

# 高效液相色谱法测定散结止痛颗粒中芍药苷含量

袁继承 沙启营 吕伟斌 袁继鲁

**【摘要】 目的** 建立测定散结止痛颗粒中芍药苷含量的方法。**方法** 用高效液相色谱法测定芍药苷含量。采用依利特 Hypersil ODS2 (4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈—水 (17:83) 为流动相, 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 230 nm。**结果** 芍药苷在 52.4 ~ 524 μg/ml 范围内呈较好线性关系,  $r = 0.9999$ ; 该方法具有良好的精密度、稳定性和重复性, 平均回收率 99.76%, RSD 4.68%。**结论** 此法准确可靠, 适用于测定芍药苷的含量, 可用于散结止痛颗粒的质量控制。

**【关键词】** 散结止痛颗粒; HPLC; 芍药苷; 含量

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi: 10.3969/j.issn.1674-1749.2013.03.003

**Determination of Paeoniflorin in Sanjie Zhitong Granule by HPLC** YUAN Ji-cheng, SHA Qi-ying, LYU Wei-bin, et al. Heze Traditional Chinese Medical Hospital, Heze 274000, China  
Corresponding author: SHA Qi-ying, E-mail: shaqiyingyouxiang@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish a method for the determination of paeoniflorin in Sanjie Zhitong granule. **Methods** The content of paeoniflorin was determined by HPLC. To use the Hypersil ODS2 column (4.6×250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (17:83), the flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 230 nm. **Results** The linear range of paeoniflorin was within 52.4 ~ 524 μg/ml ( $r = 0.9999$ ). The average recovery was 99.76% (RSD = 4.68%). **Conclusion** The method is accurate and reliable. It can be applied in the determination of paeoniflorin in Sanjie Zhitong granule.

**【Key words】** Sanjie Zhitong granule; HPLC; Paeoniflorin; Content

散结止痛颗粒 (批准文号: 鲁药制字再 Z17080034) 是菏泽市中医医院一种主治各种乳腺增生的中药制剂, 具有理气活血、散结止痛的功效, 适用于治疗气滞血瘀痰凝而致的乳房胀痛、乳肿结块等各种类型的乳腺增生疾病。该医院制剂已使用多年, 临床疗效好, 具有开发上市前景。

散结止痛颗粒全方由香附、赤芍、当归、柴胡等共十六味中药组成, 赤芍为本制剂的君药, 具有清热凉血、散瘀止痛功效。赤芍总苷具有较强的清除自由基和抗凝血活性<sup>[1]</sup>; 其中芍药苷 (paeoniflorin)

是赤芍总苷的主要活性成分, 在总苷中含量占 75% 以上<sup>[2]</sup>, 具有多种生物作用, 如抗菌抗炎、调节免疫功能<sup>[3,4]</sup>, 所以测定芍药苷含量可以控制该制剂的内在质量。由此建立了测定散结止痛颗粒中芍药苷含量的高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)。

## 1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10ATVP 液相色谱仪, SPD-10Avp 紫外检测器; KQ-250E 型医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Sartorius BP211D 电子天平。

芍药苷 (批号: 110736-200525) 购于中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯; 水为纯净水; 散结止痛颗粒样品均为菏泽市中医医院制剂科自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适应性试验<sup>[5]</sup>

色谱柱: 依利特 Hypersil ODS2 高效液相色谱柱

作者单位: 274000 山东省菏泽市中医医院制剂科 (袁继承、吕伟斌); 山东省菏泽市药品检验所中药科 (沙启营); 山东睿鹰先锋制药有限公司 (袁继鲁)

作者简介: 袁继承 (1978 - ), 硕士, 主管药师。研究方向: 中药制剂及质量标准研究。E-mail: yjc8183@sina.com

通讯作者: 沙启营 (1963 - ), 本科, 副主任中药师。研究方向: 中药炮制及质量标准研究。E-mail: shaqiyingyouxiang@163.com

(4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈—水 (17:83); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 检测波长: 230 nm; 芍药苷的理论塔板数不低于 3000。经过多种芍药苷的测定方法实验比较, 本方法对芍药苷分离效果好, 同时阴性样品无干扰, 且洗脱时间短, 因此, 最终采用上述芍药苷的高效液相色谱条件。

## 2.2 对照品溶液及标准曲线制备

精密称取芍药苷对照品 5.24 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 即得浓度为 0.524 mg/ml 的芍药苷对照品储备溶液。取对照品储备溶液 2.5 ml, 置于 5 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 262.0 mg/ml 的芍药苷对照品溶液。

芍药苷标准曲线制备: 精密吸取配制的芍药苷对照品储备溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2 ml, 分别置于 2 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列浓度为 52.4、104.8、157.2、209.6、262.0、393.0、524.0 μg/ml 的芍药苷对照品溶液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样 10 μl 于色谱仪中测定。结果芍药苷浓度在 52.4 ~ 524 μg/ml 范围内与峰面积有良好的线性关系, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程:  $Y = 6341.9X + 76190$ ,  $r = 0.9999$ 。

## 2.3 供试品溶液制备

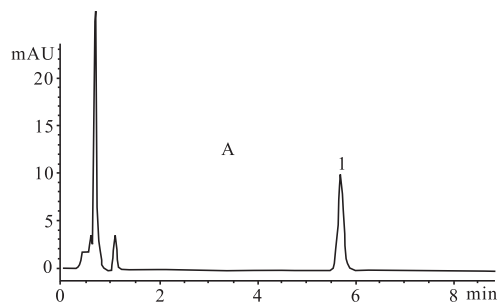
精密称定 2.0 g 散结止痛颗粒 (批号: 20100503), 用 50 ml 甲醇为溶剂分两次进行超声提取, 每次超声 15 分钟, 放冷, 称重, 滤过, 得续滤液于蒸发皿中水浴蒸干, 定量转移至 10 ml 容量瓶中, 用流动相定容至刻度即得供试品溶液。

## 2.4 专属性试验

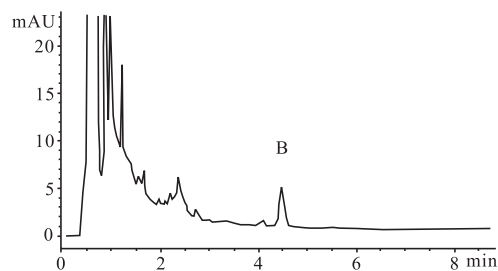
根据处方中各药味的比例, 按照散结止痛颗粒制备工艺制备不含赤芍的颗粒, 按照供试品提取条件及制备方法配制空白溶液, 用高效液相色谱法测定, 结果该空白溶液与散结止痛颗粒溶液的 HPLC 色谱图在相应的保留时间无吸收, 表明该方法对散结止痛颗粒中芍药苷的测定具有专属性, 可以用于散结止痛颗粒的芍药苷含量测定 (见图 1)。

## 2.5 对照品和样品稳定性试验

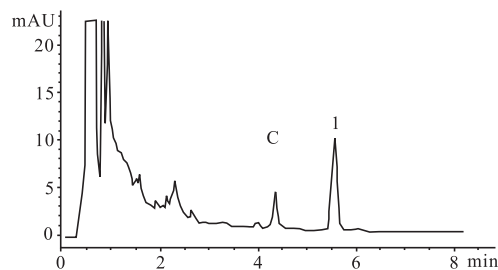
取芍药苷对照品溶液和供试品溶液分别于配制后 1 小时、24 小时、48 小时分别连续 3 次依法测定峰面积, 结果表明, 对照品溶液和供试品溶液在 48 小时内稳定。



A 芍药苷对照品



B 空白样品



C 散结止痛颗粒样品

图 1 芍药苷高效液相色谱图

## 2.6 精密度试验

精密吸取浓度为 262.0 μg/ml 的对照品溶液 10 μl 于色谱仪中, 重复进样 5 次, 计算其峰面积的 RSD 为 0.44%, 表明精密度较好。

## 2.7 重现性试验

取同一批散结止痛颗粒 5 份, 按照 2.2 方法测定样品中芍药苷含量, 计算样品 RSD 为 2.80%, 表明重现性良好。

## 2.8 回收率试验

精密称取已知含量的同一批散结止痛颗粒 6 份, 分别精密加入一定量的芍药苷储备液, 用供试品溶液方法提取浓缩, 定量转移至 5 ml 容量瓶中, 用流动相定容至刻度。依法测定, 并计算回收率, 平均回收率为 99.76%, RSD 为 4.68%。表明本方法具有良好的回收率。

## 2.9 样品测定结果

取 5 批次散结止痛颗粒样品, 按照所述方法进行芍药苷测定含量, 每批 3 次, 结果见表 1。

表 1 5 批样品中芍药苷含量测定结果

批次	样品含量 (mg/g)	RSD(%)
20100503	1.93	1.95
20100601	1.73	1.03
20100602	2.15	0.96
20100703	1.42	1.12
20110101	1.51	0.97

根据中国药典 2010 年版一部对赤芍药材中芍药苷不得少于 1.8 % 的规定,结合制备的 5 批样品中芍药苷的含量测定结果,最低含量 1.42 mg/g,最高含量 2.15 mg/g,故初步暂定散结止痛颗粒中芍药苷(C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>)的含量不得小于 1.5 mg/g。每袋装量 12 g,则本品含芍药苷的量每袋不小于 18.0 mg。

### 3 讨论

本实验流动相系统的确定时,分别考察了甲醇—水、甲醇—0.1%磷酸溶液两种流动相<sup>[6]</sup>,结果芍药苷分离不完全,受到其他成分一定的干扰,且峰型不好,故选择乙腈—水系统,确定乙腈—水溶液(17:83)为流动相时,芍药苷的分离度、峰型均较好,符合测定含量的要求。

在制备供试品溶液的提取方法中,分别考察了提取方法和时间、提取次数、提取溶剂及其使用量对芍药苷的影响。首先参考相关文献<sup>[7]</sup>初步采用甲醇提取芍药苷,在提取方法选择上,结果超声提取比回流提取简单易操作,并可以达到提取完全的

目的,故采用超声提取方法;在超声时间和溶媒用量上,通过多次试验,结果 50 ml 甲醇分两次提取,每次超声 15 分钟即可将芍药苷提取完全。

该医院制剂成分复杂,多年临床应用证明其安全、有效,但其质量标准仅对成品进行两味药材定性鉴别,未建立中间产品及成品定量检测控制标准。为保证药品质量,本试验建立的散结止痛颗粒中芍药苷含量测定方法简便、准确、结果可靠,能有效地控制散结止痛颗粒的质量,保证了临床疗效的稳定,并可为进一步申报中药新药做好准备。

### 参 考 文 献

- [1] 朴田,莫晓燕,林瑞峰. 赤芍总苷提取液体外清除自由基和抗凝血活性的研究[J]. 中国药房,2007,19(9):643-646.
- [2] 马双成,邓少伟. 赤芍总苷的生产工艺条件研究[J]. 中草药,1998,29(10):664.
- [3] 华东,吴明媛,于晓红,等. 赤芍总苷对荷瘤鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中医药学报,2004,32(1):47.
- [4] 王晓玉,魏伟,唐丽琴,等. 芍药苷对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及其产生细胞因子的影响[J]. 安徽医科大学学报,2007,42(2):191-192.
- [5] 吴洪文,李明艳. 高效液相色谱法测定蝎龙酒中芍药苷的含量[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(17):1486.
- [6] 侯林中,裴玉书,张熙洁,等. HPLC 法测定宽心口服液中药芍药苷的含量[J]. 中国药房,2011,22(31):2933-2934.
- [7] 李文博,韩建平,倪倩,等. SPE-UPLC 法测定养血清脑颗粒中的芍药苷含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(7):1385-1388.

(收稿日期:2012-12-03)

(本文编辑:黄凡)

## · 信息之窗 ·

### 本刊“中医病案析评”栏目征稿

《环球中医药》杂志开辟“中医病案析评”栏目。中医医籍医案是中医学术传承的宝库,中医住院病历的书写也对中医师分析病案提出了较高的要求,希望通过本栏目,广大读者将临床中遇到的典型病案或疑难病案整理刊发,交流辨证体会、临床心得,提高学术水平,共同成长。

#### 写作格式与要求

文题可以用中医辨证、中医诊断命名,也可以用主要症状、体征、西医诊断命名,也可以用中医证名和西医病名混合命名。无需英文文题。

本栏目文章结构分为“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。“病历摘要”用准确简洁语言交代清楚患者主诉、病史、中医西医诊断、中医辨证、治法、用药、复诊情况等。“分析与讨论”部分要求逻辑性强、说理清楚、体现良好的中医辨证素养与临床思维模式,展示出对临床工作的实际借鉴意义。

讨论开始部分请明确指出本病案分析讨论的要点和重点。请作者给出诊断和辨证的结论或意见,所分析的病案应有西医诊断结果和确诊证据。请总结相关疾病的国内外研究作简要评述。文后列出主要参考文献。

总字数控制在 5000 字以下。需中文摘要及关键词。

作者在文题下署名,拥有本文著作权,论文性质等同于本刊论著,文献标识码为 A。

文章形式建议由作者系统归纳,形成思路清晰、条理清楚、科学性强的临床论文;也可以采用依次发言形式或师生问答形式。

本栏目论文目的在于共同学习,请勿文过饰非,修改原始处方和病例。引用中医典籍中基础理论不宜过多。