表 4 左金丸和香连丸样品含量结果($n=3$)

Table 4 The determination of 6 alkaloids in Zuojin Pill and Xianglian Pill

| 化合物 | 左金丸/(mg/g) | 香连丸/(mg/g) |
|---|---|---|
| 药根碱 | 7.43 ±0.072 | 5.28 ±0.073 |
| 黄连碱 | 4.04 ±0.038 | 2.33 ±0.041 |
| 巴马汀 | 7.35 ±0.11 | 4.13 ±0.075 |
| 小檗碱 | 49.6 ±0.26 | 44.5 ±0.26 |
| 吴茱萸碱 | 1.42 ±0.027 | 0.16 ±0.0029 |
| 吴茱萸次碱 | 1.26 ±0.014 | — |

## 3 讨论

左金丸由黄连和吴茱萸组成,具有泻火疏肝,和胃止痛的功效;香连丸由黄连(吴茱萸制)和木香组成,具有清热化湿、行气止痛的功效。两方药物组成相似,而功用却有较大差异。本实验表明,左金丸和香连丸主要活性成分含量相似,小檗碱、巴马汀、药根碱和黄连碱含量均较高,其中小檗碱含量为最高,但两方中吴茱萸成分存在较大差异,香连丸中吴茱萸碱含量不足左金丸中的 1/9,且香连丸中吴茱萸次碱在本实验条件下几乎检测不到。测定两方中主要活性成分的含量,可为进一步比较其疗效差异的研究提供依据。

左金丸和香连丸的活性成分大多采用高效液相色谱法[3-6]进行检测,采用有机溶剂和磷酸盐缓冲液为流动相,由于高效液相色谱法根据指定保留时间的色谱峰面积进行定量,要求各种成分色谱峰完全分离,分析时间较长,多在 30 min 左右,并且最低检测浓度均在 10 μg/mL 以上,不能用于活性成分浓度低于 10 μg/mL 的相关研究;由于缓冲液中磷酸盐不能挥发,故在 LC-MS/MS 中是不能用的。串联质谱法(MS/MS)根据特征碎片离子(子离子)的峰面积进行定量,专一性强,不要求各种成分色谱峰完全分离,分析快速。本实验采用 LC-MS/MS 法以乙腈-水(合适浓度的甲酸-乙酸铵缓冲液)为流动相,梯度洗脱,11 min 即可完成左金丸和香连丸中 6 种成分的分析;该方法的精密度、稳定性、重复性及回收率均较好,耗时短,同时分析 6 种成分,并且最低定量浓度为 0.5 ng/mL,可用于活性成分浓度较低的相关研究,有利于进一步完善左金丸、香连丸及其类方的质量控制及相关研究。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005: 412-413.
[2] 中国药典[S]. 一部. 2005: 521-522.
[3] 张 朔,张广财,万琳琳,等. RP-HPLC 同时测定左金丸中多指标成分含量[J]. 中成药,2009,31(6):873-876.
[4] 李 宇,韩凤梅,柳 伟,等. 反相高效液相色谱法测定加味左金丸中盐酸小檗碱和吴茱萸次碱的含量[J]. 中国药学杂志,2006,41(8):631-633.
[5] 朱妙琴. 反相高效液相色谱法同时测定黄连、左金丸及反左金丸中三种生物碱的含量[J]. 分析试验室,2007,26(增刊):144-146.
[6] 陶胜源,刘玉波,车 慧,等. 高效液相色谱法测定加味香连丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 解放军药学学报,2009,25(3):257-259.

# HPLC 测定补肾活血颗粒中芍药苷,阿魏酸,淫羊藿苷的含量

孔 铭, 朱玲英, 王佩娟, 彭蕴如
(江苏省中医药研究院,江苏 南京 210028)

关键词:补肾活血颗粒; 芍药苷; 淫羊藿苷; 阿魏酸; HPLC

摘要:目的:建立 HPLC 法测定补肾活血颗粒(淫羊藿、当归、白芍等)中芍药苷,阿魏酸,淫羊藿苷的含量方法。方法:采用二极管阵列检测器,色谱柱为 Alltima $C_{18}$(5 μm,250 mm×4.6 mm),流动相为甲醇-0.1% 磷酸,梯度洗脱,同时测定制剂中阿魏酸,芍药苷,淫羊藿苷的含量,检测波长分别为 230 nm,320 nm,270 nm。结果:补肾活血颗粒中的芍药苷,阿魏酸,淫羊藿苷的平均回收率为 96.7%,97.5%,99.6%,RSD 为 1.37%,3.13%,0.96%;在选择的 HPLC 条件下,芍药苷在 0.159~3.970 μg,阿魏酸在 0.048~1.200 μg,淫羊藿苷 0.207~5.175 μg 范围呈良好的线性关系。结论:方法简便,可靠,可作为该制剂质量控制方法。

收稿日期:2009-10-10
基金项目:江苏省自然基金项目(BK2007174)
作者简介:孔 铭(1978-),女,助理研究员,从事中药制剂的研发及质量标准的研究。Tel:(025)85639640 E-mail:kmawp1027@yahoo.com.cn



© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中图分类号:R927.2　　文献标识码:A　　文章编号:1001-1528(2010)04-0600-04

# Determination of peoniflorin, ferulic acid and icariin in Bushen Huoxue Granule

KONG Ming, ZHU Lin-ying, WANG Pei-juan, PENG Yun-ru
(*Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China*)

**KEY WORDS:** Bushen Huoxue Granule; peoniflorin; ferulic acid; icariin; HPLC

**ABSTRACT: AIM:** To establish the method of determining peoniflorin, ferulic acid and icariin in Bushen Huoxue Granule (*Herba Epimedii*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Paeoniae Alba*, etc.). **METHODS:** HPLC-DAD was used to determine peoniflorin, ferulic acid and icariin. The samples were separated on Alltima $C_{18}$ (5 μm, 250 mm ×4.6 mm) with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution). **RESULTS:** The average recoveries of peoniflorin, ferulic acid and icariin were 96.7%, 97.5%, 99.6% and RSD were 1.37%, 3.13%, 0.96%. respectively. The peoniflorin, ferulic acid and icariin samples showed a good relationship in the ranges of 0.318 – 3.970 μg, 0.096 – 1.200 μg, 0.414 – 5.175 μg in the chosen HPLC condition. **CONCLUSION:** The method is simple, accurate and reproducible and can be used for the quality control of granule.

补肾活血汤是江苏省中西医结合医院的传统经验方,它包括淫羊藿,当归,白芍等十味中药,对不孕不育、月经失调、更年期综合症等与卵巢储备功能减退相关等疾病具有较好的临床疗效。现我们利用现代制剂工艺将其制成颗粒,为申报中药新药做好准备。本实验采用 HPLC 法对该颗粒中的阿魏酸,芍药苷,淫羊藿苷进行定量分析,建立了简便易行的质量控制标准[1]。

## 1　仪器、试药

1.1　**仪器**　Waters 高效液相色谱仪(Alliance 2695 四元泵、自动进样系统、柱温箱、Empower 色谱工作站、Waters2996 二极管阵列检测器);Millipore Milli-Q 超纯水制备仪(美国);METTLER 万分之一及百万分之一电子天平(瑞士);KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2　**试药**　补肾活血颗粒(江苏省中西医结合医院),芍药苷(中国药品生物制品检定所 0736-200414),淫羊藿苷(中国药品生物制品检定所 0737-9709),阿魏酸(中国药品生物制品检定所 0773-9809),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2　方法与试验[5-8]

2.1　**HPLC 色谱条件**　色谱柱:Alltima $C_{18}$ (5 μm, 250 mm ×4.6 mm)柱温:35 ℃;流动相: 甲醇-0.1% 磷酸,梯度洗脱,梯度见表 1;流速:1 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:芍药苷 230 nm,阿魏酸 320 nm,淫羊藿苷 270 nm,在此条件下,供试品溶液中芍药苷,淫羊藿苷,阿魏酸与相邻成分基本达到基线分离,且阴性溶液无干扰,色谱见图 1 ~3。

表 1　HPLC 梯度洗脱
Table 1　Gradient elution

| 时间/min | 1% 磷酸/% | 甲醇/% |
|---|---|---|
| 0 | 80 | 20 |
| 50 | 30 | 70 |
| 51 | 0 | 100 |
| 55 | 0 | 100 |
| 56 | 80 | 20 |
| 70 | 80 | 20 |

2.2　**对照品溶液的制备**　精密称取芍药苷,阿魏酸,淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含芍药苷 0.159 mg,阿魏酸 0.048 mg,淫羊藿苷 0.202 mg 的对照品溶液。

2.3　**供试品溶液的制备**　称取本品颗粒约 2 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,密塞,超声 30 min,高速离心 20 min(3 600 r/min),精密量取上清液 10 mL,浓缩,甲醇定容至 5 mL,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤。

2.4　**阴性对照品溶液的制备**　称取不含芍药,淫羊藿,当归的阴性样品,按照供试品的制备方法操作,即得。

2.5　**线性关系考察**　精密吸取对照品溶液 1、2、5、10、15、20、25 μL,注入高效液相色谱仪,在上述色谱条件下进行分析,记录色谱峰面积。以进样量作为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归计算,得回归方程:芍药苷:$Y = 1.33 \times 10^6 X - 3.02 \times 10^2$ $R = 0.999\ 7$。阿魏酸:$Y = 4.33 \times 10^6 X + 2.35 \times 10^4$ $R =$



© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

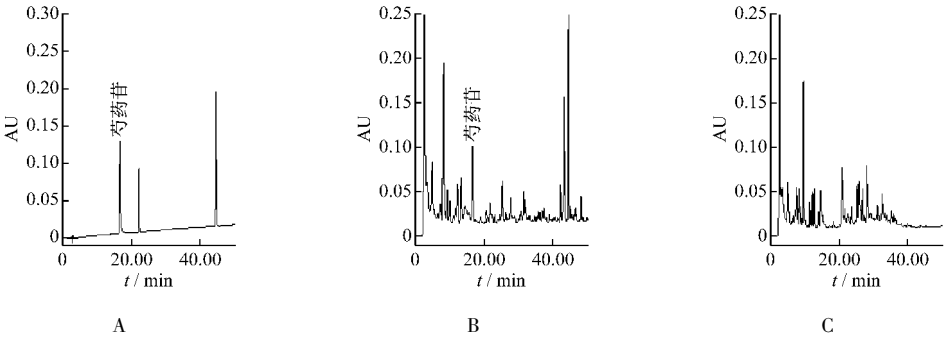


**图 1　芍药苷高效液相色谱图**

A. 芍药苷对照品　B. 230 nm 样品溶液　C. 230 nm 阴性样品

**Fig. 1　HPLC chromatograms of peoniflorin**

A. reference substance of peoniflorin　B. sample at 230 nm　C. negative sample at 230 nm

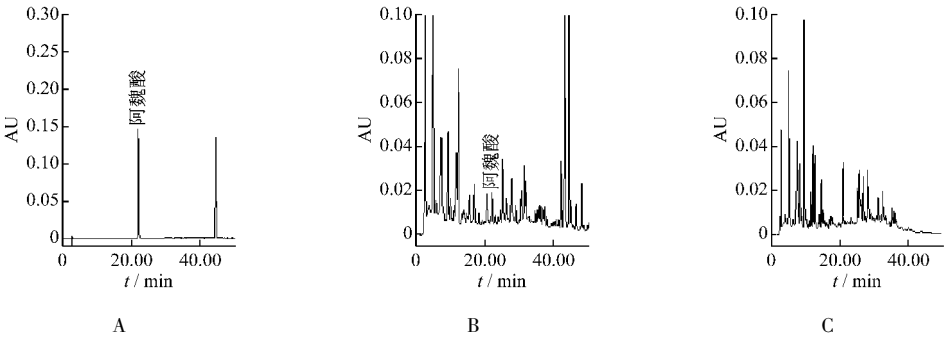


**图 2　阿魏酸高效液相色谱图**

A. 阿魏酸对照品　B. 320 nm 样品溶液　C. 320 nm 阴性样品

**Fig. 2　HPLC chromatograms of ferulic acid**

A. reference substance of ferulic acid　B. sample at 320 nm　C. negative sample at 320 nm

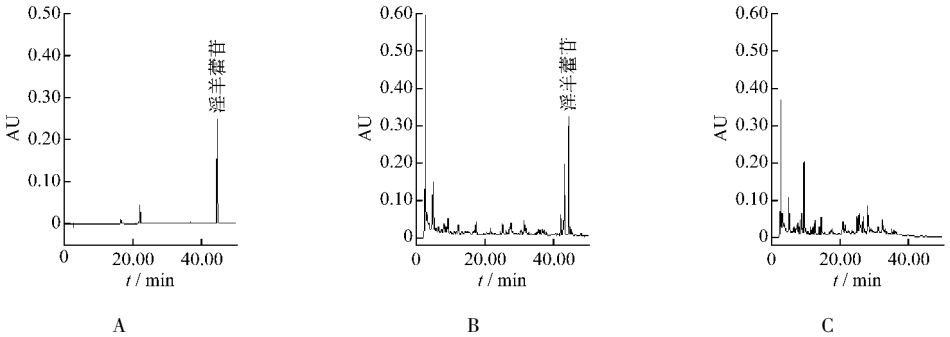


**图 3　淫羊藿苷高效液相色谱图**

A. 淫羊藿苷对照品　B. 270 nm 样品溶液　C. 270 nm 阴性样品

**Fig. 3　HPLC chromatograms of icariin**

A. reference substance of icariin　B. sample at 270 nm　C. negative sample at 270 nm

0.999 9。淫羊藿苷：$Y = 1.67 \times 10^6 X + 7.86 \times 10^4$　$R = 0.999\ 9$。结果表明：芍药苷在 0.159 ~ 3.970 μg，阿魏酸在 0.048 ~ 1.200 μg，淫羊藿苷在 0.207 ~ 5.175 μg范围内有良好的线性关系。

2.6　精密度实验　按选定的 HPLC 条件下对同一对照品溶液连续进样 6 次，以考察仪器的精密度，结果表明，芍药苷对照品的 RSD 为 1.3%，阿魏酸和淫羊藿苷的 RSD 均为 1.0%。

2.7　稳定性实验　精密吸取供试品溶液于 0、2、4、6、8 h 分别进样 20 μL，测得峰面积的 RSD 为芍药苷 0.8%，阿魏酸 1.8%，淫羊藿苷 0.7%，试验结果表明，样品供试液在 8 h 内稳定性良好。

2.8　重复性实验　取同一批样品，分别按拟定的含量测定方法测定 6 次，测得峰面积并计算含量，结果



© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

芍药苷含量为 0.856 mg/g，RSD 为 2.86%；阿魏酸含量为 0.034 mg/g，RSD 为 2.95%，淫羊藿苷含量为 1.621 mg/g，RSD 为 2.60%，重现性良好。

2.9　加样回收率实验[9]　取已知含量（芍药苷 0.856 mg/g，阿魏酸 0.034 mg/g，淫羊藿苷 1.621 mg/g）的制剂约 1 g，共 6 份，精密称定，分为 3 组每组分别加入浓度为0.765 0 mg/mL 的芍药苷，0.030 6 mg/mL 的阿魏酸，1.934 0 mg/mL 的淫羊藿苷 0.8、1.0、1.2 mL，按照供试品溶液的制备方法及色谱条件进行测定，结果芍药苷，阿魏酸，淫羊藿苷的加样回收率的 RSD 分别为 1.37%，3.13%，0.96% 见表 2～4。

表 2　芍药苷的加样回收率实验

Table 2　The results of recovery test of peoniflorin

| 称样量/g | 含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 加样回收率/% | 平均加样回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.003 0 | 0.859 | 0.612 0 | 1.459 | 98.1 | 96.7 | 1.37 |
| 1.001 6 | 0.858 | 0.612 0 | 1.439 | 95.0 | | |
| 1.042 2 | 0.893 | 0.765 0 | 1.626 | 96.0 | | |
| 0.972 9 | 0.833 | 0.765 0 | 1.580 | 97.7 | | |
| 1.001 2 | 0.857 | 0.918 0 | 1.734 | 95.5 | | |
| 0.958 4 | 0.820 | 0.918 0 | 1.718 | 97.7 | | |

表 3　阿魏酸的加样回收率实验

Table 3　The results of recovery test of ferulic acid

| 称样量/g | 含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 加样回收率/% | 平均加样回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.925 9 | 0.031 5 | 0.024 5 | 0.055 0 | 96.0 | 97.5 | 3.13 |
| 1.081 6 | 0.036 8 | 0.024 5 | 0.061 3 | 100.0 | | |
| 1.062 2 | 0.036 1 | 0.030 6 | 0.066 3 | 98.5 | | |
| 0.972 9 | 0.033 1 | 0.030 6 | 0.062 5 | 96.1 | | |
| 1.001 2 | 0.034 0 | 0.036 7 | 0.071 3 | 101.3 | | |
| 0.908 4 | 0.030 9 | 0.036 7 | 0.065 0 | 93.0 | | |

表 4　淫羊藿苷的加样回收率实验

Table 4　The results of recovery test of icariin

| 称样量/g | 含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 加样回收率/% | 平均加样回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.040 3 | 1.685 | 1.547 2 | 3.218 | 99.0 | 99.61 | 0.96 |
| 0.990 6 | 1.605 | 1.547 2 | 3.131 | 98.7 | | |
| 1.022 2 | 1.656 | 1.934 0 | 3.581 | 99.5 | | |
| 0.972 9 | 1.576 | 1.934 0 | 3.534 | 101.2 | | |
| 1.011 2 | 1.638 | 2.320 8 | 3.964 | 100.2 | | |
| 0.958 4 | 1.553 | 2.320 8 | 3.850 | 99.0 | | |

2.10　样品含量测定　3 批补肾活血颗粒，按 2.3 项下制成供试品溶液，HPLC 测定，结果见表 5。

表 5　3 批含量测定结果（$n=3$）

Table 5　Determination results of three batches of samples

| 编号 | 芍药苷/(mg/g) | 阿魏酸/(mg/g) | 淫羊藿苷/(mg/g) |
|---|---|---|---|
| 080227 | 0.856 | 0.034 | 1.621 |
| 080312 | 0.827 | 0.032 | 1.544 |
| 080316 | 0.834 | 0.031 | 1.612 |

## 3　讨论

3.1　考虑到阿魏酸不太稳定，供试品制备及对照品配制均采用棕色量瓶。

3.2　在 HPLC-UV 含量测定选择检测波长时，若只选择一种波长，在测定阿魏酸，芍药苷和淫羊藿苷时均不能取得满意的结果，选用不同的的检测波长：芍药苷在 230 nm 时吸收值最大，阿魏酸在 320 nm 时吸收最大，而淫羊藿苷在 270 nm 时最大吸收，因此，同时选用这 3 种波长，同时兼顾 3 种成分，使其均能达到最大吸收。

3.3　不同提取方法的选择：由于补肾活血颗粒为一种中药复方制剂，成分复杂，对含量测定中供试品溶液制备方法进行了比较，比较了超声，静置，回流。结果表明，采用超声和回流方法提取含量相近，故选择较简便的超声方法作为供试品溶液的制备方法[10]。

参考文献：

[1]　梁永平，农小棉，韦敏法. 胃达康颗粒质量标准研究[J]. 中国现代中药，2007，9(1)：23-26.

[2]　中国药典[S]. 一部. 2005：68-69，89，229.

[3]　曾惠芳，黄鸣清，陈　萍，等. 调经止血颗粒的质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理，2005，16(5)：356-359.

[4]　张　浚，邓朝晖，徐月红. 加味调经种玉丸的薄层鉴别及当归定量[J]. 中药材，2007，30(10)：1322-1324.

[5]　张国霞，李　平，韩　彪. 3 种不同沉淀剂对养血扶正颗粒中阿魏酸与淫羊藿苷含量的影响[J]. 中国生化药物杂志，2007，28(1)：46-48.

[6]　邵玉玲，强百杰，刘专专，等. HPLC 法测定浓缩当归丸中阿魏酸的含量[J]. 分析测试技术与仪器，2007，13(3)：211-214.

[7]　黎　轶. HPLC 法测定固经丸中芍药苷的含量[J]. 河南中医学院学报，2007，22(6)：31-33.

[8]　高红梅，鞠凤霞，白　冰. HPLC 测定回春颗粒中淫羊藿苷含量[J]. 中成药，2007，29(5)：附 14-15.

[9]　蒋　林，黎　明，李　娜，等. 止血定痛片质量标准研究[J]. 中成药，2007，29(12)：1860-1862.

[10]　杨　翰，王海宁，刘丰丰. HPLC 法测定舒心宁片中芍药苷的含量[J]. 中国药房，2007，18(24)：1885-1886.



© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net