

HPLC 同时测定妇炎康片中芍药苷、 丹酚酸 B、小檗碱

黄鸣清¹, 谢友良², 王德杭², 蒋东旭^{2*}, 江滨², 赖小平²

(1. 福建中医药大学 药学院, 福州 350108;

2. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广州 510405)

[摘要] 目的:建立同时测定妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱的含量测定方法。方法:采用 HPLC, Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (含 0.1% 磷酸) 为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 230, 265, 286 nm。结果:芍药苷的线性范围为 0.077 08 ~ 0.770 8 μg ($r=0.999 7$), 平均回收率为 98.87%; 丹酚酸 B 的线性范围为 0.1139 ~ 1.139 μg ($r=0.999 9$), 平均回收率为 99.31%; 小檗碱的线性范围为 0.027 8 ~ 0.278 μg ($r=0.999 9$), 平均回收率为 100.65%。不同厂家妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱的含量差异较大。结论:该方法简便, 专属性、重复性好, 可作为该制剂中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱的含量测定方法。

[关键词] 妇炎康片; 芍药苷; 丹酚酸 B; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2011)22-0068-04

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Salvianolic Acid B and Berberine in Fuyankang Pills by HPLC

HUANG Ming-qing¹, XIE You-liang², WANG De-hang², JIANG Dong-xu^{2*}, JIANG Bin², LAI Xiao-Ping²

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Institute of Drug Research & Development, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of simultaneous determining effective components in

[收稿日期] 20110414(005)

[第一作者] 黄鸣清, 助理研究员, 博士, 从事中药药效物质基础研究及新药开发, Tel: 15980296606, E-mail: hmq1115@126.com

[通讯作者] * 蒋东旭, 副研究员, 硕士, 从事中药新药研究与开发, Tel: 020-39358103, E-mail: jdx101@gzhtcm.edu.cn

- [3] 刘超. 紫芝和松杉灵芝化学成分研究及灵芝三萜酸的含量测定[D]. 北京:中国协和医科大学中国医学科学院, 2008: 32.
- [4] 刘亚男, 王跃飞, 韩立峰, 等. 高效液相色谱-电喷雾-质谱法分析补骨脂中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (22): 2898.
- [5] Qiao C F, Han Q B, Mo S F, et al. Psoralenoside and isopsoralenoside, two new benzofuran glycosides from *Psoralea corylifolia* [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54 (5): 714.
- [6] 孙晋苓, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 液相色谱/离子阱质谱法研究何首乌中糖苷类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 806.
- [7] 刘思即, 王艳, 何蓉蓉, 等. 灵芝的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(3): 183.
- [8] 冯文文, 李国玉, 谭勇, 等. 软紫草与硬紫草萜醌类化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12 (7): 15.
- [9] 刘洁宇, 徐新刚, 刘松艳, 等. 长白山产紫草化学成分研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32 (11): 773.
- [10] 寿清耀. 补骨脂治疗骨质疏松的物质基础研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2003: 22.
- [11] 阮博, 孔令义. 补骨脂化学成分的研究[J]. 中药研究与信息, 2005, 7 (4): 7.
- [12] 郭江宁. 补骨脂抗氧化与抗癌活性成分的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2004: 37.

[责任编辑 蔡仲德]

Fuyankang pills. **Method:** The content of paeoniflorin, salviolic acid B and berberine were determined by HPLC. The analytes were separated using a system of acetonitrile-0.04 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution containing 0.1% phosphoric acid as the mobile phase, and a linear gradient elution program. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelengths of paeoniflorin, salviolic acid B and berberine were 230, 286, 265 nm, respectively. **Result:** The HPLC method was found to be sensitive and linear with the range of 0.077 08-0.770 8 μg for paeoniflorin ($r=0.999\ 7$), 0.113 9-1.139 μg for salviolic acid B ($r=0.999\ 9$), and 0.027 8-0.278 μg for berberine ($r=0.999\ 9$), and the average recoveries for paeoniflorin, salviolic acid B and berberine were 98.87%, 99.31% and 100.65%, respectively. There was great difference in the content of paeoniflorin, salviolic acid B and berberine in Fuyankang pills from different manufacturers. **Conclusion:** The method is simple, specific and reproducible for the determination of paeoniflorin, salviolic acid B and berberine in Fuyankang pills by HPLC.

[**Key words**] Fuyankang pills; paeoniflorin; salviolic acid B; berberine; HPLC

妇炎康片作为国家中药保护品种,收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂》,由赤芍、丹参、黄柏、苦参、延胡索、当归等13味中药组成。具有活血化瘀、软坚散结、清热解毒、消炎止痛之功效,为妇科常用中成药^[1-2]。为了更为有效地评价该制剂的质量,本研究选择不同厂家的妇炎康片,采用HPLC对方中主药赤芍、丹参、黄柏中的有效成分芍药苷、丹酚酸B及小檗碱进行含量测定,客观评价市售妇炎康片的产品质量。

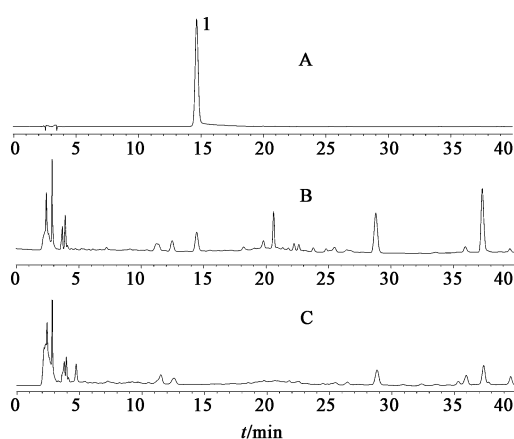
1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(G1322A Degasser, G1311A QuatPump, G1313A AIS, G1316A COICOM, G1315A DAD), HP ChemStation 色谱工作站。乙腈(色谱纯,Merck公司),超纯水,其他试剂和试剂均为分析纯。妇炎康片,国内4家生产企业的产品,共9批,批号T070103, T070602, T071113, 070703, 071103, 071105(广东A公司);20071216(云南B公司);20071202(湖南C公司);20071210(吉林D公司);芍药苷(批号110736-200629)、丹酚酸B(批号111562-200605)、小檗碱(批号110713-200609)对照品均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

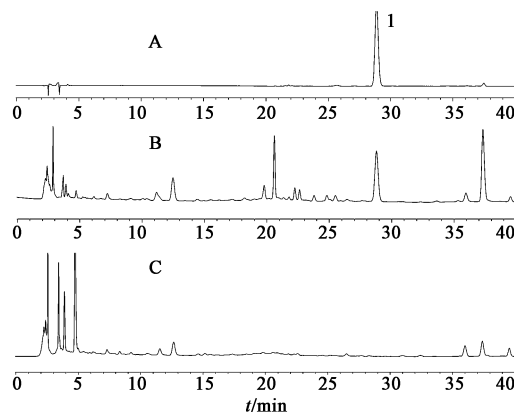
2.1 色谱条件 色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.04 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(含0.1%磷酸)(B), 梯度洗脱(0~10 min, 14% A; 10~14 min, 14%~18% A; 14~28 min, 18%~23% A; 28~40 min, 23%~33% A)。柱温 27℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230(芍药苷), 265(盐酸小檗碱), 286(丹酚酸B); 进样量 10

μL。在该色谱条件下,芍药苷、丹酚酸B及小檗碱可达基线分离,理论塔板数均大于4000,其他成分对测定无干扰(图1~3)。



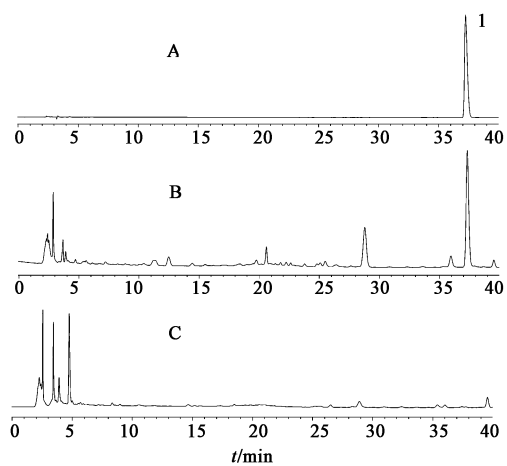
A. 对照品; B. 妇炎康片; C. 缺赤芍样品; 1. 芍药苷

图1 妇炎康片中芍药苷的HPLC(230 nm)



A. 对照品; B. 妇炎康片; C. 缺丹参样品; 1. 丹酚酸B

图2 妇炎康片中丹酚酸B的HPLC(286 nm)



A. 对照品; B. 妇炎康片; C. 缺黄柏样品; 1. 小檗碱

图 3 妇炎康片中小檗碱的 HPLC (265 nm)

2.2 线性关系

2.2.1 对照品贮备液的配制 精密称取芍药苷对照品 9.63 mg、丹酚酸 B 对照品 14.24 mg、小檗碱对照品 6.95 mg, 分别置 50, 50, 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为芍药苷、丹酚酸、小檗碱对照品贮备液。

2.2.2 标准曲线的建立 分别精密吸取芍药苷、丹酚酸、小檗碱对照品贮备液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 然后按上述色谱条件分别进样 10 μL , 测定峰面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 以进样量 (X , μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 并求得芍药苷回归方程为 $Y = 1\,008.2 X + 23.164$ ($r = 0.9997$); 丹酚酸 B 回归方程为 $Y = 983.7 X + 2.37$ ($r = 0.9999$); 小檗碱回归方程为 $Y = 3\,317.3 X - 7.918$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 芍药苷在 0.077 08 ~ 0.770 8 μg 呈良好线性, 丹酚酸 B 在 0.113 9 ~ 1.139 μg 呈良好线性, 小檗碱在 0.027 8 ~ 0.278 μg 呈良好线性。

2.3 供试品溶液的制备 取妇炎康片 20 片, 糖衣片除去糖衣, 研细, 取约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 40 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 精密度试验 取妇炎康片 (批号 071105), 按供试品溶液制备项下操作制备样品溶液, 重复进样 6 次, 进样量 10 μL , 在上述色谱条件下求得芍药苷峰面积 RSD 为 1.32%, 丹酚酸 B 峰面积 RSD 为 1.63%, 小檗碱峰面积 RSD 为 1.91%, 表明精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密取上述供试品溶液 10 μL , 按上述色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定各成分峰面积, 芍药苷峰面积 RSD 为 1.41%, 丹酚酸 B 峰面积 RSD 为 1.13%, 小檗碱峰面积 RSD 为 1.88%。结果表明 10 h 内各成分较稳定。

2.6 重复性试验 按拟定的含量测定方法, 对同一批样品 (批号 071105) 平行做 6 份, 并计算含量, 结果芍药苷平均含量 1.67 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.66%; 丹酚酸 B 平均含量 0.91 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.09%; 小檗碱平均含量 0.35 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.94%。结果表明本方法有较好的重复性。

2.7 加样回收率试验 精密称取芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱对照品适量加甲醇制成 1 mL 各含 0.826, 0.451, 0.842 mg 的混合对照品溶液, 作为对照品加入溶液。另取本品 (批号 071105) 0.5g, 共 6 份, 精密加入对照品溶液 1 mL, 按供试品溶液制备项下操作, 按上述色谱条件测定含量, 分别计算回收率, 结果芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱的加样回收率分别为 98.87%, 99.31%, 100.65%, RSD 分别为 1.89%, 1.52%, 1.43%。

2.8 样品测定 取不同生产企业的妇炎康片, 按供试品溶液制备项下操作, 分别进行含量测定, 结果见表 1。

表 1 妇炎康片中不同成分含量测定 ($n = 3$)

生产企业	批号	芍药苷 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%		丹酚酸 B $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%		小檗碱 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%	
			同一厂家	不同厂家		同一厂家	不同厂家		同一厂家	不同厂家
广东 A 公司	070703	1.80	12.90	38.09	0.88	14.47	22.96	0.24	22.35	35.63
	071103	1.73			1.13			0.48		
	071105	1.67			0.91			0.35		
	T070103	1.21			0.85			0.36		
	T070602	1.66			0.73			0.40		
	T071113	1.67			0.90			0.32		
云南 B 公司	20071216	1.25	-	-	0.78	-	-	0.11	-	-
湖南 C 公司	20071202	0.52	-	-	0.56	-	-	0.26	-	-
吉林 D 公司	20071210	0.51	-	-	0.53	-	-	0.23	-	-

注: 由于妇炎康片有 0.25 g 和 0.52 g 2 种规格, 为方便不同厂家产品间的对比, 本研究以每克含量进行计算。

3 讨论

现行妇炎康片国家药品质量标准仅采用 TLC 法测定苦参碱的含量,同时受检测方法本身缺陷的影响,其含量测定重复性较差,无法真正客观、有效评价该制剂的质量。妇炎康片中多数药味以水提取工艺为主,其中赤芍、丹参、黄柏作为的主药,在本处方中的作用和地位并不亚于苦参,而且三者在该处方中用量较大(赤芍 60 g、丹参 60 g、黄柏 100 g)。同时,研究表明芍药苷、丹酚酸 B 分别是赤芍及丹参的主要水溶性有效成分,其在水或不同浓度的乙醇提取中提取率都较高,但在浓缩、干燥等过程中受加热温度、受热时间等因素影响,导致二者在多数成药中保留率较低^[3-5];而黄柏中的主要有效成分小檗碱,尽管性质较为稳定,但受其盐酸盐水溶性差影响,其在水回流提取过程中提取率较低^[6]。因此,本研究选择赤芍、丹参、黄柏中的主要有效成分芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱作为考察指标,既能够更为全面地评价市售妇炎康片的产品质量,又能够间接反映生产企业对提取、浓缩、干燥等生产工艺环节的执行程度,对于客观全面评价妇炎康片的内在质量具有重要意义。

本试验结果显示,同一厂家不同生产批号产品中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱的含量差异较小(RSD 分别为 12.90%,14.47%,22.35%),而不同厂家之间样品含量差异较大(RSD 分别为 38.09%,22.96%,35.63%),其中芍药苷含量差异达到 3 倍多,而小檗碱含量差异则达到 4 倍多(表 1)。可见,市售不同厂家妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱含量差异较大,有可能致使临床疗效产生较大差异。

进一步统计分析发现,在假使各厂家均使用合

格原药材投料的前提下,以 2010 年版药典规定赤芍含芍药苷不得 < 1.8%、丹参含丹酚酸 B 不得 < 3.0%、黄柏含小檗碱不得少于 3.0% 为计,市售妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱的平均理论保留率分别仅为 30.92%,11.22%,2.55% [注:理论保留率 = 1 个处方(1 000 片/处方,0.25 g/片)成品中指标成分的实际总量/处方中指标成分的最低总量 × 100%]。加上妇炎康片现有生产工艺控制粗放(水用量、浓缩温度、真空度、干燥时间等关键工艺参数不明确)^[1],由此推测妇炎康片在提取、浓缩、干燥等生产过程中存在的某些问题是影响芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱含量差异的重要因素。因此,笔者建议对妇炎康片原生产工艺进行深入研究,优化各工艺环节的最佳参数,并结合实际生产工艺制定更为科学、合理的质量标准。

[参考文献]

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂[S].第十册.1995:65.
- [2] 卫生部药品标准中药成方制剂[S].第十八册.1998:106.
- [3] 曾宝,黄晓其,易智彪,等.芍药苷在生产工艺过程中的含量变化和影响因素研究[J].中国中药杂志,2007,32(14):1472.
- [4] 张军,王风云,赖小平,等.丹参药材提取液中丹酚酸 B 稳定性影响因素的考察[J].中国中药杂志,2005,30(10):789.
- [5] 林青,黄琳,肖晓丽,等.丹参水提液中丹酚酸 B 湿热降解动力学研究[J].中国现代中药,2008,10(8):29.
- [6] 石继连,何群,赵碧清.不同提取方法对黄连中小檗碱含量的影响[J].中国药房,2006,17(11):859.

[责任编辑 蔡仲德]