

改良 RP-HPLC 法同时测定牡丹皮药材中芍药苷和丹皮酚的含量

邓开英^{1*}, 朱必越², 朱照静^{3#} (1. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121; 2. 四川大学华西药学院 2011 级药学 6 班, 成都 610041; 3. 重庆医药高等专科学校, 重庆 400030)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1406-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.22

摘要 目的: 通过改良同时测定牡丹皮药材中芍药苷和丹皮酚含量的方法, 为控制牡丹皮药材的质量提供更有效的手段。方法: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 双波长检测(芍药苷为 230 nm, 丹皮酚为 274 nm)。结果: 芍药苷、丹皮酚的进样量分别在 0.060 33~1.206 6、0.200 4~4.008 0 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 均为 0.999 9); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均 < 2%; 平均加样回收率分别为 99.49%、98.66%, RSD 分别为 2.0%、1.8% (n 均为 6)。结论: 改良方法去除了磷酸对色谱柱的腐蚀, 方法简便、快速, 结果准确, 可为牡丹皮及其相关制剂中芍药苷和丹皮酚的定量分析提供参考。

关键词 牡丹皮; 芍药苷; 丹皮酚; 反相高效液相色谱法; 改良; 含量测定

Simultaneous Determination of Paeoniflorin and Paeonol in *Paeonia suffruticosa* by Modified RP-HPLC

DENG Kai-ying¹, ZHU Bi-yue², ZHU Zhao-jing³ (1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide more effective means for the quality control of *Paeonia suffruticosa* by improving the method for simultaneous determination of paeoniflorin and paeonol in *P. suffruticosa*. METHODS: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with mobile phase consisted of methanol-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 230 nm for paeoniflorin and 274 nm for paeonol. RESULTS: The linear range of paeoniflorin was 0.060 33-1.206 6 μg and that of paeonol was 0.200 4-4.008 0 μg ($r=0.999 9$). RSDs of precision test, reproducibility test and stability test were all lower than 2%. The average recoveries were 99.49% and 98.66% with RSDs of 2.0% and 1.8% respectively ($n=6$). CONCLUSION: The modified method removes phosphate corrosion for chromatographic column. The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the qualitative analysis of paeoniflorin and paeonol in *P. suffruticosa* and its preparations.

KEY WORDS *Paeonia suffruticosa*; Paeoniflorin; Paeonol; RP-HPLC; Modified; Content determination

外, 从 SDE 法提取的精油中分离鉴定的化合物种类比朱甘培等^[1]用 SD 法提取的精油中分离鉴定的化合物要丰富得多, 但 SDE 法中未检测到香薷酮。采用 SDE 法提取精油, 提取效率比经典的 SD 法高, 且挥发性成分中头香成分损失较少。HS 检测法中, 分子量较大、不易挥发、质量分数低的成分较难检测到, 沸点较大的成分又因加热温度受限制而未完全析出。

采用 SDE-GC-MS 法提取吉龙草精油时, 蒸馏时间为 5 h、料液比为 1:30 (m/V) 的条件下得到较高的得油率 (2.40%)。SD、SDE、HS 3 种处理方法都存在一定的局限性, SDE 法检测的主要是中等极性成分, HS 法主要检测的是质量分数较大、极性较小的成分, 而 SD 法中头香与热敏性物质损失又较大。相对而言, 采用 SDE-GC-MS、HS-GC-MS 法分析吉龙草的挥发性成分具有试验步骤少、分析时间短、试剂用量少等优点。总体上讲, SD、SDE、HS 3 种方法检出的挥发性成分在类别与质量分数方面都具有各自的侧重点, 也具有一定的互补性。笔者建议, 若以 GC-MS 指纹图谱表征吉龙草的挥发性成分, 应结合

3 种方法采集的信息。另外, 吉龙草运用于香精香料领域应充分考虑香味体系的复杂性与多变性, 从而根据实验目的寻找合理的前处理方法。

参考文献

- [1] 吴征镒, 周铨, 陈介, 等. 中国植物志: 62 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 327.
- [2] 程必强, 喻学俭, 林琼. 富含柠檬醛植物——吉龙草的引种[J]. 香精香料化妆品, 1986(1): 24.
- [3] 程必强, 喻学俭. 吉龙草的引种[J]. 云南植物研究, 1987, 9(2): 203.
- [4] 江苏省植物研究所. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 432-436.
- [5] 杨敏杰, 张丽琴, 李锡香, 等. 云南野生食用香料植物资源[J]. 中国蔬菜, 2005(4): 32.
- [6] Chau CF, Wu SH. The development of regulations of Chinese herbal medicines for both medicinal and food uses[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17(6): 313.
- [7] 朱甘培, 赵仁. 吉龙草挥发油化学成分的研究[J]. 中成药, 1990, 12(11): 33.

(收稿日期: 2012-04-17 修回日期: 2012-07-26)

* 主任药师, 硕士。研究方向: 药品质量标准。电话: 023-86072400。E-mail: dengkaiying6811@sina.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 新药开发与药物制剂。电话: 023-86262834。E-mail: zhaojing6271@126.com

牡丹皮为毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 具有清热凉血、活血化瘀之功效, 用于温毒发斑、吐血衄血、骨蒸劳热、经闭痛经、痈肿疮毒、跌扑伤痛等证的治疗^[1]。丹皮酚和芍药苷为牡丹皮中所含的 2 种活性成分^[2]。2010 年版《中国药典》载有牡丹皮中丹皮酚的高效液相色谱(HPLC)含量测定法^[3]; 文献报道了 HPLC 同时测定牡丹皮中丹皮酚和芍药苷含量的方法^[3], 本试验在此基础上进行了改良, 为牡丹皮及其相关制剂中芍药苷和丹皮酚的定量控制提供更多的参考。

1 材料

1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪, 含 VWD 检测器、ChemStation 色谱工作站(美国 Agilent 公司); BP211S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Simplicity-185 型超纯水机(美国 Millipore 公司); KQ 500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

芍药苷(批号: 110736-201035, 含量: 96.5%) 和丹皮酚(批号: 0708-200505, 供含量测定用) 对照品均由中国食品药品检定研究院提供; 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲醇(分析纯, 重庆川东化工有限公司); 水为超纯水。

1.3 药材

牡丹皮药材为市售品, 均经重庆市中药研究院张艳副研究员鉴定为毛茛科芍药属植物牡丹 *P. suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱(0~10 min, 34% → 34% A; >10~12 min; 34% → 50% A; >12~32 min, 50% → 50% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm(芍药苷)、274 nm(丹皮酚); 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 供试品中芍药苷和丹皮酚色谱峰分离良好。色谱见图 1。

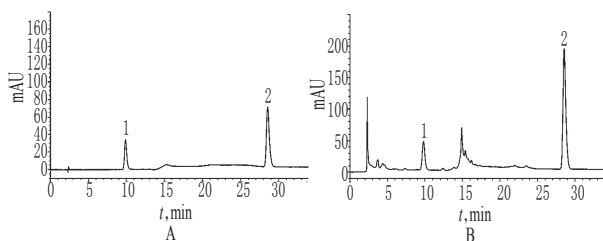


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 芍药苷; 2. 丹皮酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test samples; 1. paeoniflorin; 2. paeonol

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芍药苷对照品 15.63 mg, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制得芍药苷对照品溶液; 精密称取丹皮酚对照品 10.02 mg, 置 5 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定

容, 制得丹皮酚对照品溶液。精密量取芍药苷对照品溶液 2 ml、丹皮酚对照品溶液 1 ml, 置同一 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成芍药苷和丹皮酚的质量浓度分别为 0.060 33 mg/ml 和 0.200 40 mg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取牡丹皮药材适量, 粉碎, 过 40 目筛, 取粉末 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 ml, 称定质量, 超声处理(频率: 40 kHz, 功率: 500 W) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足失质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20 μl, 按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。以进样量($x, \mu\text{g}$) 为横坐标, 峰面积积分值(y) 为纵坐标, 进行线性回归, 得芍药苷和丹皮酚的回归方程分别为 $y=1\ 269.97x+5.066$ ($r=0.999\ 9, n=5$)、 $y=3\ 050.88x-11.05$ ($r=0.999\ 9, n=5$)。结果表明, 芍药苷和丹皮酚的进样量分别在 0.060 33~1.206 6、0.200 4~4.008 0 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μl, 连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 芍药苷和丹皮酚的 RSD 分别为 0.7% 和 0.2% (n 均为 6), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取新制备的同一供试品溶液分别于放置 0、2、4、8、12 h 进样测定, 每次 10 μl, 记录峰面积。结果, 芍药苷和丹皮酚的 RSD 分别为 0.9% 和 1.1% (n 均为 5), 表明供试品溶液放置 12 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品(样品编号: 1) 适量, 共 6 份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 芍药苷和丹皮酚的 RSD 分别为 1.5% 和 0.9% (n 均为 6), 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品(样品编号: 1) 0.25 g, 共 6 份, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入混合对照品溶液(芍药苷和丹皮酚的质量浓度分别为 0.061 25 和 0.201 20 mg/ml) 25 ml, 再精密加入甲醇 25 ml, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果分别见表 1、表 2。

表 1 芍药苷的加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests of paeoniflorin ($n=6$)

样品编号	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.251 5	1.360 6	1.531 2	2.910 9	101.25		
2	0.253 1	1.369 2	1.531 2	2.874 7	98.32		
3	0.250 2	1.353 6	1.531 2	2.918 9	102.23	99.49	2.0
4	0.252 6	1.366 6	1.531 2	2.859 7	97.51		
5	0.252 0	1.363 3	1.531 2	2.848 3	96.98		
6	0.252 9	1.368 7	1.531 2	2.909 4	100.62		

2.8 样品含量测定

分别取 10 批市售牡丹皮药材样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10

μl ,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品中芍药苷和丹皮酚的含量,结果见表3。

表2 丹皮酚的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests of paeonol($n=6$)

样品编号	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	0.251 5	4.698 0	5.030 0	9.614 3	97.74		
2	0.253 1	4.727 9	5.030 0	9.569 2	96.25		
3	0.250 2	4.673 7	5.030 0	9.775 6	101.43	98.66	1.8
4	0.252 6	4.718 6	5.030 0	9.610 3	97.25		
5	0.252 0	4.707 4	5.030 0	9.687 6	99.01		
6	0.252 8	4.718 2	5.030 0	9.761 1	100.26		

表3 牡丹皮药材样品含量测定结果(mg/g , $n=3$)

Tab 3 Content determination of *P. suffruticosa* (mg/g , $n=3$)

样品编号	芍药苷	丹皮酚
1	5.41	18.68
2	5.95	17.20
3	7.25	13.05
4	6.76	16.54
5	5.99	19.21
6	6.73	17.08
7	6.84	15.43
8	5.77	13.67
9	7.01	14.92
10	6.58	15.79

3 讨论

3.1 流动相的选择

2010年版《中国药典》(一部)牡丹皮药材项下采用HPLC法测定丹皮酚含量的流动相为甲醇-水(45:55, V/V);文献报道HPLC检测芍药苷的流动相通常有甲醇-0.1%磷酸水、乙腈-水、甲醇-水、0.4%甲酸水-乙腈等^[4-6],测定丹皮酚的流动相为甲醇-水(45:55, V/V)^[7],测定牡丹皮指纹图谱的流动相为甲醇-水(0%甲醇 \rightarrow 100%甲醇)连续梯度洗脱^[8]。参考上述文献,筛选出流动相甲醇-水梯度洗脱,既能避免磷酸对色谱柱的影响,又能使牡丹皮中芍药苷和丹皮酚与相邻色谱峰达到基线分离,峰形良好。

3.2 检测波长的选择

文献^[8]中牡丹皮指纹图谱多组分的检测波长为242 nm,但不是芍药苷和丹皮酚的最大吸收波长。本试验分别选择芍药

苷和丹皮酚的最大吸收波长230 nm和274 nm进行检测,可提高灵敏度。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

参考2010年版《中国药典》(一部)牡丹皮药材项下含量测定中供试品溶液的制备方法,以甲醇为溶剂超声提取,分别考察超声处理20、30、40、50 min的提取效果。结果发现,超声处理30 min以上,供试品溶液中芍药苷和丹皮酚含量不再增加,表明超声提取30 min即可将牡丹皮中的芍药苷和丹皮酚基本提取完全。

3.4 RP-HPLC法改良

本试验对文献报道的方法^[9]进行了改良,去除流动相中的磷酸,可减少色谱柱受腐蚀程度,而且在线性范围内检测浓度更低,有利于样品量少和含量低的牡丹皮药材的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:160-161.
- [2] 王祝举,唐力英,赫炎.牡丹皮的化学成分和药理作用[J].国外医药植物药分册,2006,21(4):155.
- [3] 李向阳,屠万倩,张留记.RP-HPLC法测定不同产地的牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J].中药新药与临床药理,2011,22(5):563.
- [4] 周刚,吕庆红.牡丹皮不同部位有效成分含量测定及指纹图谱化学成分研究[J].中国中药杂志,2008,33(18):2070.
- [5] 田元子,王琰.反相高效液相色谱法测定牡丹皮中2种活性成分[J].中国中药杂志,2005,30(16):1265.
- [6] 温华珍,梁琼麟,罗国安,等.双波长RP-HPLC法同时测定丹皮药材中的3种指标性成分[J].药物分析杂志,2006,29(9):1266.
- [7] 范俊安,于超,王继生,等.重庆垫江牡丹皮丹皮酚含量动态变化研究[J].中国药房,2006,17(5):394.
- [8] 张艳,范俊安,夏永鹏,等.重庆垫江牡丹皮HPLC指纹图谱研究(II)——原丹皮指纹图谱[J].中国药房,2009,20(33):2602.

(收稿日期:2012-09-11 修回日期:2012-10-16)

国家卫生和计划生育委员会主任李斌表示:从群众最需要的地方做起,从群众不满意的地方改起

本刊讯 新任国家卫生和计划生育委员会主任李斌近日在接受人民网等媒体采访时表示,组建国家卫生和计划生育委员会是中央深化行政体制改革的重大部署,卫生、计生都是重要的民生,是群众最直接最现实的利益。她说,健康和家庭在人们心目中有很重的份量,做好这项工作,要靠广大基层医务人员、基层计生工作者的精心服务和扎实工作,无论在雪域高原,还是在偏僻乡村,在祖国的每个角落,是他们在辛勤工作,默默守护着13亿人的健康,落实着各项工作任务。她希望

媒体朋友更关注他们,多给大家鼓励,释放更多的正能量。

她还说,要从群众最需要的地方做起,从群众不满意的地方改起,我们一起齐心协力,提高人民的健康水平,把卫生、计生工作做得更好。当前的主要任务是落实好“十八大”和“两会”精神,统一思想,精心组织,搞好这次机构改革,搞好新部门的组建工作。要做到队伍稳定、工作不断、凝心聚力,按照既定的部署,深化医药卫生体制改革,进一步做好卫生和计划生育各项工作。