

# HPLC法同时测定呼伦贝尔产赤芍防治心血管系统疾病有效物质群中3种成分的含量<sup>Δ</sup>

奥·乌力吉\*,王秀兰,代那音台,刘 顺,薛银龙,王青虎<sup>#</sup>(内蒙古民族大学蒙医药学院,内蒙古通辽 028000)

中图分类号 R283.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3676-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.10

**摘要** 目的:建立同时测定呼伦贝尔产赤芍防治心血管系统疾病有效物质群中芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,进样量为20 μl。结果:芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷的质量浓度分别在10.00~100.00、1.00~25.00、0.40~10.00 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r$ 分别为0.999 5、0.999 1、0.999 2);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为98.17%(RSD=1.14%, $n=6$ )、98.08%(RSD=1.50%, $n=6$ )、98.07%(RSD=1.03%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便、快速,结果准确,可用于控制呼伦贝尔产赤芍的质量。

**关键词** 赤芍;芍药苷;羟基芍药苷;芍药内酯苷;含量测定;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of 3 Components in Effective substance Group of *Paeonia lactiflora* from Hulunbuir

Ao·Wuliji, WANG Xiu-lan, Dainayintai, LIU Shun, XUE Yin-long, WANG Qing-hu(College of Mongolian Traditional Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia Tongliao 028000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of peoniflorin, hydroxyl peoniflorin and albiflorin in effective substance group of *Paeonia lactiflora* from Hulunbuir. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 230 nm and sample size was 20 μl. RESULTS: The linear ranges of peoniflorin, hydroxypaeoniflorin and albiflorin were 10.00-100.00 μg/ml ( $r=0.999\ 5$ ), 1.00-25.00 μg/ml ( $r=0.999\ 1$ ) and 0.40-10.00 μg/ml ( $r=0.999\ 2$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The average recoveries were 98.17% (RSD=1.14%,  $n=6$ ), 98.08% (RSD=1.50%,  $n=6$ ), 98.07% (RSD=1.03%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is convenient, rapid and accurate, and can be used for quality control of *P. lactiflora* from Hulunbuir.

**KEYWORDS** *Paeonia lactiflora*; Peoniflorin; Hydroxyl peoniflorin; Albiflorin; Content determination; HPLC

赤芍,蒙名乌兰查那,是毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.或川赤芍 *P. veitchii* Lynch的干燥根,具有清热凉血、散瘀止痛之功效<sup>[1]</sup>。蒙医在临床将其用于治疗淤血性疼痛、闭经、月经不调等症<sup>[2-3]</sup>。研究表明,赤芍的化学成分主要包括芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、芍药花苷和氧化芍药苷等,通称为赤芍总苷<sup>[4-5]</sup>。赤芍总苷可以明显改善机体的微循环状态,降低血浆黏度,抑制二磷酸腺苷诱导的血小板聚集,延长凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间<sup>[6]</sup>;其主要通过对凝血系统和血小板功能的影响而产生抗血栓作用<sup>[7]</sup>。赤芍总苷的上述药理作用与赤芍在现代蒙医的临床应用基本一致,是赤芍防治心血管系统疾病主要的有效物质群。本课题组在对赤芍防治心血管系统疾病有效物质群提纯工艺的前期研究<sup>[8]</sup>中,确定其最佳提取工艺为:溶剂70%乙醇、溶剂量200 ml、提取时间4 h,提取次数2

次;大孔树脂纯化工艺为每小时3倍量吸附速率吸附,再用30%乙醇洗脱,流速为每小时3倍量。本试验拟对接上述提纯工艺得到的赤芍总苷,建立同时测定其中芍药苷、羟基芍药苷和芍药内酯苷含量的方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪(包括LC-20A型输液泵、SPD-M20A型二极管阵列检测器、CTD-20A型柱温箱)、UV-2501PC型分光光度计、AUW200D型电子天平(日本岛津公司);KQ-100型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110736-200320);羟基芍药苷、芍药内酯苷对照品(自制,纯度均>98.5%);乙腈和甲醇为色谱纯(天津市光复精细化工研究所);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

赤芍采集于内蒙古呼伦贝尔,经内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药生药教研室布和巴特尔教授鉴定为毛茛科芍药 *P.*

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家科技支撑计划项目(No.2011BAI07B06)

\* 教授,博士。研究方向:蒙药新药开发。电话:0475-8314240。

E-mail:nmgmdwuliji@163.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授,博士。研究方向:蒙药有效成分提取分离及其质量标准。电话:0475-8314242。E-mail:wqh693@163.com

*lactiflora* Pall.的干燥根,并保存于内蒙古民族大学蒙医药学院蒙药化学教研室。

## 2 方法与结果<sup>[9-11]</sup>

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、羟基芍药苷和芍药内酯苷对照品各10 mg,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得芍药苷、羟基芍药苷和芍药内酯苷对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取赤芍20.00 g,加70%乙醇100 ml,回流提取2 h,滤过,药渣再加70%乙醇100 ml,回流提取2 h,滤过,合并滤液,滤液减压回收乙醇后,水溶液用冷冻干燥机冷冻至干,得提取物3.84 g。精密称取提取物1.00 g,加水溶解,转移至100 ml量瓶中,加水至刻度,混匀,加于处理好的D101大孔吸附树脂柱(30 cm×2.2 cm)上,以每小时3倍量的流速进行吸附,先以5倍量水洗脱后,再以10%乙醇100 ml洗脱,然后用30%乙醇以每小时3倍量的流速洗脱,收集洗脱液。取25 ml洗脱液,减压回收乙醇后,水溶液用冷冻干燥机冷冻至干,得浸出物172 mg。精密称取浸出物20 mg,置于200 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B)溶液, 梯度洗脱(0~10 min, 15%→35% A; >10~20 min, 35%→55% A; >20~30 min, 55%→75% A; >30~45 min, 75% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 进样量: 20 μl。在上述色谱条件下, 芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷达到基线分离, 分离度>1.5; 理论板数均不低于4 500。色谱见图1。

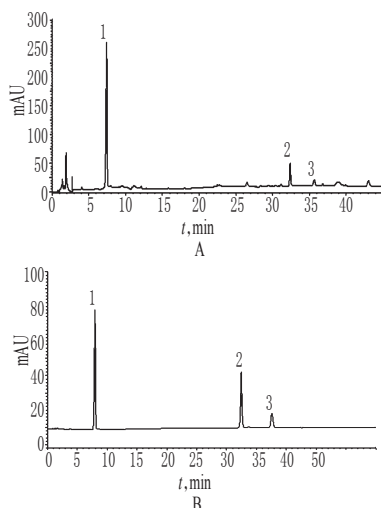


图1 高效液相色谱图

A.供试品;B.对照品;1.芍药苷;2.羟基芍药苷;3.芍药内酯苷

Fig 1 HPLC chromatograms of test sample and reference substance

A.test sample;B.reference substance;1.peoniflorin;2.hydroxyl paeoniflorin;3. albiflorin

### 2.3 线性关系考察

精密吸取芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷对照品溶液各适量,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇配成不同质量浓度的系列溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分的质量浓度( $x$ , μg/ml)为横坐标,峰面积积分值( $y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程,结果见表1。

表1 线性关系考察结果

Tab 1 The program of gradient elution

待测成分	回归方程	$r$	线性范围, μg/ml
芍药苷	$y=66.785x-117.813$	0.999 5	10.00~100.00
羟基芍药苷	$y=6.057x+4.852$	0.999 1	1.00~25.00
芍药内酯苷	$y=8.412x-990$	0.999 2	0.40~10.00

### 2.4 精密度试验

精密吸取芍药苷对照品溶液适量,用甲醇稀释至60 μg/ml;分别精密吸取羟基芍药苷和芍药内酯苷对照品溶液各适量,用甲醇稀释至6 μg/ml。分别吸取上述3种溶液,按上述色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷的RSD分别为0.98%、1.02%、1.07%( $n$ 均为6),表明仪器精密度良好。

### 2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,分别在0、6、8、12、24 h时按上述色谱条件测定1次,共测定5次,记录峰面积。结果,芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷的RSD分别为1.14%、1.32%、1.24%( $n$ 均为5),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

### 2.6 重复性试验

取样品适量,共6份,分别精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷的RSD分别为1.50%、1.38%、1.42%( $n$ 均为6),表明本方法重复性良好。

### 2.7 加样回收率试验

精密称取同一已知含量的样品适量,共6份,每份10.00 g,分别精密加入芍药苷、羟基芍药苷和芍药内酯苷各适量,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

### 2.8 样品含量测定

取样品5份,每份20.00 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,按外标二点法计算各成分的质量分数,结果见表3。

### 2.9 生药含量测定

分别称取赤芍样品5份,每份0.20 g,精密称定,以70%乙醇20 ml回流提取4 h,滤过,精密吸取滤液5 ml,减压回收至干,加甲醇溶解并定容至100 ml,吸取20 μl,按上述色谱条件进样测定,计算各成分的质量分数。结果,赤芍中芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷的质量分数分别为2.27%、0.28%、0.17%,RSD分别为1.25%、1.47%、2.01%( $n$ 均为5)。

## 3 讨论

按供试品溶液制备方法处理赤芍后,赤芍中芍药苷、羟基芍药苷和芍药内酯苷的质量分数分别为2.00%、0.40%、

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests (n=6)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
芍药苷	6.047	6.00	11.87	97.05	98.17	1.14
	6.024	6.00	11.94	98.60		
	6.028	6.00	12.02	99.87		
	6.036	6.00	11.90	97.73		
	6.034	6.00	11.96	98.77		
	6.040	6.00	11.86	97.00		
羟基芍药苷	1.216	1.00	2.188	97.20	98.08	1.50
	1.204	1.00	2.201	99.70		
	1.208	1.00	2.194	98.60		
	1.218	1.00	2.178	96.00		
	1.214	1.00	2.210	99.60		
	1.210	1.00	2.184	97.40		
芍药内酯苷	0.535	0.500	1.018	96.60	98.07	1.03
	0.540	0.500	1.032	98.40		
	0.532	0.500	1.030	99.60		
	0.542	0.500	1.033	98.20		
	0.538	0.500	1.029	98.20		
	0.530	0.500	1.017	97.40		

表3 样品含量测定结果

Tab 3 Results of content determination of samples

编号	芍药苷,%		羟基芍药苷,%		芍药内酯苷,%	
	质量分数	RSD	质量分数	RSD	质量分数	RSD
1	60.28	1.12	12.21	1.15	5.375	1.00
2	60.82	0.94	12.23	1.31	5.354	1.06
3	60.88	1.08	12.18	1.23	5.328	1.14
4	60.00	0.98	12.08	0.99	5.364	1.17
5	60.37	0.91	12.10	1.16	5.322	1.15

0.18%,与生药中的质量分数比较,芍药苷降低了0.27%,芍药内酯苷降低了0.01%,而羟基芍药苷增加了0.12%。表明提取纯化过程中芍药苷和芍药内酯苷损耗了一部分,而羟基芍药苷增加不知何因,有待于进一步研究。试验中,赤芍提取物中芍药苷、羟基芍药苷和芍药内酯苷的总量占提取物的77.98%,

符合2010年版《中国药典》(一部)中提取物的制备要求。

综上所述,本方法专属性、重复性较好,精密度、准确度和稳定性均较高,可作为赤芍防治心血管系统疾病有效物质群的鉴别依据。

### 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,2010:147.
- [2] 巴根那.蒙药方剂学[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,2007:279.
- [3] 内蒙古自治区食品药品监督管理局.内蒙古蒙药制剂规范[S].呼和浩特:内蒙古人民出版社,2007:91、241.
- [4] 王彦志,石任兵,刘斌.赤芍化学成分的分离与结构鉴定[J].北京中医药大学学报,2006,29(4):267.
- [5] 胡世林,付桂兰,冯学锋,等.不同产地和部位赤芍中芍药苷的含量测定[J].中国中药杂志,2000,25(12):714.
- [6] 李文,殷小杰,廖福龙,等.六种产地赤芍对大鼠抗凝血及抗血小板聚集作用的比较[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(6):30.
- [7] 徐红梅,刘清云,戴敏,等.赤芍总苷对大鼠血小板功能的影响[J].合肥工业大学学报:自然科学版,2003,26(1):141.
- [8] 奥·乌力吉,王青虎,王秀兰,等.蒙药赤芍防治心血管系统疾病的有效物质群的提取工艺研究[J].时珍国医国药,2014,25(3):562.
- [9] 胡世林,付桂兰,冯学锋,等.不同产地和部位赤芍中芍药苷的含量测定[J].中国中药杂志,2000,25(12):714.
- [10] 刘玉红,张惠珍.高效液相色谱法测定芍药中芍药苷的含量[J].中国医院药学杂志,2006,26(10):1308.
- [11] 简在友,俞敬波,王文全.芍药不同部位和不同采收期6个化学活性成分含量的比较[J].药学学报,2010,45(4):489.

(收稿日期:2013-07-13 修回日期:2014-02-25)

## 2014年“服务百姓健康行动”全国大型义诊活动周启动

**本刊讯** 2014年9月14日,2014年“服务百姓健康行动”全国大型义诊活动周启动仪式在革命老区、长征出发地——江西省于都县举行。国家卫生计生委主任李斌,江西省委常委史文清、副省长谢茹、国家中医药管理局副局长马建中、解放军总后勤部卫生部副部长李清杰等出席。

李斌在讲话中介绍,2013年,国家卫生计生委、国家中医药管理局和总后勤部卫生部联合开展首个“服务百姓健康行动”全国大型义诊活动周,让城市大医院的专家定期走进基层,为群众提供优质便捷的医疗服务。她表示,希望参加义诊活动的医务工作者自觉践行社会主义核心价值观,发扬“不畏艰苦、甘于奉献、救死扶伤、大爱无疆”的职业精神,尽最大努力为群众服务。

启动仪式结束后,李斌一行来到中国中医科学院广安门医院诊台前慰问义诊专家,并与前来就诊的群众进行了交流。

2014年的活动周,三部门特别组织8支国家医疗队,分赴河南、江西、云南等省的连片特殊困难地区、革命老区和少数民族地区开展大型义诊工作。

国家中医药管理局高度重视此次义诊活动,特别组建了由20余名副主任医师以上中医专家组成的国家中医医疗队,由副局长于文明、马建中、王志勇分别带队,到云南省禄劝县和寻甸县、江西省于都县以及河南省兰考县和太康县开展义诊工作。3位副局长在出席启动仪式后,亲切看望义诊专家,并到当地中医机构调研。