

HPLC 测定活络效灵颗粒中芍药苷和丹酚酸 B 的含量

宋志前, 王超, 王淳, 夏磊, 李青, 刘振丽*
(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立测定活络效灵颗粒中 2 种有效成分芍药苷和丹酚酸 B 含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, 芍药苷以 Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (10:90) 为流动相, 检测波长 230 nm, 柱温为 40 °C, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。丹酚酸 B 以 Zorbax Extend-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-乙腈-0.5% 甲酸 (22:10:68) 为流动相, 检测波长 286 nm, 柱温为 25 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 芍药苷和丹酚酸 B 分别在 0.084 4 ~ 0.928 4 μg ($r=0.999\ 8$) 和 0.226 ~ 2.034 μg ($r=0.999\ 9$) 线性关系良好; 平均回收率分别为 100.4% (RSD 2.30%) 和 100.7% (RSD 2.73%)。结论: 该方法简便易行、重复性好, 可用于活络效灵颗粒中芍药苷和丹酚酸 B 含量测定。

[关键词] 活络效灵颗粒; 芍药苷; 丹酚酸 B; 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(2011)19-0064-04

Content Determination of Paeoniflorin and Salvianolic Acid B in Huoluoxiaoling Granules by HPLC

SONG Zhi-qian, WANG Chao, WANG Chun, XIA Lei, LI Qing, LIU Zhen-li*

(Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for the content determination of paeoniflorin and salvianolic acid B in Huoluoxiaoling granules. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of paeoniflorin and salvianolic acid B. The column for paeoniflorin is Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). The mobile phase is consisted of acetonitrile-water (10:90) with the detection wavelength at 230 nm. The column temperature was at 40 °C and the flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The column for salvianolic acid B is Zorbax Extend-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). The mobile phase is consisted of methanol-acetonitrile-0.1% formic acid (22:10:68) with the detection wavelength at 286 nm. The column temperature was at 25 °C and the flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** There was good linearity between the peak area and concentration within the range of 0.084 4 - 0.928 4 μg ($r=0.999\ 8$) for paeoniflorin and 0.226-2.034 μg ($r=0.999\ 9$) for salvianolic acid B respectively. The average recoveries of paeoniflorin and salvianolic acid B were 100.4% (RSD 2.30%) and 100.7% (RSD 2.73%) respectively ($n=6$). **Conclusion:** The method is simple, accurate and specific for quality control of Huoluoxiaoling granules.

[Key words] Huoluoxiaoling granules; paeoniflorin; salvianolic acid B; HPLC

活络效灵颗粒是在张锡纯活络效灵丹的基础上加减而成的中药复方制剂, 由赤芍、丹参、乳香、当归

等 11 味中药组成, 是治疗骨痹的良方^[1]。芍药苷为君药赤芍中的主要有效成分, 丹酚酸 B 为臣药丹参中主要有效成分。为了更好地评价活络效灵颗粒质量, 本文建立了活络效灵颗粒中芍药苷和丹酚酸 B 的含量测定方法, 为其质量标准的制订提供参考。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, G1379A 型脱气机, G1311A 型四元泵, G1313A 型自动进样器,

[收稿日期] 2011-06-03

[基金项目] 国家重大科技专项 (2009ZX09103-314)

[通讯作者] * 刘振丽, 研究员, 研究方向: 中药质量标准, Tel: 010-64014411-2503, E-mail: zhenli_liu@sina.com.cn

G1316A 型恒温箱,G1315B DAD 检测器,HP 化学工作站。TCQ-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂);Sartorius CP 225D 型电子天平。活络效灵颗粒为药厂中试产品(批号 101028,101104,101112)。赤芍、丹参阴性样品(制备工艺同活络效灵颗粒)。芍药苷对照品(批号 110736-200423,含量测定用),丹酚酸 B 对照品(批号 111562-200807,含量测定用)购于中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),甲醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司),磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 取经五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为芍药苷对照品溶液;取丹酚酸 B 对照品适量,精密称定,加 75% 甲醇制成每 1 mL 含 0.14 mg 的溶液,作为丹酚酸 B 对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

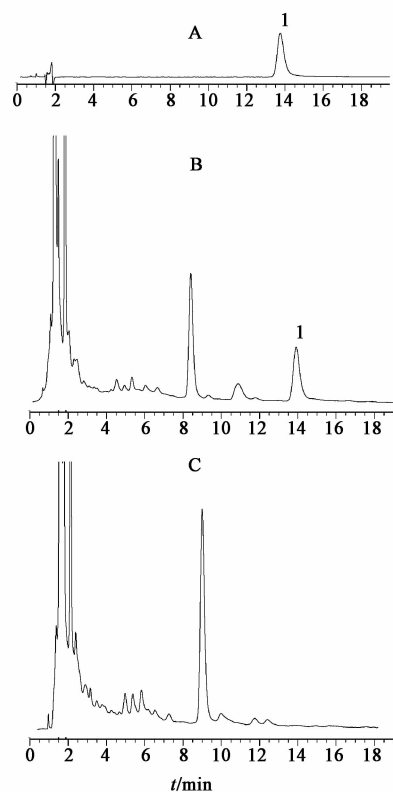
2.2.1 芍药苷含量测定用供试品溶液制备 取供试品颗粒,研细,取约 1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 丹酚酸 B 含量测定用供试品溶液制备 取供试品颗粒,研细,取约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 mL,称定质量,回流提取 45 min,放冷,再称定质量,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例及制备工艺,分别制备不含赤芍、丹参的阴性对照品,并依 2.2 项下供试品溶液的制备方法分别制成阴性对照溶液。

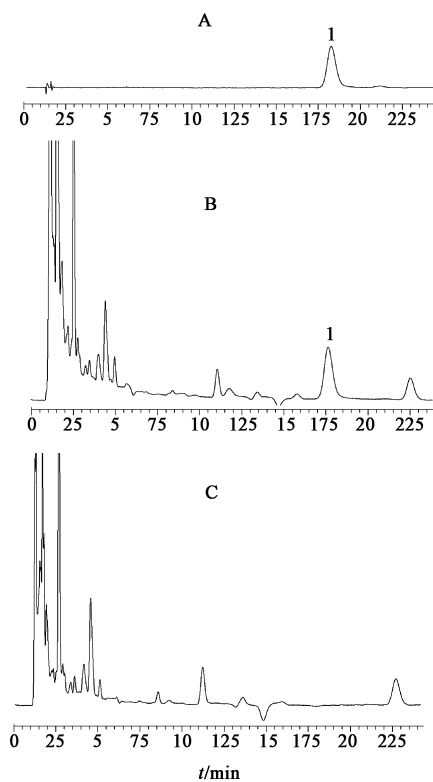
2.4 色谱条件 芍药苷以 Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-水(10:90)为流动相,检测波长 230 nm,柱温 40 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹。丹酚酸 B 以 Zorbax Extend-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以甲醇-乙腈-0.5% 甲酸(22:10:68)为流动相,检测波长 286 nm,柱温 25 °C,流速 1 mL · min⁻¹。对照品、供试品及阴性见图 1,2。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取芍药苷对照品溶液(0.084 4 g · L⁻¹)1,3,5,7,9,11 μL,丹酚酸 B



A. 芍药苷对照品;B. 供试品;C. 赤芍阴性;1. 芍药苷

图 1 芍药苷 HPLC



A. 对照品;B. 供试品;C. 丹参阴性;1. 丹酚酸 B

图 2 丹酚酸 B HPLC

对照品溶液(0.226 g·L⁻¹)1,3,5,7,9 μL,注入液相色谱仪,以 2.4 色谱条件测定,进行线性回归,得芍药苷和丹酚酸 B 回归方程分别为 $Y = 1\ 072.9X - 2.733\ 8$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 117.44X - 7.795$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围分别为 0.084 4 ~ 0.928 4 μg, 0.226 ~ 2.034 μg。

2.6 精密度试验 分别取同一供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次。结果芍药苷和丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.56%, 0.52%。

2.7 重复性试验 取同一批号活络效灵颗粒(批号 101101),按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,测定,计算含量。结果芍药苷和丹酚酸 B 含量的 RSD

分别为 2.63%, 1.02%, 表明重复性良好。

2.8 回收率试验 采用加样回收法。取已知含量的活络效灵颗粒(批号 101101),精密称取 6 份,每份 0.75 g,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入芍药苷对照品溶液,依照 2.2.1 项下供试品溶液制备方法,制成供试品溶液,测定;另取已知含量的活络效灵颗粒(批号 101101),精密称取 6 份,每份 1.0 g,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入丹酚酸 B 对照品溶液,依照 2.2.2 项下供试品溶液制备方法,制成供试品溶液,测定。结果芍药苷平均回收率为 100.4%, RSD 2.30%;丹酚酸 B 的平均回收率为 100.7%, RSD 2.73%,见表 1,2。

表 1 芍药苷加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.787 9	1.749	1.772	3.598	104.3		
2	0.749 3	1.663	1.772	3.389	97.4		
3	0.732 4	1.626	1.772	3.384	99.2		
4	0.737 9	1.638	1.772	3.409	99.9	100.4	2.3
5	0.747 3	1.659	1.772	3.450	101.1		
6	0.746 5	1.657	1.772	3.439	100.6		

表 2 丹酚酸 B 加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	1.000 4	5.595	5.472	11.100	100.6		
2	1.006 8	5.631	5.472	11.322	104.0		
3	0.999 8	5.591	5.472	11.119	101.0		
4	0.969 6	5.423	5.472	10.676	96.0	100.7	2.7
5	1.004 9	5.620	5.472	11.076	99.7		
6	1.001 8	5.603	5.472	11.218	102.6		

2.9 供试品含量测定 取活络效灵颗粒(批号 101101,101102,101103),按 2.2 项下供试品处理方法处理,测定芍药苷和丹酚酸 B 含量,见表 3。

表 3 3 批中试成品中芍药苷和丹酚酸 B 含量

批次	芍药苷		丹酚酸 B	
	含量/mg·g ⁻¹	RSD/%	含量/mg·g ⁻¹	RSD/%
101101	2.220	2.6	5.593	1.0
101102	2.158	2.6	5.712	1.1
101103	2.065	1.2	5.432	1.5

3 讨论

现代研究表明,不同植物来源、不同地区产的赤

芍和丹参中芍药苷、丹酚酸 B 等成分有较大的差异^[2-3]。芍药苷和丹酚酸 B 是活络效灵颗粒中的主要有效成分,因此建立其含量测定方法,可以有效控制制剂的质量。根据 2 种成分不同的光谱特征及供试品制备方法,建立了 2 个紫外检测波长下,用 2 种流动相分别测定芍药苷和丹酚酸 B 含量的方法。研究表明,该方法可以用于活络效灵颗粒的质量控制。

关于中药制剂中芍药苷和丹酚酸 B 的含量测定方法已有报道^[4-5],但由于活络效灵颗粒处方组成药味较多,化学组成复杂,色谱分离难度较大。芍药苷

左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂 吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量比较

张欣¹, 靳风云^{1*}, 梁光义^{1,2}, 贺祝英¹, 章誉¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 比较左金丸传统汤剂、复方颗粒剂与配方颗粒剂中吴茱萸碱和次碱的含量差异。方法: 采用 HPLC 测定传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量, 并对含量测定的方法进行了考察。结果: HPLC 测定吴茱萸碱和次碱在传统汤剂中总质量分数为 $0.7380 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 在复方颗粒剂中总质量分数为 $1.3790 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 在配方颗粒剂中总质量分数为 $0.2259 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 左金丸传统汤剂、复方颗粒剂、配方颗粒剂吴茱萸碱和吴茱萸次碱总质量分数差异较大: 复方颗粒剂 > 传统汤剂 > 配方颗粒剂。

[关键词] 高效液相色谱; 左金丸; 传统汤剂; 复方颗粒剂; 配方颗粒剂; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0067-05

Comparison the Content of Evodiamine and Rutaecarpine from Compatible Granule, Compound Granule and Traditional Decoction of Zuojin Pills

ZHANG Xin¹, JIN Feng-yun^{1*}, LIANG Guang-yi¹, HE Zhu-ying¹, ZHANG Yu¹

[收稿日期] 20110422(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860364)

[第一作者] 张欣, 硕士, 从事新药研发及质量控制, E-mail: huangbianni@sina.com, Tel: 15285167091

[通讯作者] * 靳风云, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药质量控制与新药开发

含量测定色谱条件, 通过全波长扫描确定了 230 nm 为合适的检测波长, 并考察了不同比例流动相乙腈-水以及柱温的影响, 最后确定了色谱条件; 丹酚酸 B 含量测定色谱条件, 通过全波长扫描确定了检测波长 286 nm, 考察了不同比例流动相甲醇-乙腈-1% 甲酸和甲醇-乙腈-0.5% 甲酸以及柱温的影响, 最后确定色谱条件。在该色谱条件下, 色谱峰不拖尾, 分离度好, 阴性无干扰。

供试品溶液制备中考察了提取溶剂和处理方法, 显示芍药苷采用甲醇提取比无水乙醇和 50% 甲醇提取率高, 超声提取与回流提取无显著差异; 而丹酚酸 B 采用 75% 甲醇提取较甲醇和无水乙醇提取率高, 回流提取显著高于超声提取。因此, 确定测定芍药苷时采用甲醇超声提取; 测定丹酚酸 B 时采用 75% 甲醇回流提取。

[参考文献]

- [1] Lao L, Fan A Y, Zhang R X, et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of the modified Chinese herbal formula Huoluoxiaolingdan (HLXL) in rats [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2006, 34 (5): 833.
- [2] 林海, 胡黎. 不同产地赤芍中芍药苷的含量测定 [J]. 中国医药指南, 2009, 7(16): 91.
- [3] 邓寒霜, 李筱玲, 王凯. 不同产地丹参饮片质量研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3105.
- [4] 王德杭, 黄有带, 景运条, 等. 正交试验法优选金芍胶囊的水提工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (14): 23.
- [5] 刘元, 莫海涛, 宋志钊, 等. HPLC 法测定千斤脑康宁胶囊中丹酚酸 B 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 37.

[责任编辑 蔡仲德]