

HPLC 测定丹芍方提取物中丹皮酚、芍药苷的含量

代丽萍*, 谢小龙, 鲁艳清, 王娟
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定丹芍方提取物中丹皮酚、芍药苷含量的方法。方法:采用 ODSHYPERASIL 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),乙腈-水梯度洗脱,柱温 32 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 230,274 nm。结果:丹皮酚、芍药苷分别在 0~0.202 1,0~27.960 0 μg 线性关系良好,平均回收率分别为 97.40%,101.35%,RSD 分别为 1.18%,0.48%。结论:3 批样品测定结果表明,建立的方法简便、准确、重复性好,可以用于丹芍方提取物中丹皮酚、芍药苷的含量测定。

[关键词] 丹芍方; 芍药苷; 丹皮酚; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)17-0127-03

[doi] 10.11653/syjf2013170127

Quantitative Determination of Paeonol and Paeoniflorin in Extraction of Danshao Formula by HPLC

DAI Li-ping*, XIE Xiao-long, LU Yan-qing, WANG Juan
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of HPLC for quantitative determination of paeonol and paeoniflorin in the extraction of Danshao Formula. **Method:** The separation was performed on the chromatographic column of ODS HYPERSIL (4.6 mm×250 mm, 5 μm), and the mobile phase in the gradient elution program was acetonitrile-water. The column temperature was maintained at 32 ℃. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 274 nm and 230 nm respectively. **Result:** Paeonol and paeoniflorin showed good linear relationship in the range of 0-0.202 1, 0-27.960 0 μg. The average recovery was 97.40% (RSD 1.18%), 101.35% (RSD 0.48%) respectively. **Conclusion:** The method is easy and accurate with higher repeatability, which can be used in the quality control of paeonol and paeoniflorin in the extraction of Danshao formula.

[Key words] Danshao formula; paeonol; paeoniflorin; HPLC

银屑病(牛皮癣)是一种炎症增生性皮肤病,属于复发性慢性病,临床危害较大。角质细胞增生、血管增生和炎症是银屑病发病机制之一,其主要病理表现为角质形成细胞异常增殖、分化不全及局部炎症细胞浸润炎症等^[1-3]。丹芍方由赤芍、牡丹皮、大黄 3 味药组成。赤芍、牡丹皮清热凉血、活血化瘀,以改善微循环、增强血流速度,并可改善老年性皮肤瘙

痒^[4-5]。体外实验表明二者均可显著抑制表皮细胞的增殖,可抑制角质细胞的增生并具有一定的抗氧化作用^[5-6]。本文采用 HPLC 法建立了丹芍方提取物中 2 种主要有效成分的含量测定方法,为丹芍方质量标准的建立提供依据。

1 材料

Waters 1515-2487-717 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),2996PDA 检测器,Empower 工作站,KQ-500DV 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司),SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),BS21S 型分析天平(德国赛多利斯 Sartorius)。

乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析

[收稿日期] 20130219(002)

[基金项目] 河南省教育厅重点研究项目(12A360001);河南中医学院博士基金项目(BSJ2010-02)

[通讯作者] *代丽萍,博士,副教授,从事中药质量评价与物质基础研究, Tel: 0371-65680041, E-mail: zzdai@163.com

纯。丹皮酚对照品(批号 110708-200506, 中国药品生物制品检定所), 芍药苷对照品(自制, HPLC 面积归一化测定纯度为 98.76%)。大黄药材、赤芍药材、丹皮药材均购自北京同仁堂饮片有限责任公司, 经河南中医学院生药学科代丽萍副教授鉴定赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根。大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根和根茎。牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。丹芍方提取物为本课题组制备(样品批次编号分别为 20111108, 20111123, 20110129)。

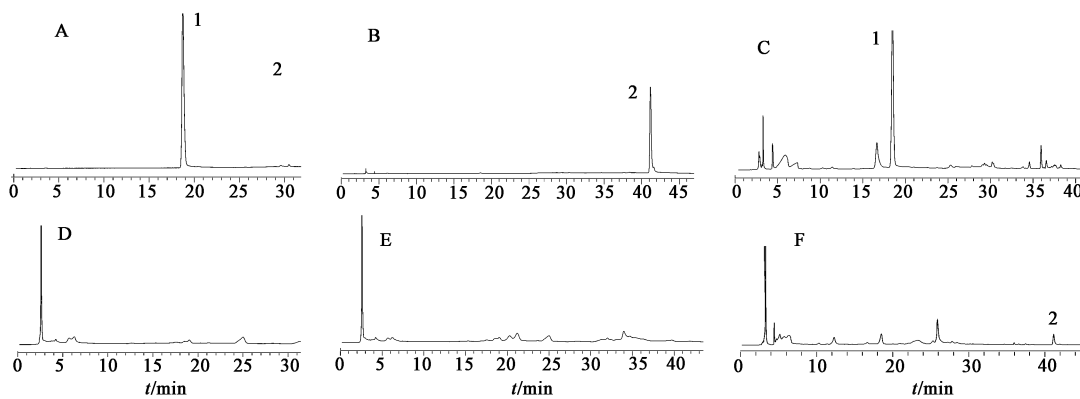
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别取干燥至恒重的丹皮酚、芍药苷对照品, 精密称定分别为 4.21, 11.65 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 $2.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液和丹皮酚

对照品储备溶液, 精密移取上述丹皮酚对照品储备溶液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成质量浓度为 $0.01684 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丹皮酚对照品溶液, 将上述对照品溶液保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 备用。

2.2 样品溶液的制备 取丹芍方提取物约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 精密称定质量, 超声提取 3 次(功率 500 W, 频率 50 kHz), 每次 30 min, 放冷, 精密称定, 用甲醇补足减失的质量。摇匀, 静置, 过 $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。同法制备去赤芍、丹皮阴性对照溶液。

2.3 色谱条件 ODSHYPERSIL 色谱柱 ($4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 流动相乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱($0\sim 10 \text{ min}, 10\%\sim 15\% \text{ A}; 10\sim 20 \text{ min}, 15\%\sim 20\% \text{ A}; 20\sim 30 \text{ min}, 20\%\sim 35\% \text{ A}; 30\sim 35 \text{ min}, 35\%\sim 45\% \text{ A}; 35\sim 40 \text{ min}, 45\%\sim 50\% \text{ A}$), 流速 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 230, 274 nm。上述色谱条件下, 各组分离度良好, 阴性对照无干扰, 见图 1。



A. 230 nm 芍药苷对照品溶液; B. 274 nm 丹皮酚对照品溶液; C. 230 nm 供试品溶液; D. 230 nm 阴性对照溶液; E. 274 nm 阴性对照溶液; F. 274 nm 供试品溶液; 1. 芍药苷; 2. 丹皮酚

图 1 丹芍方提取物高效液相色谱

2.4 线性关系考察 分别精密吸取丹皮酚对照品溶液、芍药苷对照品溶液 0, 2, 6, 8, 10, 12 μL , 按上述色谱条件注入液相色谱仪, 进样分析, 每个浓度进样 3 次, 取平均值。以对照品的量为横坐标, 以对照品色谱峰面积为横坐标进行线性回归处理, 结果见表 1。

表 1 丹芍方提取物中 2 种成分的回归方程和线性范围

| 对照品 | 回归方程 | 线性范围/ μg | r |
|-----|-------------------------|---------------------|--------|
| 丹皮酚 | $Y = 5.277119X - 2.180$ | $0 \sim 0.2021$ | 0.9993 |
| 芍药苷 | $Y = 88.263X + 20.586$ | $0 \sim 27.9600$ | 0.9998 |

2.5 精密度试验 取丹芍方提取物按照 2.2 项下制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 15 μL , 于同

一天内连续进样 6 次, 测得丹皮酚、芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.29%, 1.31%, 日内精密度良好, 表明仪器较为稳定。

2.6 稳定性试验 取丹芍方提取物按照 2.2 项下制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 15 μL 分别在配制后 0, 2, 4, 8, 12, 18 h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算得丹皮酚、芍药苷稳定性的 RSD 分别为 1.64%, 1.98%, 表明处理后的样品在 18 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批次丹芍方提取物 6 份, 精密称定, 按照 2.2 项下制备供试品溶液, 测定丹皮酚、芍药苷的含量, 计算平均含量分别为 0.2307, 38.0835 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.82%, 1.63%。

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的样品 5 份,每份约 45 mg,精密称定,分别精密加入 2.1 项下丹皮酚、芍药苷对照品溶液 1 000,700 μL ,按照 2.2 项

下制备供试品溶液,测定,计算加样回收率。结果见表 2,表明回收率良好。

表 2 丹芍方提取物中 2 种成分加样回收率试验

| 对照品 | 称样量/mg | 含量/mg | 加入量/mg | 检出量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|-----|--------|----------|----------|----------|--------|---------|-------|
| 丹皮酚 | 45.41 | 0.010 48 | 0.016 84 | 0.027 01 | 98.88 | 97.40 | 1.18 |
| | 45.42 | 0.010 48 | 0.016 84 | 0.026 25 | 96.09 | | |
| | 45.5 | 0.010 50 | 0.016 84 | 0.026 39 | 96.54 | | |
| | 45.02 | 0.010 39 | 0.016 84 | 0.026 74 | 98.21 | | |
| | 45.6 | 0.010 52 | 0.016 84 | 0.026 62 | 97.30 | | |
| 芍药苷 | 45.41 | 1.729 4 | 1.631 | 3.400 2 | 101.19 | 101.35 | 0.48 |
| | 45.42 | 1.729 8 | 1.631 | 3.390 8 | 100.89 | | |
| | 45.5 | 1.732 8 | 1.631 | 3.402 3 | 101.14 | | |
| | 45.02 | 1.714 5 | 1.631 | 3.390 9 | 101.36 | | |
| | 45.6 | 1.736 6 | 1.631 | 3.440 2 | 102.16 | | |

2.9 样品测定 称取 3 批次丹芍方提取物各 3 份,每份约 1 g,精密称定,按 2.2 项下制备供试品溶液,按样品测定项下方法测定峰面积,计算样品含量,结果见表 3。

表 3 3 批次样品中 2 种成分的含量测定($n=3$)

| 批次 | 丹皮酚 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD /% | 芍药苷 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD /% |
|----|--|-----------|--|-----------|
| 1 | 0.16 | 2.91 | 30.51 | 1.31 |
| 2 | 0.23 | 1.84 | 38.15 | 1.56 |
| 3 | 0.26 | 2.27 | 38.02 | 2.04 |

3 讨论

本研究建立的方法在最大吸收波长处分别测定了丹芍方提取物中芍药苷、丹皮酚两种主要有效成分的含量,增加了检测方法的灵敏度。考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸水不同的洗脱体系,建立的乙腈-水梯度洗脱体系芍药苷、丹皮酚 2 种成分实现了基线分离,保留时间适中,阴性对照无干扰^[7-11],本研究建立的方法为丹芍方质量标准的建立提供了参考。

[参考文献]

- [1] 刘晓明,孙秀坤,齐欣,等. 20 种中药灌胃对小鼠上皮细胞增殖和表皮细胞分化及血浆内皮素-1 的影响[J]. 中华皮肤科杂志,2001, 34(4):282.
- [2] 张云璧,瞿幸,牛福玲. 常用治疗银屑病的中药对肿

瘤坏死因子- α 刺激后角质形成细胞生长及分泌白介素-8 的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊,2006, 5(1):18.

- [3] 刘欣,李萍,赵京霞,等. 凉血活血胶囊全方及拆方对 Jurkat T 淋巴细胞增殖、活化及释放细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):198.
- [4] 黄茂芳,刘玉梅,朱慧兰,等. 丹皮酚软膏对老年性皮肤瘙痒症免疫偏移的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(14):2928.
- [5] 吴晓慧,吴国荣,张卫明,等. 丹皮酚及其磺化物体外抗氧化作用[J]. 南京师大学报:自然科学版,2005, 28(3):83.
- [6] 刘雁丽,韦柳成,沈振国,等. 丹皮酚的药理作用、提取及含量测定方法研究进展[J]. 安徽医药,2011, 15(7):896.
- [7] 吕士杰,李妍,芦晓晶,等. HPLC 测定芩丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):81.
- [8] 代丽萍,石任兵. HPLC-PDA 法测定芪芍方有效部位中葛根素、大豆苷、芍药苷的含量[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(3):200.
- [9] 王巧,刘荣霞,毕开顺,等. HPLC 法测定白芍总苷胶囊中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷[J]. 中草药,2005,36(11):1630.
- [10] 向楚兵,刘友平,陈鸿平,等. 赤芍二基源药材的 HPLC 指纹图谱鉴别及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):43.
- [11] 冯兵,陈婷,赵瑞芝,等. HPLC 测定复方昆丹胶囊中芍药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):112.

[责任编辑 顾雪竹]