99.05% (RSD 1.1%)。**结论:**建立的 HPLC 方法简便、快速、可靠、重复性好, 为脉管炎合剂 I 号的质量控制提供了参考。

**[关键词]** 脉管炎合剂 I 号; 咖啡酸; 芍药苷; 黄芩苷; 蒙花苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0055-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020055

## Simultaneous Determination of Four Pharmacodynamic Constituents in Angeitides Mixture I by HPLC-DAD

ZENG Wei-xin<sup>1</sup>, LIU Li-bin<sup>1</sup>, DUAN Song-leng<sup>1</sup>, JIN Rui<sup>1</sup>, WU Bin<sup>2</sup>, YANG Li<sup>2</sup>, SUN Lu-lu<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;

2. Beijing Food and Drug Administration, Beijing 100053, China)

**[ Abstract ]** **Objective:** Establishment of HPLC-DAD determination of 4 major pharmacodynamic constituents of the mixture of coffee acid, paeoniflorin, baicalin, buddleoside, and the content of the main components of Angeitides mixture I. **Method:** The Agilent extend-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-0.5% aqueous solution of phosphoric acid with gradient elution at a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was kept at 25 ℃ and the detection wavelength of the coffee acid, paeoniflorin, baicalin, buddleoside was 323, 230, 280, 334 nm. **Result:** The calibration curves of caffeic acid, paeoniflorin, baicalin and buddleoside were linear in the range of 0.044 8-0.224 ( $r=0.999\ 9$ ), 0.532 8-2.664 μg ( $r=0.999\ 8$ ), 0.678 4-3.392 μg ( $r=0.999\ 9$ ), 0.100 0-0.500 0 μg ( $r=0.999\ 8$ ) and the average recoveries were 100.62% (RSD 1.7%), 99.36% (RSD 0.9%), 101.50% (RSD 1.4%), 99.05% (RSD 1.1%), respectively. **Conclusion:** The HPLC method is simple, fast, reliable and reproducible, providing a reference for quality control Angeitides mixture I.

**[ Key words ]** Angeitides mixture I; caffeic acid; paeoniflorin; baicalin; buddleoside

**[收稿日期]** 20150612(006)

**[基金项目]** 首都卫生发展科研专项(首发 2011-2008-01); 北京市医疗机构制剂标准评价体系及标准提高研究项目(Z121100000312005)

**[第一作者]** 曾蔚欣, 硕士, 副主任药师, 从事中药学、药品质量控制研究, Tel:010-63926342, E-mail: cindy\_zwx@sina.com

**[通讯作者]** \*孙路路, 主任药师, 副教授, 硕士生导师, 从事医院药学、临床药学研究, Tel:010-63926362, E-mail: sunlulu@263.net

脉管炎合剂 I 号是由蒲公英、赤芍、野菊花、黄芩等 11 味中药组成,具有活血化瘀,清热解毒的功效,用于治疗血栓性闭塞性脉管炎、静脉炎等。方中赤芍味苦、性微寒,功能清热凉血、活血化瘀,蒲公英味苦甘、性微寒,功擅清热解毒,消痈散结,共为君药;野菊花清热解毒消痈,黄芩清热燥湿解毒,是为臣药。该制剂的处方收载于北京市《医疗单位制剂规程》(1984 年版)中,原质量标准中仅有该制剂的性状描述及两类中药成分的理化鉴别方法,尚无主要药效成分的含量测定方法,无法有效的控制制剂质量<sup>[1]</sup>。咖啡酸具有止血、镇咳、祛痰、抗氧化、抗肿瘤等活性<sup>[2]</sup>,芍药苷具有降低血液黏度、抗血小板聚集、改善微循环、抗氧化、抗惊厥等多种生物学效应<sup>[3]</sup>,蒙花苷具有有抗炎、镇痛等药理学作用<sup>[4]</sup>,黄芩苷具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏、镇静降压、抗氧化等药理作用<sup>[5]</sup>。关于这 4 种成分的含量测定方法报道主要有高效液相色谱法、紫外分光光度法,其中高效液相色谱法的相关报道较多<sup>[6-10]</sup>。本研究建立了 HPLC-DAD 同时测定该合剂中咖啡酸、芍药苷、蒙花苷、黄芩苷 4 种主要药效成分的含量测定方法,为完善该制剂的质量标准提供了参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1260 系列高效液相色谱仪(包括自动进样器,真空脱气泵,四元泵,柱温箱,DAD 检测器,美国 Agilent 公司),AE24 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),KS-120D 型超声波清洗器(宁波科生仪器厂)。

**1.2 试药** 咖啡酸(批号 110885-200102),芍药苷(批号 110736-201136),黄芩苷(批号 110715-201117),蒙花苷(批号 111528-201308)对照品均购自中国食品药品检定研究院。脉管炎合剂 I 号由首都医科大学附属北京世纪坛医院制剂室配制(批号 20141204,20141205,20141206),磷酸、甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为双蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~3 min,5% A;3~13 min,5%~13% A;13~18 min,13%~20% A;18~25 min,20%~29% A;25~26 min,29%~5% A;26~30 min,5% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,DAD 检测波长为 323 nm(咖啡酸),230 nm(芍药苷),280 nm(黄芩苷),334 nm(蒙花苷),柱温 25 °C。

## 2.2 溶液的制备

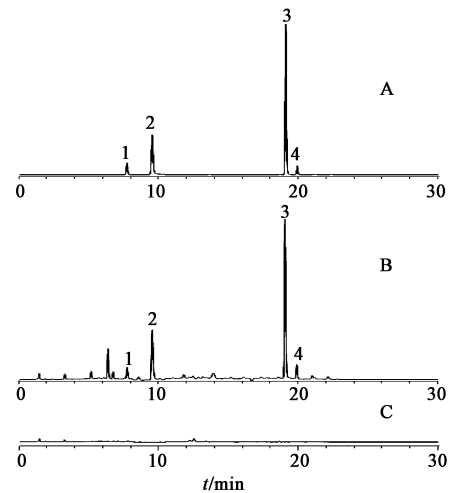
**2.2.1 混合对照品溶液** 精密称取咖啡酸、芍药苷、黄芩苷及蒙花苷对照品适量,加甲醇制成咖啡酸 22.4 mg·L<sup>-1</sup>,芍药苷 266.4 mg·L<sup>-1</sup>,黄芩苷 339.2 mg·L<sup>-1</sup>,蒙花苷 50.0 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液,保存于 4 °C 的冰箱中,备用。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取本品合剂 10 mL,精密量取,置 100 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,密塞,摇匀,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)15 min,放至室温,加甲醇补充至刻度,摇匀,离心,取上清液,置棕色瓶中,即得。

**2.2.3 阴性对照的制备** 除蒲公英、赤芍、黄芩、野菊花外,按处方比例精密称取所需各药材,按照脉管炎合剂 I 号的制备工艺制成阴性样品,按 2.2.2 项下方法制成阴性对照溶液。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 精密吸取混合对照品、供试品和阴性对照溶液各 5 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,结果阴性对照溶液无干扰。见图 1。



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 咖啡酸;2. 芍药苷;3. 黄芩苷;4. 蒙花苷

图 1 脉管炎合剂 I 号 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Angetides mixture I

**2.3.2 线性关系考察** 分别精密吸取上述混合对照溶液 2,3,5,8,10 μL 注入高效液相色谱仪中,按照 2.1 项下方法测定咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的峰面积。以对照品的进样量(μg)为横坐标(X),各成分的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的回归方程。结果见表 1。

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取上述混合对照品溶液 5 μL,按照 2.1 项下方法,连续进样 6 次,记录色

表 1 4 种成分的线性关系考察

Table 1 Results of linear relationships for 4 constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$
咖啡酸	$Y = 3\,529.6X + 6.7832$	0.999 8	0.044 8 ~ 0.224
芍药苷	$Y = 1\,366.6X - 8.0664$	0.999 8	0.532 8 ~ 2.664
黄芩苷	$Y = 2\,572.9X + 99.944$	0.999 9	0.678 4 ~ 3.392
蒙花苷	$Y = 1\,041X + 6.385$	0.999 8	0.100 0 ~ 0.500 0

谱峰面积。结果表明咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的峰面积 RSD 分别为 1.6% , 1.7% , 1.6% , 1.5% , 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批次脉管炎合剂 I 号(批号 20141204),按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,分别进样 5  $\mu\text{L}$  测定。结果咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的平均质量分数分别为 14.43, 184.66, 228.53, 47.77  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , RSD 分别为 1.7% , 0.3% , 0.2% , 1.4% , 表明该方法的重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取脉管炎合剂 I 号(批号 20141204),按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 5  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪,分别在 0,2,4,8,12,24 h 依次进样,记录色谱峰面积。结果咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的峰面积 RSD 分别为 1.4% , 0.6% , 0.5% , 2.1% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密吸取已知含量的脉管炎合剂 I 号(批号 20141204)9 份,每份 5 mL,分别精密加入咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的对照品溶液适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项色谱条件进行测定,计算咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的回收率以及 RSD,结果见表 2。

**2.3.7 样品含量测定** 精密吸取 3 批脉管炎合剂 I 号(批号 20141204, 20141205, 20141206),按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的含量,结果见表 3。

### 3 讨论

本实验分别考察了甲醇-0.5% 磷酸溶液、乙腈-0.5% 磷酸溶液的流动相系统<sup>[11-14]</sup>,考察了柱温分别为 25,30  $^{\circ}\text{C}$  时的分离情况,结果表明,采用乙腈-0.5% 磷酸溶液为流动相,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$  时,所得色谱分离度较好,出峰时间适宜,阴性对照无干扰。由于脉管炎合剂 I 号的药味较多,所含化学成分众多,很难在同一波长下短时间内对所有的药效成分进行有效分离<sup>[15-17]</sup>,因此,本实验通过一次性进样检测,提取

表 2 脉管炎合剂 I 号中 4 种成分的加样回收率

Table 2 Recoveries for 4 constituents in ANgeitides mixture

成分	样品中量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
咖啡酸	72.15	60.48	133.28	101.07	100.67	1.7
	72.15	60.48	133.51	101.46		
	72.15	60.48	133.79	101.92		
	72.15	76.16	150.51	102.89		
	72.15	76.16	146.09	97.09		
	72.15	76.16	147.62	99.09		
	72.15	91.84	164.33	100.37		
	72.15	91.84	165.41	101.55		
	72.15	91.84	164.56	100.62		
芍药苷	923.30	719.28	1 622.96	97.27	99.36	0.9
	923.30	719.28	1 638.03	99.37		
	923.30	719.28	1 646.08	100.49		
	923.30	905.76	1 827.41	99.82		
	923.30	905.76	1 819.65	98.96		
	923.30	905.76	1 831.36	100.25		
	923.30	1092.24	2 006.98	99.22		
	923.30	1092.24	2 009.32	99.43		
	923.30	1092.24	2 009.02	99.40		
黄芩苷	1 142.65	915.84	2 089.62	103.40	101.50	1.4
	1 142.65	915.84	2 076.64	101.98		
	1 142.65	915.84	2 073.06	101.59		
	1 142.65	1153.28	2 308.99	101.13		
	1 142.65	1153.28	2 293.75	99.81		
	1 142.65	1153.28	2 288.77	99.38		
	1 142.65	1390.72	2 546.69	100.96		
	1 142.65	1390.72	2 581.75	103.48		
	1 142.65	1390.72	2 557.89	101.76		
蒙花苷	238.85	200.0	433.5	97.33	99.05	1.1
	238.85	200.0	436.9	99.03		
	238.85	200.0	438.1	99.63		
	238.85	250.0	484.2	98.14		
	238.85	250.0	485.4	98.62		
	238.85	250.0	484.2	98.14		
238.85	300.0	539.5	100.22			
238.85	300.0	541.1	100.75			
238.85	300.0	537.6	99.58			

4 个波长的色谱图,使 4 种待测药效成分有效分离,从而达到同时进行含量测定的目的。

表 3 脉管炎合剂 I 号中 4 种成分的含量测定

样品	咖啡酸	芍药苷	黄芩苷	蒙花苷
20141204	148.6	1 841.6	2 287.7	484.4
20141205	141.9	1 846.0	2 286.7	471.9
20141206	146.2	1 831.5	2 253.9	468.8

综上,本实验以脉管炎合剂 I 号中的咖啡酸、芍药苷、黄芩苷、蒙花苷的含量为指标,通过高效液相色谱度洗脱,建立了同时测定以上 4 种药效成分的含量测定方法,经系统适应性试验和方法学考察,证明该方法快速、简便、重复性好、专属性高,可为脉管炎合剂 I 号的质量控制提供参考。

[参考文献]

[ 1 ] 北京市卫生局. 医疗单位制剂规程[M]. 1984;37.  
 [ 2 ] 李永胜,田瑜,郭鹏,等. 咖啡酸酯类生物物的合成及其生物活性研究[J]. 中草药, 2014, 45 ( 24 ): 3538-3542.  
 [ 3 ] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2) :100-103.  
 [ 4 ] 王伯涛,王锋,张同波,等. 反相高效液相色谱法测定野菊花中蒙花苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20 ( 1 ):166-169.  
 [ 5 ] 聂爱国. 黄芩的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(12) :119-120.  
 [ 6 ] 邢丽红. 近红外和紫外光谱法在痰热清注射液质控中的应用[D]. 杭州:浙江大学, 2011.  
 [ 7 ] 刘芬,侯聪聪. 紫外光谱法测定白芍药材中白芍总苷的含量[J]. 国际中医中药杂志, 2015, 37 ( 6 ):

532-534.

[ 8 ] 袁瑞娟,王贝贝,赵爽,等. 黄芩苷锌配合物的合成及其对宫颈癌 HeLa 细胞抑制作用[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(9) :625-628.  
 [ 9 ] 班丽娜,徐远金. HPLC/MS 同时测定双黄连口服液中的 4 种有效成分[J]. 中成药, 2012, 34 ( 2 ): 265-268.  
 [ 10 ] 顾瑶华,巢为农. UPLC-MS/MS 测定五味消炎灵含片中 5 种成分的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6) :578-580.  
 [ 11 ] 张峻颖,冯超,徐雪,等. HPLC 同时测定香蜂花药材中的 3 种有效成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24) :78-81.  
 [ 12 ] 陈红英,倪健,张辉. HPLC 测定复方野菊花含片中黄芩苷和蒙花苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10) :12-124.  
 [ 13 ] 张振凌,冯晟楠,贾利利,等. HPLC 同时测定黄连阿胶汤合煎液中芍药苷、黄芩苷、小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5) :75-77.  
 [ 14 ] 黄玮. HPLC 法测定银黄颗粒中黄芩苷、黄芩素、绿原酸和咖啡酸的含量[J]. 中国药师, 2013, 16 ( 10 ): 1516-1518  
 [ 15 ] 徐英宏,张娴,齐军,等. 乳腺增生丸质量标准研究[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(12) :1582-1585.  
 [ 16 ] 唐维宏,韦建华,马云婷,等. HPLC 测定密蒙花配方颗粒中蒙花苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20) :50-51.  
 [ 17 ] 何建雄,赖小平,魏刚,等. HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6) :48-50.

[责任编辑 顾雪竹]