

# HPLC 测定柴芍丸中芍药苷、栀子苷及丹皮酚的含量

孟宪波\*, 郑晖

(淄博市药品检验所, 淄博 255086)

[摘要] 目的:建立以高效液相色谱法同时测定柴芍丸中芍药苷、栀子苷及丹皮酚含量的方法。方法:色谱柱为 Inertsil ODS-SP(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水梯度洗脱, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果:芍药苷在 0.494 4 ~ 12.36 μg ( $r=1$ ) 线性关系良好, 平均回收率为 98.77%, RSD 2.1%; 栀子苷在 0.492 2 ~ 12.305 μg ( $r=0.999 9$ ) 线性关系良好, 平均回收率 101.64%, RSD 1.9%; 丹皮酚在 0.260 2 ~ 6.505 μg, ( $r=0.999 9$ ) 线性关系良好, 平均回收率 100.92%, RSD 1.7%。结论:方法简便、快速、重复性好, 可用于柴芍丸的质量控制。

[关键词] 柴芍丸; 芍药苷; 栀子苷; 丹皮酚; 含量测定; 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)17-0072-03

## Determination of Paeoniflorin, Geniposide and Paeonol in Chaishao Pills by HPLC

MENG Xian-bo\*, ZHENG Hui

(Zibo Institute for Drug Control, Zibo 255086, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of paeoniflorin, geniposide and paeonol in Chaishao Pills. **Method:** Paeoniflorin, geniposide and paeonol were separated on Inertsil ODS-SP (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column and detected at 230 nm. The mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** Paeoniflorin, geniposide and paeonol were linear within the range of 0.494 4-12.36 μg ( $r=1$ ), 0.492 2-12.305 μg ( $r=0.999 9$ ) and 0.260 2-6.505 μg, ( $r=0.999 9$ ) respectively. The average recovery was 98.77% (2.1%), 101.64% (1.9%) and 100.92% (1.7%). **Conclusion:** The method is simple, reproducible, and it can be used for the quality control of Chaishao pills.

[Key words] Chaishao pills; paeoniflorin; geniposide; paeonol; determination; HPLC

柴芍丸为一中药复方制剂,由柴胡、白芍、香附、 栀子、牡丹皮、当归、茯苓等 11 味药组成,具有疏肝

[收稿日期] 20110317(006)

[通讯作者] \* 孟宪波, Tel:13506441422, E-mail:sevine@126.com

- [4] 周向荣,夏延斌,周跃斌,等. 藟头的主要功能性成分及其作用的研究进展[J]. 食品与机械, 2006, 22(3):73.
- [5] 周祖文. 影响中药微量元素的相关因素研究概况[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19(1):66.
- [6] 祁俊生,徐辉碧,周井炎,等. 稀土元素与中药药性关系研究[J]. 计算机与应用化学, 2000, 17(2):182.
- [7] 尹海波,张囡,罗宏,等. 不同产地牻牛儿苗无机元素的主成分分析和聚类分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15):1935.
- [8] 李瑞芬,叶明德. 中草药中微量元素铁锰锌铜镉的形态分析[J]. 微量元素与健康研究, 2010, 27(2):19.
- [9] 严寒静,房志坚. 不同产地何首乌无机元素的含量测定和主成分分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4):416.

[责任编辑] 蔡仲德

清热,养血健脾的功效;主要用于肝郁生热、脾弱血虚证。方中白芍养血敛阴,柔肝缓急;栀子清散肝经之郁热,并引热下行;牡丹皮清泻血中之伏火,三者均发挥重要作用。芍药苷具有保肝<sup>[1]</sup>、促进造血细胞增殖<sup>[2]</sup>等广泛的药理作用;栀子苷具有保肝利胆<sup>[3]</sup>、降血脂及抗血栓<sup>[4]</sup>等药理作用;丹皮酚具有抗菌<sup>[5]</sup>、抗炎<sup>[6]</sup>、抗血小板聚集<sup>[7]</sup>等药理作用,三者均为主要活性成分。故采用高效液相色谱法,对该制剂中白芍及牡丹皮所含的芍药苷、栀子所系的栀子苷和牡丹皮所含的丹皮酚进行了含量测定,以便为控制该制剂的质量提供依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** LC-20AT型高效液相色谱仪,SPD-20A型UV/VIS检测器(日本岛津公司),METTLER AE240型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),KS-300E超声波清洗机(宁波科生仪器厂)。

**1.2 试药** 芍药苷(批号110736-200933,含量以98.1%计算)、栀子苷(批号110749-200714)、丹皮酚对照品(批号110708-200506)均购自中国药品生物制品检定所;柴芍丸3批,批号分别为20100414,20100520,20100608;乙腈为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Inertsil ODS-SP(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈, B 为水,梯度洗脱程序为 0~5 min 10% A, 5~35 min 10%~30% A, 35~45 min 30% A;检测波长 230 nm,流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃。理论板数按芍药苷峰计算不低于 5 000。

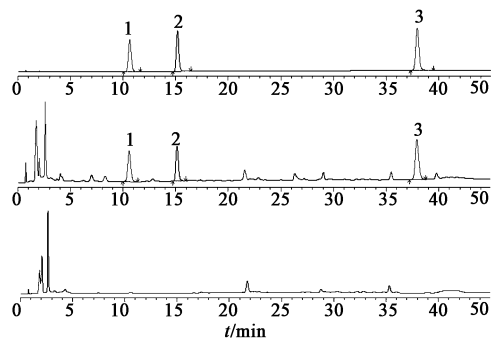
### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 分别取芍药苷对照品、栀子苷对照品和丹皮酚对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 各含 0.494 4, 0.492 2, 0.260 2 mg 的混合溶液,即得。

**2.2.2 供试品溶液** 取本品适量,研细,取约 5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 220 W,频率 33 kHz) 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。

**2.2.3 阴性对照溶液** 取处方中除白芍、栀子和牡丹皮外的其他药味,按柴芍丸制备方法制成阴性样品,按 2.2.2 项下方法操作,制备阴性对照溶液。

**2.3 专属性试验** 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品中芍药苷、栀子苷和丹皮酚色谱峰与相应对照品色谱峰保留时间一致,其他组分对测定无干扰(图 1)。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照;  
1. 栀子苷; 2. 芍药苷; 3. 丹皮酚

图 1 柴芍丸高效液相色谱图

**2.4 线性关系考察** 精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20, 25 μL, 以 2.1 项下色谱条件进样,测定峰面积。以对照品量  $X$  为自变量,峰面积  $Y$  为因变量,得芍药苷回归方程  $Y = 1 \times 10^6 X - 73\ 338$  ( $r = 1$ ); 栀子苷回归方程  $Y = 1 \times 10^6 X - 39\ 564$  ( $r = 0.999\ 9$ ); 丹皮酚回归方程  $Y = 3 \times 10^6 X + 4\ 162$  ( $r = 0.999\ 9$ )。表明芍药苷、栀子苷和丹皮酚分别在 0.494 4 ~ 12.36, 0.492 2 ~ 12.305, 0.260 2 ~ 6.505 μg, 线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 分别精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,计算芍药苷、栀子苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.21%, 0.26%, 0.30%。表明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取同一批(20100414)供试品 6 份,分别按 2.2.2 项下方法制备,以 2.1 项下色谱条件进样 10 μL,结果芍药苷平均质量分数为 2.192 7 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.58%; 栀子苷平均质量分数为 2.212 6 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.2%; 丹皮酚平均质量分数为 1.328 0 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.55%。表明本法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,按 2.2.2 项下方法制备,以 2.1 项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样 10 μL,测定芍药苷、栀子苷和丹皮酚的峰面积, RSD 分别为 0.43%, 1.1%, 0.79%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.8 加样回收试验** 取同一批(批号 20100414,芍

芍药苷、栀子苷和丹皮酚质量分数分别为 $2.1855 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $2.2181 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $1.3240 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 供试品适量, 精密称定, 共 6 份, 分别精密加入对照品溶液 5 mL 及甲醇 25 mL, 按 2.2.2 项下方法制备, 以 2.1 项下色谱条件进样 20  $\mu\text{L}$ , 测定芍药苷、栀子苷和丹皮酚的含量。结果表明, 本法的准确度较好(表 1)。

表 1 柴芍丸加样回收试验

| 化合物 | 样品中<br>含量<br>/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均值<br>/% | RSD<br>/% |
|-----|------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 芍药苷 | 2.633 1          | 2.472 0    | 5.055 7    | 98.00     | 98.77     | 2.1       |
|     | 2.645 8          | 2.472 0    | 5.147 4    | 101.20    |           |           |
|     | 2.619 8          | 2.472 0    | 4.986 6    | 95.74     |           |           |
|     | 2.600 5          | 2.472 0    | 5.009 8    | 97.46     |           |           |
|     | 2.667 0          | 2.472 0    | 5.148 3    | 100.35    |           |           |
|     | 2.666 1          | 2.472 0    | 5.134 3    | 99.85     |           |           |
| 栀子苷 | 2.672 4          | 2.461 0    | 5.176 5    | 101.75    | 101.64    | 1.9       |
|     | 2.685 2          | 2.461 0    | 5.165 5    | 100.78    |           |           |
|     | 2.658 8          | 2.461 0    | 5.184 3    | 102.62    |           |           |
|     | 2.639 3          | 2.461 0    | 5.179 9    | 103.23    |           |           |
|     | 2.707 4          | 2.461 0    | 5.245 8    | 103.15    |           |           |
|     | 2.705 9          | 2.461 0    | 5.126 1    | 98.34     |           |           |
| 丹皮酚 | 1.595 2          | 1.301 0    | 2.898 1    | 100.15    | 100.92    | 1.7       |
|     | 1.602 8          | 1.301 0    | 2.941 0    | 102.86    |           |           |
|     | 1.587 1          | 1.301 0    | 2.865 0    | 98.22     |           |           |
|     | 1.575 4          | 1.301 0    | 2.887 5    | 100.85    |           |           |
|     | 1.616 1          | 1.301 0    | 2.945 4    | 102.17    |           |           |
|     | 1.615 1          | 1.301 0    | 2.932 8    | 101.28    |           |           |

2.9 样品测定 取不同批号的样品, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定(表 2)。

表 2 柴芍丸样品成分测定

| 批号       | 芍药苷     | 栀子苷     | 丹皮酚     |
|----------|---------|---------|---------|
| 20100414 | 2.185 5 | 2.218 1 | 1.324 0 |
| 20100520 | 2.170 8 | 2.427 6 | 1.363 3 |
| 20100608 | 2.147 2 | 2.234 5 | 1.328 2 |

### 3 讨论

本实验中曾以乙腈-水为流动相以同比例进行试验, 但因丹皮酚与芍药苷、栀子苷的极性相差较大, 无法获得较好的分离效果。后采用以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 获得了较好的分离效果。

参考有关文献<sup>[8-10]</sup>, 芍药苷、栀子苷和丹皮酚的测定波长多分别采用 230, 238, 274 nm。试验中发现, 在 274 nm 波长处, 芍药苷和栀子苷吸收强度较弱, 故采用 230 nm 作为测定波长, 3 者的吸收峰均较好。

试验中采用甲醇作为提取溶媒, 对不同超声处理时间进行了对比, 试验结果表明超声处理 30 min 已提取完全, 因此选择超声处理 30 min 用于供试品溶液的提取。

### [参考文献]

- [1] Liu D F, Wei W, Song L H. Protective effect of paeoniflorin on immunological liver injury induced by bacillus Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide modulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 mRNA [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(4): 332.
- [2] 郭平, 王继峰, 王升启. 芍药苷对放射线致血虚证小鼠骨髓 Epo 和 G-CSF 基因表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(3): 239.
- [3] 张立明, 何开泽, 任治军, 等. 栀子中京尼平甙对 CCl<sub>4</sub> 急性小鼠肝损伤保护作用的生化机理研究[J]. 应用与环境微生物学报, 2005, 11(6): 669.
- [4] Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, et al. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model[J]. Phanta Med, 2001, 67(9): 807.
- [5] 刘春云, 武廷章, 周大喜, 等. 凤丹丹皮酚抗菌作用研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(3): 23.
- [6] 巫冠中, 杭秉倩, 杭静霞, 等. 丹皮酚的抗炎作用及其机制[J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(3): 147.
- [7] 李薇, 王远亮, 蔡绍哲, 等. 丹皮酚和阿司匹林对大鼠血液流变性影响的比较[J]. 中草药, 2000, 31(1): 29.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2010; 96, 160, 231.
- [9] 杨海宏, 杨桂玲, 符同浩, 等. 高效液相色谱法测定苏南山肚痛丸中芍药苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 251.
- [10] 蓝小玉, 林华. HPLC 法同时测定清火栀麦片中三种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 228.

[责任编辑 蔡仲德]