

## · 研究报告 ·

## HPLC-DAD 法同时测定肝八味胶囊中 4 种成分的含量

吴丽红, 储忠英, 刘惠军(上海市松江食品药品检验所, 上海 201600)

**[摘要]** **目的** 用高效液相色谱(HPLC)法同时测定肝八味胶囊中 4 种成分的含量。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为 C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B, 梯度洗脱; 检测波长为 240 nm; 流速 1.0 ml/min。**结果** 丹酚酸 B 对照品在 15.026~100.17 μg/ml 范围内呈良好线性关系, 平均加样回收率为 96.6% (n=6), RSD=1.8% (n=6); 芍药苷对照品在 14.335~95.564 μg/ml 范围内呈良好线性关系, 平均加样回收率为 97.0% (n=6), RSD=1.7% (n=6); 虎杖苷对照品在 8.235~54.90 μg/ml 范围内呈良好线性关系, 平均加样回收率为 97.2% (n=6), RSD=1.8% (n=6); 大黄素对照品在 1.582 5~10.55 μg/ml 范围内呈良好线性关系, 平均加样回收率为 98.1% (n=6), RSD=1.7% (n=6)。**结论** 此法简单准确、重现性好、专属性强、阴性对照无干扰, 适用于肝八味胶囊的质量控制。

**[关键词]** 肝八味胶囊; 高效液相色谱法; 丹酚酸 B; 芍药苷; 虎杖苷; 大黄素

**[中图分类号]** R927.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2015)03-0250-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.015

## Simultaneous determination of four ingredients in Gan Bawei capsule by HPLC-DAD

WU Lihong, CHU Zhongying, LIU Huijun (Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish an HPLC-DAD method for simultaneous determination of four ingredients in Gan Bawei capsule. **Methods** HPLC method was adopted with C<sub>18</sub> column(250 mm ×4.6 mm, 5 μm), Acetonitrile as mobile phase A and water as mobile phase B in gradient elution mode. The detection wavelength was 240 nm and the flow rate was 1.0 ml/min. **Results** Salvianolic acid B reference substance was excellently linear in the range of 15.026~100.17 μg/ml, the average recovery was 96.6% (n=6) and RSD was 1.8% (n=6). Paeoniflorin reference substance was excellently linear in the range of 14.335~95.564 μg/ml, the average recovery was 97.0% (n=6) and RSD was 1.7% (n=6). Polydatin reference substance was excellently linear in the range of 8.235-54.90 μg/ml, the average recovery was 97.2% (n=6) and RSD was 1.8% (n=6). Emodin reference substance was excellently linear in the range of 1.582 5-10.55 μg/ml, the average recovery was 98.1% (n=6) and RSD was 1.7% (n=6). **Conclusion** The method was easy, accurate, reproducible, specific and without interference in negative control, which could be used for quality control of Gan Bawei capsule.

**[Key words]** Gan Bawei capsule; HPLC; salvianolic acid B; paeoniflorin; polydatin; emodin

肝八味胶囊<sup>[1]</sup>是上海方心制药科技有限公司生产, 由丹参、白芍、虎杖、穿山甲、鳖甲、三七、鸡内金、发酵虫草菌丝粉等八味药材组成, 其中丹参、白芍、虎杖是主药, 具有活血散结、利湿解毒、滋阴养肝之功效, 起重要治疗作用。原制剂标准中只有对丹参和虎杖的鉴别和胶囊剂项下规定的检查项目, 为了能更好地控制该制剂质量, 笔者采用 HPLC 法对制剂中丹参、白芍、虎杖等主药成分所含丹酚酸 B、芍药苷、虎杖苷、大黄素进行定量测定。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent HP1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技中国有限公司, 自动进样器, 二极管阵列检测器, 四元泵); 万分之一电子分析天平(梅特勒-托利集团, METTLER AG135); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 肝八味胶囊(规格为 0.3 g/粒, 上海方心制药科技有限公司, 批号 20121201、20130601、20130602)。丹酚酸 B 对照品(111562-201212, 含量 95.4%)、芍药苷对照品(110736-201337, 含量 94.9%)、虎杖苷对照品(111575-200301, 含量 100%)、大黄素(110756-200110, 含量 100%), 均购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯(德

**[作者简介]** 吴丽红, 本科, 主管药师. 研究方向: 医院制剂质量控制. Tel: (021) 57822502, 18917168208; E-mail: wulihong@smda.gov.cn

国默克),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**<sup>[2-5]</sup> 色谱柱:Athena C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈为流动相 A,水为流动相 B,线性梯度洗脱,0~10 min,10% A;10~30 min,10%~30% A;30~35 min,30%~80% A;35~50 min,80% A;50~55 min,80%~10% A;55~65 min,10% A;检测波长:240 nm,流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl,按丹酚酸 B 计算理论板数应不低于 5 000。

**2.2 溶液的制备**<sup>[2-5]</sup> ①对照品溶液:分别称取丹酚酸 B 对照品约 10 mg、芍药苷对照品约 10 mg、虎杖苷对照品约 5 mg,加甲醇定容到 200 ml 容量瓶制成混合对照品溶液;称取大黄素对照品约 10 mg 稀释到 50 ml 容量瓶中,再取稀释液 5 ml 加入到上述混合对照溶液中,制成每 1 ml 含丹酚酸 B 50 μg、

芍药苷 50 μg、虎杖苷 25 μg、大黄素 5 μg 的混合对照溶液。②供试品溶液:精密称取供试品 0.3 g,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 50 ml,密塞,称定重量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 50 kHz),放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。③阴性对照溶液:按处方组成,制备不含丹参、白芍和虎杖的阴性模拟制剂,照上述供试品溶液的制备方法制备。

**2.3 系统适用性试验** 取供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液,在上述色谱条件下进样 10 μl,记录色谱图,结果见图 1。由色谱图知,按丹酚酸 B 计算理论板数不低于 5 000,丹酚酸 B 的保留时间约 21.8 min,芍药苷的保留时间约 22.9 min,虎杖苷的保留时间约 26.3 min,大黄素的保留时间约 39.8 min,阴性对照溶液在上述位置均无干扰峰。丹酚酸 B、芍药苷、虎杖苷、大黄素与其他组分可做到完全基线分离。

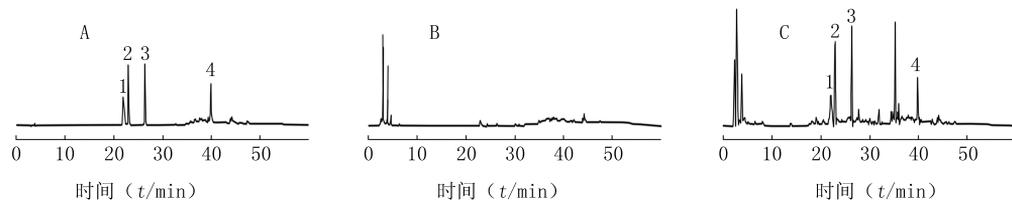


图 1 HPLC 色谱图

A. 对照品溶液; B. 阴性对照溶液; C. 供试品溶液; 1. 丹酚酸 B; 2. 芍药苷; 3. 虎杖苷; 4. 大黄素

**2.4 线性范围的测定** 样品测定是以外标法两点法测定各成分的含量。

**2.4.1 丹酚酸 B** 取丹酚酸 B 对照品配制成浓度为 50.085 μg/ml 的溶液,分别进样 3、5、10、15、20 μl,在上述色谱条件下测定峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程:  $Y = 10.194 49 X - 7.249 89$ ,  $r = 0.999 94$ ,表明丹酚酸 B 在 15.026~100.17 μg/ml 范围内线性关系良好。

**2.4.2 芍药苷** 取芍药苷对照品配制成浓度为 47.782 15 μg/ml 的溶液,分别进样 3、5、10、15、20 μl,在上述色谱条件下测定峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程:  $Y = 7.128 98 X + 50.554 75$ ,  $r = 0.999 96$ ,表明芍药苷在 14.335~95.564 μg/ml 范围内线性关系良好。

**2.4.3 虎杖苷** 取虎杖苷对照品配制成浓度为 27.45 μg/ml 的溶液,分别进样 3、5、10、15、20 μl,在上述色谱条件下测定峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程:  $Y = 9.099 58 X + 71.933 18$ ,  $r = 0.999 89$ ,表明虎杖苷在 8.235~

54.90 μg/ml 范围内线性关系良好。

**2.4.4 大黄素** 取大黄素对照品配制成浓度为 5.275 μg/ml 的溶液,分别进样 3、5、10、15、20 μl,在上述色谱条件下测定峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,测定回归方程:  $Y = 37.008 29 X + 58.108 71$ ,  $r = 0.999 90$ ,表明大黄素在 1.582 5~10.55 μg/ml 范围内线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 分别精密吸取(批号为 20130602)同一供试品溶液,连续重复进样 6 次,每次进样 10 μl,测定丹酚酸 B、芍药苷、虎杖苷和大黄素峰面积积分值,结果 RSD 丹酚酸 B 为 0.15% ( $n=6$ );芍药苷为 0.10% ( $n=6$ );虎杖苷为 0.18% ( $n=6$ );大黄素为 0.12% ( $n=6$ )。

**2.6 稳定性试验** 分别精密吸取(批号为 20130602)同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、24 h,精密吸取 10 μl 注入液相色谱仪,测定丹酚酸 B、芍药苷、虎杖苷和大黄素各成分含量,结果 RSD 丹酚酸 B 为 0.78%;芍药苷为 0.81%;虎杖苷为 0.36%;大黄素为 0.15%。表明供试品溶液 24 h 内

稳定性良好。

**2.7 重复性试验** 取同一批(批号为20130602)供试品,平行制备6份供试液,分别精密吸取10  $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定含量,丹酚酸B RSD为1.35% ( $n=6$ );芍药苷 RSD为1.02% ( $n=6$ );虎杖苷 RSD为1.15% ( $n=6$ );大黄素 RSD为1.00% ( $n=6$ ),说明方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 采用加样回收法,精密称取已知含量的样品(批号20130602),精密加入混合对照品溶液(含丹酚酸B对照品50.085 mg/ml、芍药苷对照品47.782 15 mg/ml、虎杖苷对照品27.45 mg/ml和大黄素对照品5.275 mg/ml)各10、15、20 ml,按供试品溶液制备方法操作,制成加样供试品溶液。精密吸取上述加样供试品溶液10  $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,按上述方法测定加样供试品溶液中丹酚酸B、芍药苷、虎杖苷和大黄素的含量,计算回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

成分	加入量 ( $m/\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
丹酚酸B	500.85	96.7	96.6	1.6
	751.27	96.9		2.1
	1 001.7	96.2		1.8
芍药苷	477.82	96.7	97.0	1.5
	716.73	97.1		1.6
	955.64	97.1		1.9
虎杖苷	274.50	97.2	97.2	1.6
	411.75	97.6		1.8
	549.00	96.8		1.9
大黄素	52.750	98.6	98.1	1.5
	79.120	97.1		1.8
	105.50	98.6		1.7

**2.9 样品含量测定** 按“2.2”项下方法制备成供试品溶液和对照品溶液,精密吸取供试品溶液及对照品溶液各10  $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,依法测定,以外标法两点计算丹酚酸B、芍药苷、虎杖苷和大黄素的含量,即得。结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=3$ )

批号	丹酚酸B		芍药苷		虎杖苷		大黄素	
	含量 ( $\rho_{\text{B}}/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	RSD (%)						
20121201	3.640	1.65	4.485	1.18	2.793	1.50	0.486 6	1.51
20130601	3.221	1.60	6.049	1.16	3.964	1.53	0.556 6	1.50
20130602	4.418	1.58	6.201	1.18	4.107	1.60	0.533 8	1.47

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择**<sup>[2]</sup> 在一个系统中同时测定4种成分含量找到它们共同的最大吸收波长尤为重要,根据查阅资料,4种成分吸收波长均不同,丹酚酸B 269 nm,芍药苷 230 nm,虎杖苷 306 nm,大黄素 254 nm,分别在230、240、250、270 nm波长实验,最后发现在240 nm处各峰吸收均好,能完全分离,理论板数也最高,故确定240 nm作为本试验的检测波长。

**3.2 供试品提取方法的确定**<sup>[2]</sup> 在供试品提取中,分别采取用50%甲醇和纯甲醇超声(10、20、30、60 min)、加热回流提取(30、60、120 min)3种方法进行试验,结果发现4种成分在纯甲醇中超声30 min提取效果最好,测得含量最高,故选用纯甲醇超声30 min作为本实验供试品提取方法。

**3.3 流动相比比例确认** 通过查阅文献<sup>[2-5]</sup>,发现测定这几种成分用等度流动相乙腈-水比较多,但比例都各不相同,后经反复摸索采用梯度洗脱乙腈-水调节流动相比比例能够很好分离4种成分,杂峰干扰少,

理论板数达到5 000以上。

**3.4 含量测定方法** 每批样品测得的丹酚酸B、芍药苷、虎杖苷和大黄素含量各不相同,可能是每批样品所用原药材的含量不同所致,因此很有必要对这4种成分的含量做相应的控制。本方为复方制剂,药味多,成分复杂,经多次试验,结果表明本方法的色谱条件柱效最高,分离度大,精密度高,重复性好,无干扰,且配制简单,能有效地控制该制剂的内在质量。

### 【参考文献】

- [1] 上海市食品药品监督管理局.SYZ-ZF-014-2004 上海市医疗机构制剂标准汇编[S].2014-6-16.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:22,70,96,194,569,592,958,1141.
- [3] 国家药典委员会.国家药品标准(新药转正标准)中药第七十册[S].北京:2008:4.
- [4] 国家药典委员会.国家药品标准(新药转正标准)中药第七十一册[S].北京:2008:32.
- [5] 国家药典委员会.国家药品标准(新药转正标准)中药第七十六册[S].北京:2009:64.

[收稿日期] 2014-02-18 [修回日期] 2014-12-12

[本文编辑] 顾文华