

高效液相色谱法测定丹栀逍遥丸中 6 个成分的含量

孙华

(南京中医药大学连云港附属医院药学部, 连云港 222004)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定丹栀逍遥丸中 6 个化学成分栀子苷、丹皮酚、白芍苷、芍药苷、白术内酯 I、白术内酯 II 的含量, 为其质量控制提供参考。方法: 采用 Kromasil 100-5- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.3% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 230 nm (检测栀子苷、白芍苷、芍药苷、白术内酯 II) 和 270 nm (检测丹皮酚、白术内酯 I), 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。结果: 丹栀逍遥丸中栀子苷、丹皮酚、白芍苷、芍药苷、白术内酯 I、白术内酯 II 均能达到基线分离, 线性关系良好, 平均回收率分别为 100.1%、100.6%、99.8%、102.6%、98.8%、103.1%, RSD 均 $\leq$ 2.8%。该方法的精密度、稳定性、重复性良好。3 批丹栀逍遥丸中上述 6 个成分的含量测定结果分别为 5.010~5.685、3.130~3.761、5.113~5.697、0.088~0.090、2.448~2.495、0.036~0.041 mg $\cdot$ g⁻¹。结论: 该方法可用于丹栀逍遥丸中栀子苷、丹皮酚、白芍苷、芍药苷、白术内酯 I、白术内酯 II 的含量测定, 可用于丹栀逍遥丸的质量控制。

关键词: 丹栀逍遥丸; 高效液相色谱法; 栀子苷; 丹皮酚; 白芍苷; 芍药苷; 白术内酯

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2020) 02-0346-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.02.20

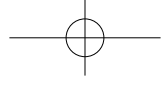
Simultaneous determination of six constituents in Danzhi Xiaoyao pills by HPLC

SUN Hua

(Department of Pharmacy, Lianyungang Affiliated Hospital, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang 222004, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of geniposide, paeonol, albiflorin, paeoniflorin, atractylode I and atractylode II in Danzhi Xiaoyao pills, so as to provide reference for its quality control. **Methods:** Separation was performed on a Kromasil 100-5- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) column. The mobile phase was 0.3% phosphoric acid-acetonitrile at a flow rate of 1 mL $\cdot$ min⁻¹ with gradient elution. The column temperature was 25 $^{\circ}$ C and the injection volume was 10 μ L. The detection wavelength were set at 230 nm for geniposide, albiflorin, paeoniflorin and atractylode II, and 270 nm for paeonol and atractylode I. **Results:** The six markers reached baseline separation, the linearity was good and the average recoveries were 100.1%, 100.6%, 99.8%, 102.6%, 98.8% and 103.1%, respectively with RSDs less than 2.8%. Precision, stability and reproducibility

作者 Tel: 13851289887; E-mail: dxdjx14@163.com



of the method were satisfactory. The contents of the above six components in 3 batches of sample were 5.010–5.685, 3.130–3.761, 5.113–5.697, 0.088–0.090, 2.448–2.495 and 0.036–0.041 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The method can be used for the contents determination of six compounds in Danzhi Xiaoyao pills, and can be used for the quality control of Danzhi Xiaoyao pills.

Keywords: Danzhi Xiaoyao pills; HPLC; geniposide; paeonol; albiflorin; paeoniflorin; atractylode

丹栀逍遥丸又名加味逍遥丸,由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、牡丹皮、栀子、薄荷组成,具有舒肝解郁、健脾养血的功效,中医临床上用于肝郁血虚,肝脾不和、两胁胀痛、头晕目眩、倦怠食少、月经不调、脐腹胀痛等^{[1]816}。现行 2015 年版《中华人民共和国药典》对于丹栀逍遥丸仅以芍药苷为其含量测定的指标,无法对其制剂进行整体质量控制。由于丹栀逍遥丸在中医临床中应用比较广泛,因此很多学者尝试建立多成分同时测定的方法,以期为其质量控制提供参考。如杨永红^[2]建立了可以同时测定丹栀逍遥散中 6 个成分含量的高效液相色谱法,其所测成分为栀子苷、中京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚,为丹栀逍遥丸的质量控制研究提供了参考;于新兰等^[3]建立了可以同时测定丹栀逍遥丸中芍药苷、丹皮酚、阿魏酸、甘草苷、甘草酸、栀子苷、西红花苷 I 和西红花 II 7 个成分的高效液相色谱法,结合化学计量学分析法,为丹栀逍遥丸及其相关制剂的整体质量控制提供思路。但是,多数研究^[4–8]测定的化合物均来源于白芍、牡丹皮、栀子、甘草等,存在检测指标单一,未见有关白术成分的含量测定。本文建立了高效液相色谱法,可以同时测定加味逍遥丸中栀子苷、丹皮酚、白芍苷、芍药苷、白术内酯 I、白术内酯 II 6 个化学成分,涵盖了君、臣药中栀子、牡丹皮、白芍、白术中的代表性成分,可以为丹栀逍遥丸的质量控制及临床应用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱系统(Waters 公司); BT25S 型十万分之一电子天平(Sartorius 公司); 超声波清洗器(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂 对照品栀子苷(批号 110749–201617)、芍药苷(批号 110736–201332)、丹皮酚(批号 110708–201608)均购于中国食品药品检定研究院;对照品白术内酯 I(批号 160617)和白术内酯 II(批号 160522)购于四川省维克奇生物科技有限公司;对照

品白芍苷(批号 BSG–20150632)购于南京世洲生物科技有限公司,所有对照品含量均 >98%。

丹栀逍遥丸(河北万岁药业有限公司,批号 180408、180604、180806)。

乙腈(上海 ANPEL 实验器材有限公司)和磷酸(上海阿拉丁生物科技有限公司)均为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

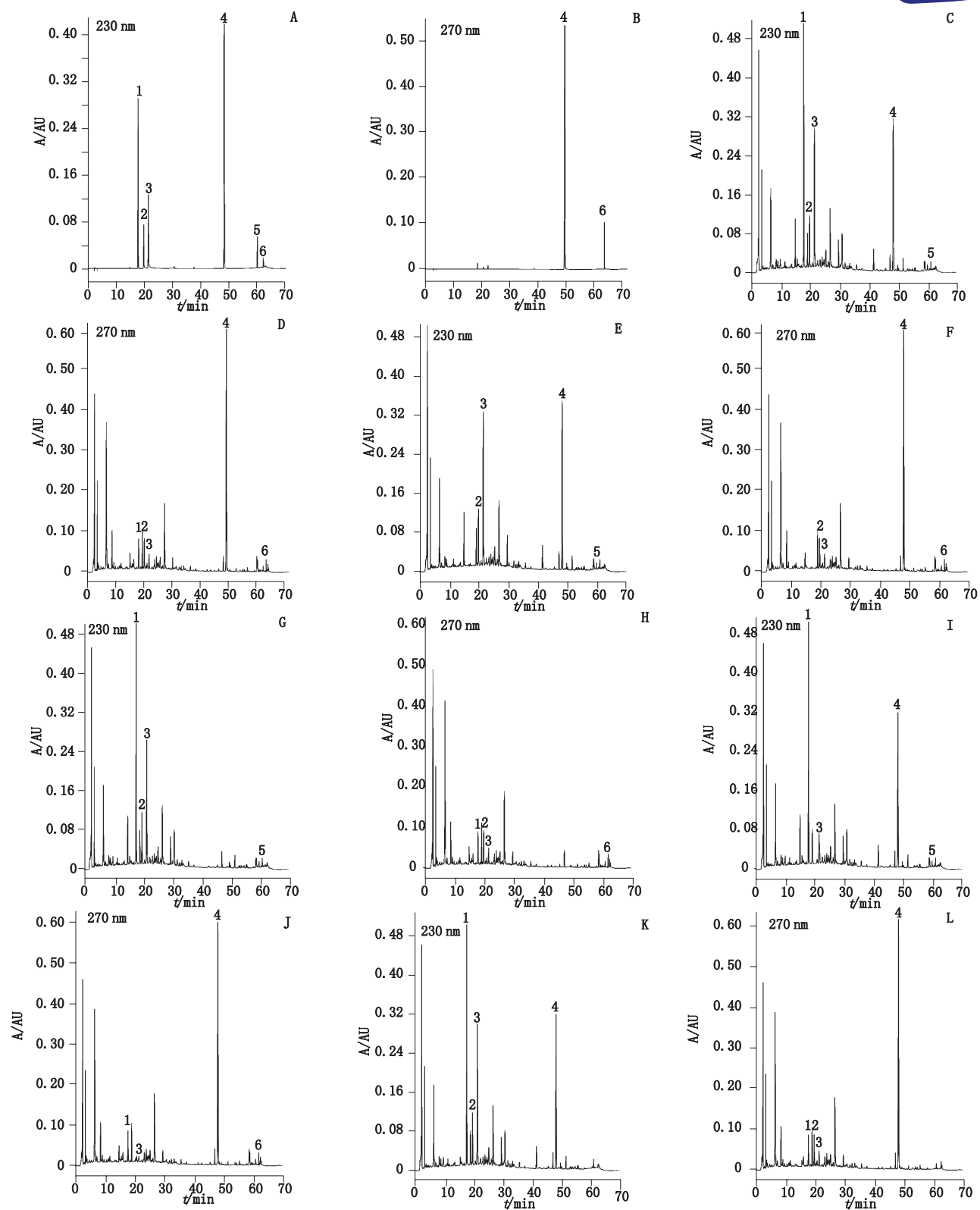
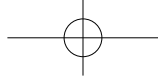
2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil 100–5–C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量: 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相: 0.3% 磷酸水溶液(A)–乙腈(B), 梯度洗脱(0–30 min, 95A → 65%A; 30–60 min, 65 A → 35%A; 60–95 min, 35 A → 0%A); 进样量: 10 μL ; 检测波长: 栀子苷、白芍苷、芍药苷、白术内酯 II 为 230 nm, 丹皮酚、白术内酯 I 为 270 nm。色谱图如图 1 所示。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定对照品栀子苷、白芍苷、芍药苷、丹皮酚、白术内酯 I、白术内酯 II 80.4、33.4、33.4、72.0、2.8、4.2 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到质量浓度分别为 8.04、3.34、3.34、7.20、0.28、0.42 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品溶液。

精密移取各单一对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得到栀子苷、白芍苷、芍药苷、丹皮酚、白术内酯 I、白术内酯 II 质量浓度分别为 0.804、0.334、0.334、0.720、0.028、0.042 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取丹栀逍遥丸适量, 研细, 过 100 目筛, 取约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇水 20 mL, 密塞, 称量, 超声处理(250 W、35 kHz) 30 min, 放冷, 用 70% 甲醇水补足减失的量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

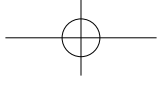
2.4 阴性样品溶液的制备 根据丹栀逍遥丸的处方, 分别制备缺栀子、牡丹皮、白芍、白术的阴性样品, 按“2.3”项下方法制成阴性样品溶液, HPLC 图见图 1。



1. 梔子苷 (geniposide) 2. 白芍苷 (albiflorin) 3. 芍药苷 (paeoniflorin) 4. 丹皮酚 (paeonol) 5. 白术内酯II (atractylode II) 6. 白术内酯I (atractylode I)
A、B. 对照品 (reference substances) C、D. 样品 (sample) E、F. 梔子阴性样品 (negative sample without Gardeniae Fructus) G、H. 牡丹皮阴性样品 (negative sample without Moutan Cortex) I、J. 白芍阴性样品 (negative sample without Paeoniae Radix Alba) K、L. 白术阴性样品 (negative sample without Atractylodis Macrocephalae Rhizoma)

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms



2.5 线性关系考察 将“2.2”项下的混合对照品溶液分别稀释 0、2、4、8、16 倍,将稀释液注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件测定,以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 $X(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,绘制标准曲线,见表 1。

表 1 6 个成分的标准曲线

Tab. 1 Calibration curves of six components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/(mg · mL ⁻¹)
栀子苷 (geniposide)	$Y=1.096 \times 10^7 X+1.442 \times 10^5$	1.000	0.050 3~0.804
白芍苷 (albiflorin)	$Y=8.152 \times 10^6 X+1.671 \times 10^5$	0.999 9	0.020 9~0.334
芍药苷 (paeoniflorin)	$Y=1.532 \times 10^7 X+1.831 \times 10^4$	0.999 9	0.020 9~0.334
白术内酯 II (atractylode II)	$Y=3.072 \times 10^7 X+2.118 \times 10^4$	0.999 9	0.002 6~0.042
丹皮酚 (paeonol)	$Y=4.259 \times 10^7 X+8.008 \times 10^5$	0.999 8	0.045~0.720
白术内酯 I (atractylode I)	$Y=6.048 \times 10^7 X+3.846 \times 10^4$	1.000	0.001 8~0.028

2.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,重复进样 6 次,计算 6 个成分峰面积的 RSD,结果见表 2。

表 2 6 个成分的精密度、稳定性、重复性试验的 RSD

Tab. 2 Precision, stability and reproducibility tests of the six components

成分 (component)	精密度 (precision)	稳定性 (stability)	重复性 (repeatability)
栀子苷 (geniposide)	0.22	1.9	1.3
白芍苷 (albiflorin)	0.78	1.8	1.8
芍药苷 (paeoniflorin)	0.69	1.6	1.1
白术内酯 II (atractylode II)	0.60	0.67	0.9
丹皮酚 (paeonol)	0.48	2.4	1.7
白术内酯 I (atractylode I)	1.1	1.0	2.3

2.7 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 精密吸取 10 μL 进样,按“2.1”项下色谱条件测定,计算 6 个成分峰面积的 RSD,结果见表 2。

2.8 重复性试验 按“2.3”项下方法重复制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定 6 个成分的含量分别为 5.315、3.437、5.324、0.089、2.469、0.038 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,并计算 RSD,结果见表 2。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(批号 180806)0.5 g,共 6 份。精密称定,置于锥形瓶中,分别精密加入栀子苷 2.85 mg、白芍苷 1.86 mg、芍药苷 2.90 mg、白术内酯 II 0.04 mg、丹皮酚 1.24 mg、白术内酯 I 0.02 mg(其中,栀子苷、白芍苷、芍药苷、丹皮酚加入的是标准品粉末,白术内酯 I 和白术

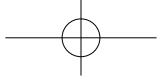
内酯 II 加入的是等量的对照品溶液)。按“2.3”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,计算 6 个成分的回收率。结果见表 3。

2.10 样品含量测定 取市售丹栀逍遥丸适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定 6 个成分的含量,结果见表 4。

3 讨论

多波长同时测定可以在不同的波长下实现多成分的同时测定,适合于中药复杂体系的含量测定,故为越来越多的学者所青睐^[3,9-11]。本实验对供试品溶液进行全波长扫描,结合各成分的最大吸收波长,使各成分均有较高响应,优选出了 2 个适宜的波长,即栀子苷、白芍苷、芍药苷、白术内酯 II 在 230 nm 波长下,丹皮酚、白术内酯 I 在 270 nm 波长下。此外,分别考察了水-甲醇、水-乙腈、0.1% 甲酸水-乙腈、0.3% 磷酸水-乙腈流动相系统,发现样品在 0.3% 磷酸水-乙腈系统下,响应和峰形最好,因此选择流动相为 0.3% 磷酸水-乙腈。

丹栀逍遥丸已有的报道多以牡丹皮、栀子、白芍、甘草中的成分测定为主,但其疏肝解郁主要为柴胡的功效,2015 年版《中华人民共和国药典》以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为其含量测定指标^{[1]280},本实验也尝试测定柴胡中代表性成分,但是供试品溶液在 210 nm 处并未显示出柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的色谱峰。故本文在测定牡丹皮、栀子、白芍中化学成分的基础上,增加了白术中白术内酯 I 和白术内酯 II 的含量测定,以期更加全面地对丹栀逍遥丸质量进行控制。

表 3 6 个成分的加样回收率 ($n=6$)

Tab. 3 Recovery of the six components

成分 (component)	称样量 (sample)/g	样品中量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均值 (average recovery)/%	RSD/ %
栀子苷 (geniposide)	0.504 2	2.866	2.85	5.733	100.6	100.1	2.8
	0.507 1	2.883	2.86	5.66	97.1		
	0.494 4	2.810	2.80	5.725	104.1		
	0.506 1	2.877	2.82	5.618	97.2		
	0.506 8	2.881	2.78	5.637	99.1		
	0.492 7	2.801	2.83	5.699	102.4		
白芍苷 (albiflorin)	0.504 2	1.896	1.86	3.756	100.0	99.8	2.4
	0.507 1	1.907	1.83	3.763	101.4		
白芍苷 (albiflorin)	0.494 4	1.859	1.93	3.765	98.7		
	0.506 1	1.903	1.92	3.750	96.2		
	0.506 8	1.906	1.87	3.762	99.3		
	0.492 7	1.853	1.85	3.759	103.0		
芍药苷 (paeoniflorin)	0.504 2	2.872	2.90	5.856	102.9	102.6	1.6
	0.507 1	2.889	2.86	5.745	99.9		
	0.494 4	2.817	2.93	5.887	104.8		
	0.506 1	2.883	2.88	5.843	102.8		
	0.506 8	2.887	2.91	5.852	101.9		
	0.492 7	2.807	2.92	5.826	103.4		
白术内酯 II (atractylode II)	0.504 2	0.045	0.044	0.091	103.4	103.1	0.30
	0.507 1	0.046	0.044	0.091	102.8		
	0.494 4	0.045	0.044	0.09	103.2		
	0.506 1	0.046	0.044	0.091	103.0		
	0.506 8	0.046	0.044	0.091	102.9		
	0.492 7	0.044	0.044	0.09	103.5		
丹皮酚 (paeonol)	0.504 2	1.258	1.24	2.532	102.7	100.6	2.8
	0.507 1	1.265	1.22	2.528	103.5		
	0.494 4	1.234	1.26	2.466	97.8		
	0.506 1	1.263	1.23	2.533	103.3		
	0.506 8	1.265	1.25	2.501	98.9		
	0.492 7	1.229	1.27	2.469	97.6		
白术内酯 I (atractylode I)	0.504 2	0.021	0.022	0.042	96.8	98.8	2.0
	0.507 1	0.021	0.022	0.043	100.8		
	0.494 4	0.020	0.022	0.042	98.7		
	0.506 1	0.021	0.022	0.043	101.0		
	0.506 8	0.021	0.022	0.042	96.3		
	0.492 7	0.020	0.022	0.042	99.0		

表 4 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 4 The contents of six components in Danzhi Xiaoyao pills

批号 (lot No.)	栀子苷 (geniposide)	白芍苷 (albiflorin)	芍药苷 (paeoniflorin)	白术内酯Ⅱ (atractylode Ⅱ)	丹皮酚 (paeonol)	白术内酯Ⅰ (atractylode Ⅰ)
180408	5.575	3.603	5.616	0.089	2.448	0.036
180604	5.010	3.130	5.113	0.088	2.450	0.040
180806	5.685	3.761	5.697	0.090	2.495	0.041

本文建立了一种可以同时测定丹栀逍遥丸中栀子苷、丹皮酚、白芍苷、芍药苷、白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ 6 个化学成分的高效液相色谱法,方法快速、准确,重复性高,可操作性强,可用于丹栀逍遥丸的质量控制。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 816, 280
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 816, 280
- [2] 杨永红. 丹栀逍遥散 6 种有效成分的 HPLC 测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 97
YANG YH. Simultaneous determination of six constituents in Danzhi Xiaoyaosan by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(16): 97
- [3] 于新兰, 冯春蕾, 王雪, 等. 多波长 HPLC 法测定加味逍遥丸中多种成分含量及化学计量学分析[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1262
YU XL, FENG CL, WANG X, *et al.* Multi-components determination and chemometric analysis of Jiawei Xiaoyao pills by multi-wavelength detection and HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(7): 1262
- [4] 周瑾, 庄惠清. HPLC 法测定丹栀逍遥丸中栀子苷和芍药苷的含量[J]. 中国药事, 2007, 21(7): 495
ZHOU J, ZHUAN HQ. Determination of gardenoside and paeoniflorin in Danzhi Xiaoyao pills by HPLC [J]. Chin Pharm Aff, 2007, 21(7): 495
- [5] 侯玉华, 李智, 李俊雅, 等. RP-HPLC 法测定复方丹栀逍遥丸中栀子苷的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(47): 4480
HOU YH, LI Z, LI JY, *et al.* Content determination of geniposide in compound Danzhi Xiaoyao pills by RP-HPLC [J]. China Pharm, 2010, 21(47): 4480
- [6] 周欣, 杨文业. 高效液相色谱法测定丹栀逍遥丸中栀子苷、芍药苷、丹皮酚和甘草酸含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 784
ZHOU X, YANG WY. HPLC determination of jasminoidin, paeoniflorin, paeonal and glycyrrhizic acid in Danzhi Xiaoyao pills [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(7): 784
- [7] 杜蓉, 张孟佑. HPLC 法测定加味逍遥丸中芍药苷与甘草苷的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(18): 2571
DU R, ZHANG MY. Content determination of paeoniflorin and liquiritin in Jiawei Xiaoyao pills by HPLC [J]. China Pharm, 2015, 26(18): 2571
- [8] 杨庆胜, 冯朝岭, 司根令. HPLC 同时测定加味逍遥丸中栀子苷和芍药苷的含量[J]. 中国现代中药, 2015, 17(1): 61
YANG QS, FENG CL, SI GL. Determination of geniposide and paeoniflorin in Jiawei Xiaoyao pills by HPLC [J]. Mod Chin Med, 2015, 17(1): 61
- [9] 陈辉, 张石楠, 马昕. 双波长高效液相色谱法同时测定蓝芩口服液中 5 种化学成分的含量[J]. 中南药学, 2018, 16(10): 1430
CHEN H, ZHANG SN, MA X. Simultaneous determination of 5 components in Lanqin oral solution by dual-wavelength HPLC [J]. Cent South Pharm, 2018, 16(10): 1430
- [10] 刘倩倩, 谢子立. 高效液相色谱双波长法测定复方罗布麻片 I 中 6 个组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(9): 1593
LIU QQ, XIE ZL. Determination of the contents of six components in compound kendir leaf tablets I by dual wavelengths of HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(9): 1593
- [11] 张梅, 任爱农, 杨玉兰, 等. HPLC 波长切换法同时测定清清颗粒中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 29
ZHANG M, REN AN, YANG YL, *et al.* Simultaneous determination of contents of nine components in Qingqing granules by HPLC wavelength switching method [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(1): 29

(本文于 2019 年 1 月 15 日收到)