

HPLC-DAD 法测定接骨丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A

李 松, 浦香兰

江阴天江药业有限公司, 江苏 江阴 210034

摘 要: **目的** 建立同时测定接骨丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的 HPLC-DAD 方法。方法 采用高效液相色谱波长切换法。Megres C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相, 进行梯度洗脱; 检测波长切换为 0~15 min 为 230 nm、15~45 min 为 280 nm、45~68 min 为 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样体积 10 μL。结果 芍药苷在 35.27~352.70 ng、柚皮苷在 8.625~86.250 μg、橙皮苷在 53.11~531.10 μg、丹酚酸 B 在 19.34~193.40 μg、丹参酮 II_A 在 2.142~21.420 μg 时进样量与峰面积积分值的线性关系良好。芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的平均回收率分别为 100.47%、96.78%、97.45%、100.25%、99.94%, RSD 值分别为 0.48%、1.07%、1.11%、1.18%、1.83%。结论 本法简便、快速、准确, 可同时测定接骨丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A。

关键词: 接骨丸; 芍药苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)02-0153-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.02.009

Determination of paeoniflorin, naringin, hesperidin, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Jiegu Pills by HPLC-DAD

LI Song, PU Xiang-lan

Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangyin 214434, China

Abstract: **Objective** To establish a quantification method for simultaneous determination of paeoniflorin, naringin, hesperidin, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Jiegu Pills by HPLC-DAD. **Methods** HPLC simultaneously with changing ultraviolet-visible wavelength was used. Megres C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution as mobile phase in gradient elution mode. The detection wavelengths were set at 230 nm (retention time 0 — 15 min), 280 nm (retention time 15 — 45 min), and 270 nm (retention time 45 — 68 min), respectively. Injection volume was 10 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃. **Results** There were good linear relationships between peak areas and contents of five components, such as paeoniflorin, naringin, hesperidin, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in the ranges of 35.27 — 352.70 ng, 8.625 — 86.250 ng, 53.11 — 531.10 ng, 19.34 — 193.40 ng, and 2.142 — 21.420 ng. The average recoveries of five components were 100.54%, 96.78%, 97.45%, 100.25%, and 99.94% with RSD values of 0.48%, 1.07%, 1.11%, 1.18%, and 1.83%, respectively. **Conclusion** The established method is convenient, accurate with a satisfactory separation, and high sensitivity. It can be used to determine paeoniflorin, naringin, hesperidin, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Jiegu Pills with the same chromatogram condition.

Key words: Jiegu Pills; paeoniflorin; naringin; hesperidin; salvianolic acid B; tanshinone II_A; HPLC-DAD

接骨丸为盐城市中医院的医院制剂, 由赤芍、丹参、陈皮、三七、血竭、土鳖虫、骨碎补、醋没药、醋乳香、儿茶、青皮 11 味中药组成, 具有活血祛瘀、消肿止痛、接骨续筋等功效, 临床上主要用

于骨折与脱位、筋伤血肿等症, 效果良好。原有的标准中仅建立了简单的理化鉴别项, 未建立测定项目, 不能有效地控制产品质量。如果单纯测定其中的某一指标成分, 也不能全面反映产品全貌。本实

收稿日期: 2014-09-20

作者简介: 李 松 (1969—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药复方质量标准。Tel: (0510)86408091 E-mail: lis@tianjiang.com

验采用高效液相色谱切换波长法同时测定接骨丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 5 种成分, 可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配备四元梯度洗脱泵、在线脱气器、自动进样器、DAD 检测器、柱温箱 (美国 Agilent 公司)。KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司), AE-240 型十万分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

芍药苷 (批号 110736-200527)、柚皮苷 (批号 110722-200610)、橙皮苷 (批号 110721-200613)、丹酚酸 B (批号 111562-201009) 和丹参酮 II_A (批号 110766-200619) 对照品均购自于中国食品药品检定研究院, 供含量测定用。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

接骨丸样品 (规格 60 g/瓶, 批号 140212、140513、140610) 及其阴性对照样品均由盐城市中医院提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Megres C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (江苏汉邦科技有限公司); 以乙腈 (A) - 0.1% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 按表 1 进行梯度洗脱; 检测波长切换为 0~15 min 为 230 nm、15~45 min 为 280 nm、45~68 min 为 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL。

表 1 梯度洗脱

Table 1 Gradient elution mode

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~15	15	85
15~16	15→21	85→79
16~32	21	79
32~42	21→55	79→45
42~68	55→85	45→15

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成分别含芍药苷 35.27 μg/mL、丹酚酸 B 19.34 μg/mL、橙皮苷 53.105 μg/mL、柚皮苷 8.625 μg/mL、丹参酮 II_A 1.947 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取接骨丸样品适量, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 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 阴性对照溶液的制备 取缺芍药、丹参、青皮、陈皮的阴性对照样品 0.5 g, 按照供试品溶液的制备项下方法处理, 制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取供试品溶液、阴性对照溶液和混合对照品溶液适量, 按上述色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果见图 1。结果表明芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 与其相邻的组分均达到基线分离, 阴性对照样品在与芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 相对应的保留时间处无色谱峰出现。

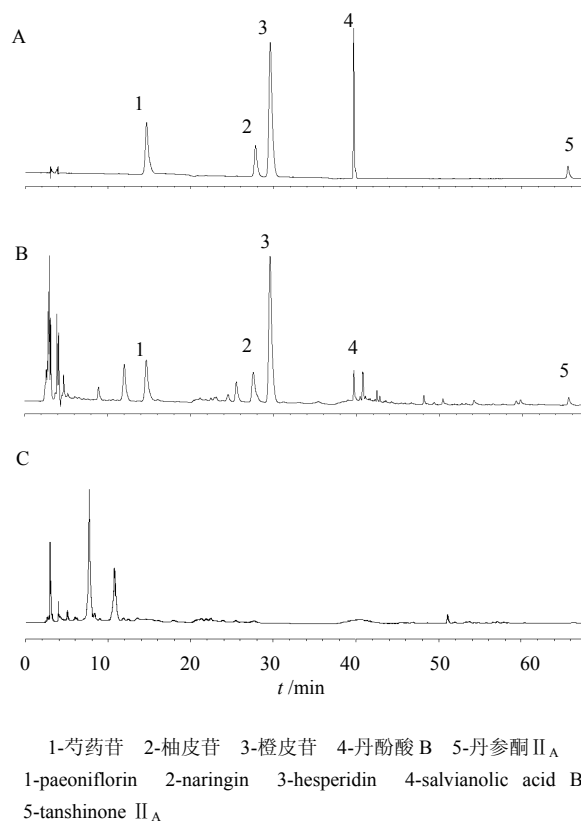


图 1 混合对照品 (A)、接骨丸 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Jiegu Pills samples (B), and negative samples (C)

2.4 线性关系考察

取混合对照品溶液, 分别精密吸取 1、2、4、6、

8、10 μL ，按上述色谱条件，注入液相色谱仪，记录峰面积值。以进样质量为横坐标，峰面积积分值为纵坐标，进行线性回归，得回归方程。芍药苷： $Y=1\,208.5X+11.213$ ($r=0.999\,9$)；柚皮苷： $Y=1\,693.4X+3.985$ ($r=0.999\,9$)；橙皮苷： $Y=1\,861.8X-1.078$ ($r=1.000$)；丹酚酸 B： $Y=1\,102.3X-9.260$ ($r=0.999\,9$)；丹参酮 II_A： $Y=3627.8X-0.6347$ ($r=0.999\,9$)。结果表明芍药苷在 35.27~352.70 ng、柚皮苷在 8.625~86.250 μg 、橙皮苷在 53.11~531.10 μg 、丹酚酸 B 在 19.34~193.40 μg 、丹参酮 II_A 在 2.142~21.420 μg 时进样量与峰面积积分值的线性关系良好。

2.5 精密度试验

分别精密吸取混合对照品溶液各 10 μL ，连续进样 6 次，记录各个色谱峰的峰面积值，结果芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的峰面积值的 RSD 值分别为 0.71%、0.62%、0.36%、0.51%、0.49%。

2.6 稳定性试验

取批号 140212 接骨丸制备的同一供试品溶液，按上述色谱条件，分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样，记录色谱峰面积，结果芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的峰面积值的 RSD 值分别为 0.73%、0.91%、0.63%、1.05%、0.87%，表明

供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号 140212 接骨丸样品适量，研细，取约 0.5 g，平行 6 份，精密称定，制备供试品溶液，按上述色谱条件测定，结果芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的质量分数分别为 3.54、1.33、6.91、0.56、0.16 mg/g，RSD 值分别为 1.53%、1.62%、1.45%、1.79%、1.38%。

2.8 回收率试验

取批号 140212 接骨丸样品适量，研细，取约 0.25 g，平行 6 份，精密称定，分别加入 88.2 $\mu\text{g/mL}$ 芍药苷、34.5 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮苷、159.0 $\mu\text{g/mL}$ 橙皮苷、13.5 $\mu\text{g/mL}$ 丹酚酸 B、3.8 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II_A 对照品溶液各 10 mL，制备供试品溶液，按上述色谱条件测定，计算回收率，结果芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的平均回收率分别为 100.47%、96.78%、97.45%、100.25%、99.94%，RSD 值分别为 0.48%、1.07%、1.11%、1.18%、1.83%。

2.9 样品测定

取不同批次的接骨丸样品，制备供试品溶液，按上述色谱条件测定，分别采用外标法计算样品中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的质量分数，结果见表 2。

表 2 接骨丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of paeoniflorin, naringin, hesperidin, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Jiegu Pills ($n=3$)

批号	芍药苷		柚皮苷		橙皮苷		丹酚酸 B		丹参酮 II _A	
	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/ %
140212	3.54	1.07	1.33	1.25	6.91	0.62	0.56	1.23	0.16	0.89
140513	3.16	0.85	1.26	1.51	7.02	0.93	0.74	1.34	0.21	0.75
140610	2.98	0.69	1.04	1.32	6.75	1.21	0.68	1.01	0.31	0.81

3 讨论

3.1 检测成分的选择

接骨丸为复方制剂，方中药味较多，其中赤芍、丹参等为方中君药、骨碎补为方中臣药、青皮、陈皮为方中佐药。赤芍中含有的芍药苷；丹参中含有丹酚酸 B、丹参酮 II_A；骨碎补中含有的柚皮苷；青皮、陈皮中含有橙皮苷^[1]。这些成分均为复方中的主要有效成分，因此测定此方中 5 种成分，对于控

制复方的产品质量具有重要的意义。

3.2 检测波长的确定

鉴于不同的成分在不同的波长处有最大吸收，为了能够使不同的成分在同一色谱条件下均能检测出来。本实验采用检测波长切换的方式，根据不同的成分选择其最大吸收波长或接近其最大吸收波长作为检测波长。结果芍药苷选择 230 nm 作为检测波长，橙皮苷、柚皮苷、丹酚酸 B 选择 280 nm 作

为检测波长,丹参酮II_A选择270 nm作为检测波长,均取得了理想的效果^[2-3]。

3.3 色谱条件的选择

接骨丸为复方制剂,所含化学成分复杂,不同成分之间性质差异比较大,为了使各成分能达到基线分离,选择不同的溶剂系统作为流动相进行梯度洗脱试验。如乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.1%磷酸等溶剂系统。结果表明:以乙腈-0.1%磷酸系统作为流动相,接骨丸中的各个成分均能达到很好的分离效果。

3.4 提取溶剂的选择

分别考察了稀乙醇、50%甲醇、70%乙醇、70%

甲醇、甲醇作为提取溶剂,分别测定样品中各成分的含量,兼顾到不同成分的理论板数,最终确定甲醇作为提取溶剂。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈有军, 赵瑞芝, 赵 荧, 等. HPLC-PDA 法测定银屑灵流膏中五种成分的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(9): 1522-1525.
- [3] 柏 冬, 范 斌, 牛晓红, 等. HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛和丹参酮II_A [J]. 中草药, 2010, 41: 387-390.