

丹芪养血颗粒的质量标准研究

李晓红, 冯玛莉¹, 刘霞¹ (山西省太原晋阳制药厂, 太原 030031; ¹ 山西省中医药研究院)

摘要: 目的 建立芍药苷的 HPLC 含量测定方法, 完善丹芪养血颗粒的质量标准。方法 色谱柱: Diamonsil C18 柱; 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (15: 85); 检测波长: 230nm; 流速: 1mL · min⁻¹。结果 芍药苷在 0.134~ 2.144μg 范围内线性关系良好, 平均加样回收率为 98.3%, RSD 为 1.0% (n= 6)。结论 该法操作简便、重复性好, 结果准确可靠, 适用于丹芪养血颗粒的质量控制。

关键词: 丹芪养血颗粒; HPLC; 含量测定; 芍药苷

中图分类号: R943. 3; R284 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2011) 07-0688-04

Study on Quality Standard of Danqiyangxue Granules

Li Xiaohong, Feng Mali¹ and Liu Xia¹ (Taiyuan Jinyang Pharmaceutical Factory of Shanxi Province, Taiyuan 030031; ¹Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT: **Objective** To study the quality standard of Danqiyangxue Granules, and establish HPLC method to determine paeoniflorin. **Methods** Diamonsil C18 column was used with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (15: 85) as mobile phase. The detection wavelength was at 230nm. The flow rate was 1mL · min⁻¹. **Results** The linear range was within 0.134~ 2.144μg. The average recovery was 98.3% (RSD = 1.0%, n= 6). **Conclusion** The methods is convenient, repeatable, accurate and suitable for quality control of Danqiyangxue Granules.

KEY WORDS: Danqiyangxue Granules; HPLC; determination; paeoniflorin

丹芪养血颗粒由当归、丹参、黄芪、白芍等 23 味中药组成, 具有养血活血、理气止痛的功能, 用于气滞血瘀型痛经。为有效控制产品质量, 本研究在原质量标准测定丹参中所含丹酚酸 B 含量的基础上, 对芍药苷含量测定方法^[1-9]进行了研究, 同时增加了白芍、牡丹皮、柴胡、陈皮和甘草的薄层鉴别。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪: LG-6A 泵、SPD-6AV 紫外检测器、SIL-6A 自动进样器 (日本岛津); EC2000 色谱数据处理工作站 (大连依利特科学仪器有限公司); 紫外可见分光光度计: UV-3000 (日本岛津)。

1.2 试剂

白芍对照药材 (批号: 0905-9805)、牡丹皮对

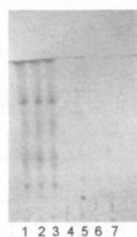
照药材 (批号: 121490-200501)、柴胡对照药材 (批号: 120942-200504)、陈皮对照药材 (批号: 120969-200507)、橙皮苷对照品 (批号: 0721-200010)、甘草对照药材 (批号: 120904-200511) (中国药品生物制品检定所); 芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110736-200526, 供含量测定用)。丹芪养血颗粒 (本厂产品, 批号: 20050901、20050902、20050903、20051001、20051002、20051003、20060301、20060302、20060303、20060501)。缺白芍、牡丹皮双阴性样品和缺柴胡、陈皮、甘草阴性空白对照样品 (本厂自制); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

2.1 白芍和牡丹皮的鉴别

取本品 3g, 研细, 加甲醇 20mL, 超声处理

(功率: 250W, 频率: 33kHz) 20min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇提取 3 次, 每次 20mL, 合并正丁醇提取液, 加中性氧化铝 5g, 超声处理 (功率: 250W, 频率: 33kHz) 10min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液。按 1/10 处方量自制缺白芍、牡丹皮的阴性样品, 同法制备双阴性对照溶液。另取白芍、牡丹皮对照药材各 1g, 同法制成对照药材溶液。再取芍药苷对照品, 加无水乙醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (30: 10: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 30% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材及对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。缺白芍、牡丹皮双阴性样品无干扰。见图 1。



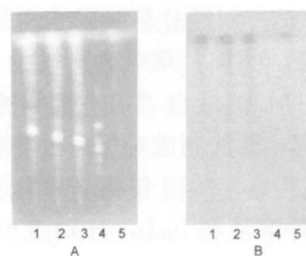
1、2、3. 供试液; 4. 白芍对照药材;
5. 牡丹皮对照药材; 6. 芍药苷对照品; 7. 阴性对照。

图 1 白芍和牡丹皮的薄层色谱鉴别图

2.2 柴胡的鉴别

取本品 3g, 研细, 加氧化镁 5g, 研匀, 加甲醇 50mL, 超声处理 (功率: 250W, 频率: 33kHz) 30min, 离心 (转速: 3000r $\cdot$ min⁻¹), 取上清液, 蒸干, 残渣加 2% 氢氧化钠溶液 30mL 使溶解, 置水浴上加热 20min, 放冷, 用水饱和的正丁醇提取 3 次, 每次 20mL, 合并正丁醇提取液, 用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次, 每次 20mL, 弃去碱液, 正丁醇液用饱和的水洗至中性, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液。按 1/10 处方量自制缺柴胡的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液。另取柴胡对照药材 0.5g, 加水适量, 煎煮 1h, 滤过, 滤液浓缩至约 1mL, 加氧化镁 2g, 拌匀, 干燥, 加甲醇 20mL, 自“超声处理 30min”起, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 8 μ L, 分别点于同一硅胶 G

薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (13: 6: 2) 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 30% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰, 置日光及紫外光灯 (365nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点或荧光斑点。阴性样品无干扰。见图 2。



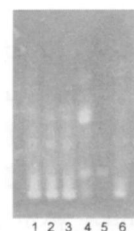
A. 荧光; B. 日光;

1、2、3. 供试液; 4. 柴胡对照药材; 5. 阴性对照。

图 2 柴胡薄层色谱鉴别图

2.3 陈皮的鉴别

取本品 3g, 研细, 加甲醇 20mL, 超声处理 (功率: 250W, 频率: 33kHz) 20min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液。按 1/10 处方量自制缺陈皮的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液。另取陈皮对照药材 0.5g, 同法制成对照药材溶液。再取橙皮苷对照品, 加甲醇制成饱和溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述供试品溶液及阴性对照溶液各 5 μ L、对照药材及对照品溶液各 2 μ L, 分别点于同一用 0.5% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲醇-水 (100: 17: 13) 为展开剂, 展至约 3cm, 取出, 晾干, 再以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水 (20: 10: 1: 1) 的上层溶液为展开剂, 展至约 8cm, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液, 置紫外光灯 (365nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材及对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性样品无干扰。见图 3。



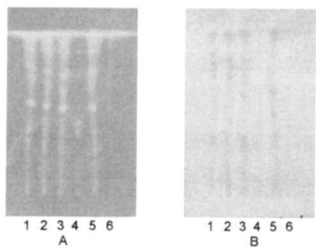
1、2、3. 供试液; 4. 陈皮对照药材;

5. 橙皮苷对照品; 6. 阴性对照。

图 3 陈皮薄层色谱鉴别图

2 4 甘草的鉴别

取本品 4g，研细，加甲醇 20mL，超声处理（功率：250W，频率：33kHz）15min，滤过，滤液蒸干，残渣加水 30mL 使溶解，用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次，每次 20mL，合并正丁醇提取液，用氨试液洗涤 2 次，每次 20mL，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 1mL 使溶解，作为供试品溶液。按 1/10 处方量自制缺甘草的阴性样品，同法制备阴性对照溶液。另取甘草对照药材 1g，加水适量，煎煮 1h，滤过，滤液自“用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次”起，同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法（《中国药典》2010 年版一部附录 VIB）试验，吸取上述 3 种溶液各 5μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水（40：10：1）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，热风吹至斑点显色清晰，置日光或紫外光灯（365nm）下检视。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点或荧光斑点。阴性样品无干扰。见图 4。



A. 荧光；B. 日光；

1、2、3、5. 供试液；4. 甘草对照药材；6. 阴性对照。

图 4 甘草薄层色谱鉴别图

3 含量测定

3 1 色谱条件

色谱柱：Diamondsil 钻石 C18 柱（150mm × 4.6mm，5μm）；流动相：乙腈-0.1% 磷酸溶液（15：85）；检测波长：230nm。进样量：10μL；流速：1mL · min⁻¹。柱温：室温。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 2000。分离度：2.82。

3 2 溶液的制备

对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量，加甲醇制成每 1mL 含 50μg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取装量差异项下的本品，研细，取约 1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 乙醇 20mL，称定重量，超声处理（功率：250W，频率：33kHz）20min，放冷，再称定重量，用 50% 乙醇补足减失的重量，摇匀，离心（转速：3000r · min⁻¹），精密量取上清液 10mL，

通过中性氧化铝柱（100~200 目，5g，内径 1cm，用 50% 乙醇湿法装柱），以 50% 乙醇 30mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，残渣用 50% 乙醇适量使溶解并转移至 10mL 量瓶中，加 50% 乙醇至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.45μm）滤过，取续滤液，即得。

阴性对照溶液的制备 取方中除白芍、牡丹皮外的其他 21 味药材，按照生产工艺制成阴性对照样品。按供试品溶液制备项下的方法制成阴性对照溶液。

3 3 线性关系考察

精密称取芍药苷对照品，分别制成 0.2144、0.1072、0.0536、0.0268、0.0134mg · mL⁻¹ 的对照品溶液，各进样 10μL，依上述色谱条件测定。以芍药苷峰面积积分值为纵坐标（Y），以芍药苷进样量（μg）为横坐标（X），计算得回归方程： $Y = 1.1738150 \times 10^4 X + 2.726507 \times 10^3$ $r = 0.9999$ 结果表明，芍药苷在 0.134~2.144μg 进样量范围内，线性关系良好。

3 4 精密度试验

精密吸取 0.0536mg · mL⁻¹ 上述浓度的对照品溶液 10μL，重复进样 6 次，结果峰面积平均值为 450.95，RSD 为 0.75%，表明仪器精密度良好。

3 5 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 10μL，分别于配制后 0、1、2、3、4、5、6h 进样测定，记录峰面积积分值，其峰面积的平均值为 554.70，RSD 为 0.51%，表明供试品溶液在 6h 内基本稳定。

3 6 重复性试验

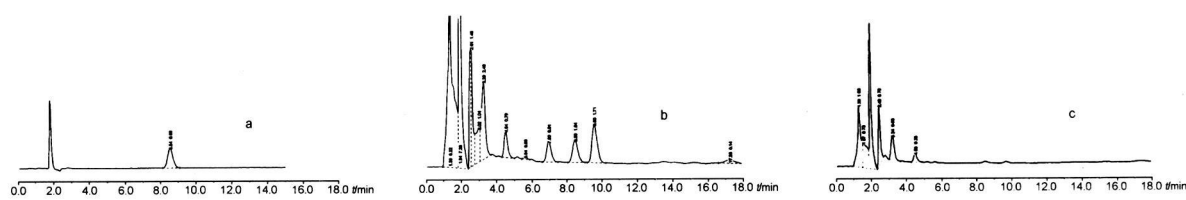
取同一批样品（批号：20050901）6 份，各 1g，精密称定，按供试品溶液的制备方法，分别制备 6 份供试品溶液，进样测定，记录峰面积并计算含量。结果芍药苷的平均含量为 1.115mg · g⁻¹，RSD 为 1.10%。

3 7 阴性干扰试验

取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液按选定的色谱条件分别进样测定，见图 5。结果表明，样品中其他成分不干扰芍药苷的测定，说明本测定方法具有专属性。

3 8 加样回收率试验

取已知含量的同一批样品（批号：20050901，含量：1.12mg · g⁻¹）6 份，各 0.5g，精密称定，分别精密加入芍药苷对照品溶液，按供试品溶液制备方法制备溶液，分别进样，测定，记录峰面积并计算回收率，结果见表 1。



a. 芍药苷对照品; b. 供试品; c. 阴性对照。

图 1 丹芪养血颗粒 HPLC 色谱图

表 1 回收率测定结果

样品中含芍药 苷量(mg)	加入芍药苷 量(mg)	测得芍药 苷量(mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.571	0.401	0.965	98.2		
0.580	0.401	0.970	97.2		
0.578	0.401	0.979	100.0	98.3	1.0
0.554	0.401	0.949	98.5		
0.577	0.401	0.972	98.5		
0.572	0.401	0.963	97.5		

3.9 样品测定

取 10 批样品，按供试品溶液的制备方法制成供试品溶液，分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10μL，按上述色谱条件测定，以外标一点法计算样品中芍药苷的含量，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

批号	含量平均值(mg·袋 ⁻¹)	批号	含量平均值(mg·袋 ⁻¹)
20050901	11.3	20051003	10.3
20050902	11.2	20060301	12.8
20050903	10.1	20060302	11.5
20051001	9.8	20060303	11.5
20051002	9.8	20060501	12.4

4 讨论

丹芪养血颗粒由当归、丹参、黄芪、白芍、香附(醋炙)、熟地黄、阿胶、牡丹皮等 23 味中药组成，药味较多，且药味处方量平均，指标成分含量相对较少。原质量标准仅有当归、黄芪 2 味药材的薄层鉴别。通过研究制订了白芍、牡丹皮、柴胡、陈皮、甘草 5 味药材的薄层鉴别方法，并按中药质量标准含量测定指标的选择原则，建立了处方中君药丹参主要成分丹酚酸 B 的高效液相测定法^[10]。为提高标准，进一步研究建立了方中主要成分芍药苷的高效液相测定法，结果表明，方法简便、快速、准确，方法学考察符合要求，可用于丹芪养血颗粒的质量控制。

芍药苷易溶于水、乙醇、甲醇，故本法曾采用水、甲醇、50%乙醇、50%甲醇进行超声提取，结果 50%乙醇提取效果最佳。确定提取溶剂后，对不同的超声时间(10、20、30min)进行了考察，结果显示，超声 20min 后芍药苷含量不再增加，故确定超声时间为 20min。由于方中药味较多，杂质干扰较大，进一步考察了大孔吸附树脂、正丁醇提取、氧化铝柱纯化等手段，结果以氧化铝柱为最佳。参考《中国药典》2010 年版一部八宝坤顺丸芍药苷含量测定供试品制备方法，通过氧化铝柱后，对洗脱液(50%乙醇)的洗脱体积(10、30、60mL)进行了考察，结果以 30mL 为最佳。通过上述一系列供试品制备方法的优化，最终确定了文中的供试品溶液制备方法。

参考文献:

[1] 王宝荣. 中成药质量标准与标准物质研究 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 33-39

[2] 中国药典 [S]. 一部, 2005: 68-69, 311-312

[3] 刘霞, 苏强, 王瑞明, 等. 胃逆康胶囊质量标准研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11 (2): 119-121

[4] 孙毓庆, 李发美, 李章万, 等. 分析化学 [M]. 第四版 (下册). 北京: 人民卫生出版社, 1999: 297-298

[5] 杨兰英, 梁宏, 郑玉果. 高效液相色谱法测定肝络欣丸中药芍苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (5): 69-70

[6] 刘燕, 郑笑为, 姚令文, 等. 愈带丸质量标准研究 [J]. 中国药品标准, 2010, 11 (1): 19-21

[7] 罗晨曲, 包锦昌, 徐响响, 等. HPLC 法测定龙山胃乐胶囊中芍药苷的含量 [J]. 中成药, 2005, 27 (11): 131-132

[8] 徐木根, 朱山寅. 高效液相色谱法测定强肾片中芍药苷的含量 [J]. 医药导报, 2005, 24 (1): 71-72

[9] 汤美健, 罗海龙, 李永江, 等. HPLC 法测定除湿白带丸中芍药苷的含量 [J]. 中国药品标准, 2007, 8 (5): 74-77

[10] 李晓红, 冯玛莉, 刘霞. 高效液相色谱法测定丹芪养血颗粒中丹酚酸 B 的含量 [J]. 中南药学, 2008, 6 (5): 557-559

[11] 中国药典 [S]. 一部, 2011: 附录 VI B