

HPLC 法同时测定凉血通瘀颗粒中 7 种主要活性成分

金慧臻, 狄留庆*, 汪 晶, 吴晓燕, 徐晓琰, 吴勉华*

南京中医药大学, 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定凉血通瘀颗粒中芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 7 种成分的方法。方法 色谱柱为 Lichrospher C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~18 min, 15% A, 体积流量 0.8 mL/min; 18~20 min, 15%~42% A, 体积流量 0.8 mL/min; 20~54 min, 42% A, 体积流量 0.8 mL/min; 54~56 min, 42%~70% A, 体积流量 1.0 mL/min; 56~80 min, 70% A, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C。结果 7 种成分均能达到基线分离, 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系, 加样回收率在 95%~105%。结论 本法准确、灵敏、可靠、重复性好, 可用于凉血通瘀颗粒的质量控制。

关键词: 凉血通瘀颗粒; 质量控制; 芦荟大黄素; α -细辛醚; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1105-03

Simultaneous determination of seven active components in Liangxue Tongyu Granule by HPLC

JIN Hui-zhen, DI Liu-qing, WANG Jing, WU Xiao-yan, XU Xiao-yan, WU Mian-hua

Jiangsu Province Engineering Technology Research Center for Chinese Materia Effective Drug Delivery System, Nanjing Engineering Research Center for Industrialization of Chinese Medicine Pellets, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of paeoniflorin, paeonol, aloemodin, α -asarone, emodin, chrysophanol, and physcion in Liangxue Tongyu Granule. **Methods** The chromatographic separation was achieved on an Lichrospher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) column with acetonitrile (A) - 0.1% phosphoric acid (B) as mobile phases for gradient elution, 0—18 min, 15% A at the flow rate of 0.8 mL/min; 18—20 min 15%—42% A at the flow rate of 0.8 mL/min; 20—54 min, 42% A at the flow rate of 0.8 mL/min; 54—56 min, 42%—70% A at the flow rate of 1.0 mL/min; and 56—80 min, 70% A at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 25 $^{\circ}$ C and the detection wavelength was set at 254 nm. **Results** The results showed that seven active components were well separated and showed good linearity. The average recoveries were between 95%—105%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable. It can be applied to the quality control of Liangxue Tongyu Granule.

Key words: Liangxue Tongyu Granule; quality control; aloemodin; α -asarone; HPLC

凉血通瘀颗粒处方系周仲瑛教授的临床有效验方, 由大黄、赤芍、牡丹皮、石菖蒲等 8 味中药组成, 具有凉血通瘀、通腑泻热等功效, 临床用于瘀热阻窍证型的缺血性脑中风。凉血通瘀颗粒中主要有芦荟大黄素、芍药苷类、挥发油类成分, 主要活性成分有芦荟大黄素、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、芍药苷、丹皮酚、 α -细辛醚等^[1-5]。采用 HPLC 测定单味药材中指标成分的文献报道较多^[6-8], 本实

验建立了 HPLC 单波长梯度洗脱法一次进样同时测定凉血通瘀颗粒中 7 种成分的方法, 所测 7 种成分的色谱峰与相邻色谱峰均能得到良好的分离, 对凉血通瘀颗粒的质量控制具有重要意义。

1 仪器与材料

BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), AS20500 型超声波清洗器 (天津奥特塞恩斯有限公司), Agilent 1100 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

收稿日期: 2011-11-21

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (2011-2015); 江苏省科技厅科技支撑计划 (BE2011849); 江苏省“六大人才高峰”项目 (2009); 江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划 [苏教师 (2008) 30 号]; 南京中医药大学科技创新风险基金项目计划 (CX200904)

作者简介: 金慧臻 (1986—), 男, 南京中医药大学 2009 级药剂学硕士研究生。Tel: (025)86798226 E-mail: jinhuizhen1986@163.com

***通讯作者** 狄留庆 Tel: (025)86798226 E-mail: diliuqing@yahoo.com.cn

吴勉华 Tel: (025)85811218 E-mail: mhwu@njutcm.edu.cn

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0901.012.html>

芦荟大黄素(110795-200605)、大黄酸(110757-200206)、大黄素(110756-200510)、大黄酚(110796-200705)、大黄素甲醚(110758-200610)、芍药苷(0736-200518)、 α -细辛醚(100298-201002)、丹皮酚(110708-200506)对照品均购自中国药品生物制品检定所;凉血通瘀颗粒(本院自制,批号100721、100810、100829);甲醇(上海化学试剂有限公司,色谱纯);重蒸去离子水(实验室制备);磷酸(上海化学试剂有限公司,分析纯)。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取一定量干燥至恒定质量的芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品置量瓶中,用50%甲醇制成2 098、1 000、28、706、32、68.5、30 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液,备用。

2.2 供试品溶液的制备

取凉血通瘀颗粒1.8 g,精密称定,加入甲醇10 mL,称定质量,超声处理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。

2.3 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱为Lichrospher C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱:0~18 min, 15% A, 体积流量0.8 mL/min; 18~20 min, 15%~42% A, 体积流量0.8 mL/min; 20~54 min, 42% A, 体积流量0.8 mL/min; 54~56 min, 42%~70% A, 体积流量1.0 mL/min; 56~80 min, 70% A, 体积流量1.0 mL/min;检测波长254 nm,柱温25 $^{\circ}\text{C}$ 。色谱图见图1。结果表明,芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚7种成分的分度均大于1.5。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置5 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度,制成不同质量浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取10 μL ,进样测定,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程:芍药苷 $Y=1.207X+268.93$, $r=0.9991$;丹皮酚 $Y=10.156X-22.371$, $r=0.9990$;芦荟大黄素 $Y=47.843X-3.5668$, $r=0.9997$; α -细辛醚 $Y=39.308X+27.661$, $r=0.9995$;大黄素 $Y=23.475X-1.8113$, $r=0.9990$;大黄酚 $Y=35.357X-0.7849$,

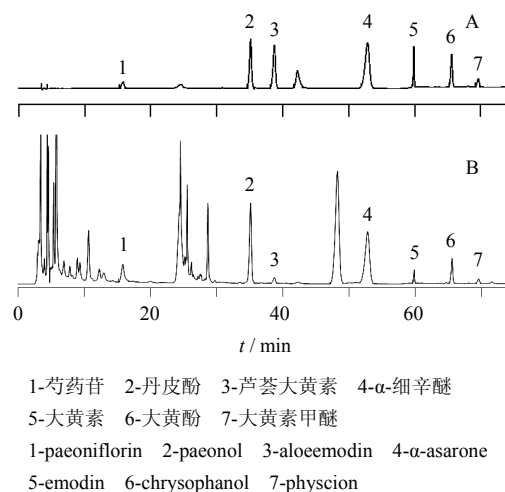


图1 混合对照品(A)与样品(B)的HPLC图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

$r=0.9993$; 大黄素甲醚 $Y=19.563X-5.2676$, $r=0.9990$;表明芍药苷在104.9~1 049.0 $\mu\text{g/mL}$ 、丹皮酚在50.0~500.0 $\mu\text{g/mL}$ 、芦荟大黄素在1.4~14.0 $\mu\text{g/mL}$ 、 α -细辛醚在35.3~353.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素在1.6~16.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酚在3.42~34.25 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚在1.5~15.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取“2.1”项制备的混合对照品溶液1 mL,置5 mL量瓶中,用50%甲醇定容至刻度,制成含芍药苷419.6 $\mu\text{g/mL}$ 、丹皮酚200 $\mu\text{g/mL}$ 、芦荟大黄素5.6 $\mu\text{g/mL}$ 、 α -细辛醚141.2 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素6.4 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酚13.7 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。精密吸取制备的混合对照品溶液10 μL ,进样,连续进样6次,在上述色谱条件下测定,记录峰面积,计算得芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为2.06%、1.83%、2.72%、2.73%、2.32%、1.78%、2.86%。

2.5.2 稳定性试验 取样品(批号100829)按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24 h进样,在上述色谱条件下测定,结果芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.89%、1.81%、2.29%、2.76%、1.92%、1.97%、2.88%,表明供试品溶液中7种有效成分在室温条件下24 h内稳定。

2.5.3 重复性试验 取样品(批号100829)6份,按照供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下分别进样10 μL 测定。结果供试品中芍药苷、丹皮

酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的 RSD 分别为 1.69%、1.93%、3.02%、1.35%、2.10%、1.97%、2.79%。

2.5.4 加样回收率试验 取样品(批号 100829) 6 份, 每份 0.36 g, 精密称定, 分别加入含芍药苷 2 098 $\mu\text{g/mL}$ 、丹皮酚 800 $\mu\text{g/mL}$ 、芦荟大黄素 16 $\mu\text{g/mL}$ 、 α -细辛醚 353 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素 30 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酚 68.5 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚 30 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液 1 mL, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样 10 μL , 测定, 计算回收率。

结果芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、 α -细辛醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 98.71%、101.12%、100.67%、99.09%、99.68%、100.00%、100.57%, RSD 分别为 1.25%、1.56%、1.91%、2.26%、2.79%、1.70%、4.12%。

2.6 样品测定

取 3 批凉血通瘀颗粒, 照“2.2”项下操作制备供试品溶液, 每批平行 3 份, 精密吸取供试品溶液 10 μL , 进样, 每份进样 3 次, 计算每批样品中各成分的量, 结果见表 1。

表 1 凉血通瘀颗粒中指标性成分的质量分数 ($n=3$)

Table 1 Contents of target components in Liangxue Tongyu Granule ($n=3$)

批 号	质量分数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)						
	芍药苷	丹皮酚	芦荟大黄素	α -细辛醚	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
100721	5.470	2.234	43.8	913.2	81.2	187.7	79.9
100810	5.428	2.123	45.5	891.6	82.5	180.9	75.9
100829	5.408	2.178	44.7	909.1	83.2	186.1	76.8

3 讨论

首次建立 HPLC 同时测定凉血通瘀颗粒中 7 种活性成分的方法, 方法简便、结果可靠, 可作为凉血通瘀颗粒多指标定量测定方法, 对多组分特征的中药制剂的质量控制更具实用价值。

在本色谱分析条件下, 复方中的大黄酸(保留时间 42.224 min)成分亦能实现基线分离, 同时具有较好的分离度, 但是, 在本复方制剂中大黄酸的量较低, 与其他成分相差较大, 难以对其进行准确定量测定, 因此本研究只对其进行了定性鉴别。

应用同一测定方法检测多个活性成分时, 分析方法研究过程中检测波长的选择以及流动相的设定非常关键。本实验分别对 7 个成分进行紫外扫描图谱分析, 确定了各成分的最大吸收波长分别为芦荟大黄素、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚 254 nm, 丹皮酚 274 nm, 芍药苷 230 nm, α -细辛醚 253 nm。通过分别在 230 nm、274 nm 进行测定, 由于样品中大黄蒽醌类的成分质量分数较低, 发现均有响应值较低的色谱峰, 经过多次试验, 发现在 254 nm 检测波长下, 7 种成分的灵敏度较高, 峰形较好。在文献研究基础上, 选用乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水等不同溶剂系统进行试验, 经等度或梯度试验比较, 最终确定了本实验中

的梯度洗脱程序, 所检测的 7 种成分色谱峰既能达到基线分离, 又缩短了分析时间。

参考文献

- [1] 张锦伦, 邓中甲. 仲景控制大黄在复方中功效发挥方向之诸因素研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [2] 刘超, 王静, 杨军. 赤芍总甙活血化瘀作用的研究 [J]. 中药材, 2000, 23(9): 557-560.
- [3] 单鸣秋, 张虹, 张丽, 等. 中药牡丹皮的研究进展 [A]. 中华中医药学会中药炮制分会. 中华中医药学会四大怀药与地道药材研究论坛暨中药炮制分会第二届第五次学术会与第三届会员代表大会论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会, 2007.
- [4] 俞浩, 沈业寿, 刘海鹏. 丹皮多糖-2b 对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及机制的研究 [J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 177-178.
- [5] Filipek S, Łozowicka B. alpha-Asarone congeners as hypolipidemic agents. Pseudoreceptor versus minireceptor modeling [J]. Acta Pol Pharm, 2000, 57(Suppl): 106-109.
- [6] 岳淑梅, 冯玲玲, 齐潇潇, 等. 肝宁颗粒中大黄所含 5 种蒽醌苷元的 HPLC 测定 [J]. 中成药, 2008, 30(8): 1155-1158.
- [7] 董宇, 狄留庆, 赵晓莉, 等. HPLC 法测定血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 296-298.
- [8] 魏惠珍, 邱伟华, 饶毅, 等. HPLC 法测定六味地黄片中马钱苷和丹皮酚 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 405-407.