

# 高效液相色谱法同时测定桂枝肌瘤丸中3种成分含量

曹薇薇\*, 强润东, 张春雨, 薄会娜, 王志平, 石可歆, 姜颖

(唐山市食品药品综合检验检测中心, 唐山 063000)

**摘要:** **目的** 建立同时测定桂枝肌瘤丸中芍药苷、桂皮醛及丹皮酚3种成分含量的方法。**方法** 采用反相高效液相色谱 (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) 波长切换法, 色谱柱 ES Epic C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25°C, 检测波长为 230 nm (0~25 min)、290 nm (25~41 min)、274 nm (41~51 min)。**结果** 芍药苷、桂皮醛、丹皮酚线性范围分别为 3.6169~90.4232 μg/mL ( $r=0.9993$ )、1.8388~45.9695 μg/mL ( $r=0.9999$ )、2.0240~50.5994 μg/mL ( $r=0.9999$ )。平均加样回收率分别为 95.4% (RSD=1.2%)、93.0% (RSD=0.7%) 和 94.2% (RSD=1.2%)。**结论** 本方法准确、灵敏, 专属性强, 适用于桂枝肌瘤丸的质量控制。

**关键词:** 桂枝肌瘤丸; RP-HPLC 波长切换法; 含量测定; 芍药苷; 桂皮醛; 丹皮酚

## Simultaneous determination of three components in Guizhi Jiliu Pills by high performance liquid chromatography

CAO Wei-Wei\*, QIANG Run-Dong, ZHANG Chun-Yu, BO Hui-Na, WANG Zhi-Ping, SHI Ke-Xin, JIANG Ying

(Tangshan Food and Drug Comprehensive Inspection and Testing Center, Tangshan 063000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determining the contents of paeoniflorin, cinnamaldehyde and paeonol in Guizhi Jiliu Pills. **Methods** The RP-HPLC wavelength switching method was used, the analysis was achieved on an ES Epic C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, the mobile phase was acetonitrile-0.1% aqueous solution of phosphoric acid gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25°C and the detection wavelength were 230 nm (0~25 min), 290 nm (25~41 min) and 274 nm (41~51 min). **Results** The linear ranges of paeoniflorin, cinnamaldehyde and paeonol were 3.6169~90.4232 μg/mL ( $r=0.9993$ ), 1.8388~45.9695 μg/mL ( $r=0.9999$ ), 2.0240~50.5994 μg/mL ( $r=0.9999$ ). The average sample recovery rates were 95.4% (RSD=1.2%), 93.0% (RSD=0.7%) and 94.2% (RSD=1.2%) respectively. **Conclusion** This method is accurate, sensitive, and has strong specificity. It can be used for the quality control of Guizhi Jiliu Pills.

**KEY WORDS:** Guizhi Jiliu Pills; RP-HPLC wavelength switching method; content determination; paeoniflorin; cinnamaldehyde; paeonol

## 0 引言

桂枝肌瘤丸是河北省玉田县中医医院制剂, 由桂枝、桃仁、赤芍、牡丹皮、丹参、茯苓6味药材组成, 具有活血化瘀, 消

散瘀块的作用。临床主要用于瘀阻胞宫所致漏下不止、血色紫黑灰暗、腹痛拒按; 子宫肌瘤、痛经、盆腔炎等症。现行医疗机构制剂质量标准<sup>[1]</sup>仅有鉴别及检查项, 缺少含量测定项, 且目前无桂枝肌瘤丸质量标准提升相关文献报道。高效液相色谱

基金项目: 河北省药品监督管理局科技计划资助 (2023ZC1023)

Fund: S&T Program of Hebei Medical Products Administration (2023ZC1023)

\*通信作者: 曹薇薇, 高级工程师, 研究方向为药物分析检验。E-mail: 1006436029@qq.com

\*Corresponding author: CAO Wei-Wei, Senior Engineer, 60 Jianshe North Road, Lubei District, Tangshan 063000, China. E-mail: 1006436029@qq.com

仪是目前药品分析实验室常用检测仪器,利用高压输液泵将流动相泵入色谱柱,对复杂供试品进行分离分析。目前在中药制剂质量标准提升相关文献中<sup>[2-6]</sup>,建立的含量测定方法多为一种高效液相色谱法同时测定多种成分。本文对桂枝肌瘤丸中主要药效成分芍药苷、桂皮醛、丹皮酚展开研究,建立了同时测定三种成分含量的高效液相色谱法,此方法操作快速、准确,专属性强,可用于桂枝肌瘤丸的定量检查,为医院制剂室及药品监管部门全面控制制剂质量,保证医院制剂的质量达到临床用药安全、有效提供有利的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津);8453 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦);BSA124S-CW 电子天平、BP211D 电子天平(德国赛多利斯);KQ3200E 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

芍药苷对照品(含量:94.6%,批号:110736-202145)、桂皮醛对照品(含量:99.5%,批号:110710-202022)、丹皮酚对照品(含量:99.8%,批号:110708-201908),均购自中国食品药品检定研究院;桂枝肌瘤丸样品(规格:每丸重9g,河北省玉田县中医医院,批号:20220302、20220801、20221019);甲醇(Fisher Chemical)、乙腈(Sigma-Aldrich),均为色谱纯,磷酸(天津市恒兴化学试剂)为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

### 1.3 溶液制备

#### 1.3.1 供试品溶液制备

取桂枝肌瘤丸供试品适量,剪碎,混匀,取约0.66~0.8g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25mL,密塞,称定重量,超声处理(功率250w,频率50kHz)30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,再用微孔滤膜(0.45 $\mu$ m)滤过,作为供试品溶液。

#### 1.3.2 混合对照品溶液制备

精密称取芍药苷对照品约18mg,桂皮醛对照品约18mg,丹皮酚对照品约10mg,分别置于50、100、50mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液;再精密量取三种对照品储备液各2mL,置于同一10mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 $\mu$ m)滤过,作为混合对照品溶液。

#### 1.3.3 阴性样品溶液制备

因桂皮醛为桂枝主要成分,芍药苷、丹皮酚为赤芍、牡丹皮共有成分<sup>[7-9]</sup>,故按处方比例制成缺桂枝阴性样品,缺赤芍、牡丹皮阴性样品,其余操作同1.3.1,作为阴性对照溶液。

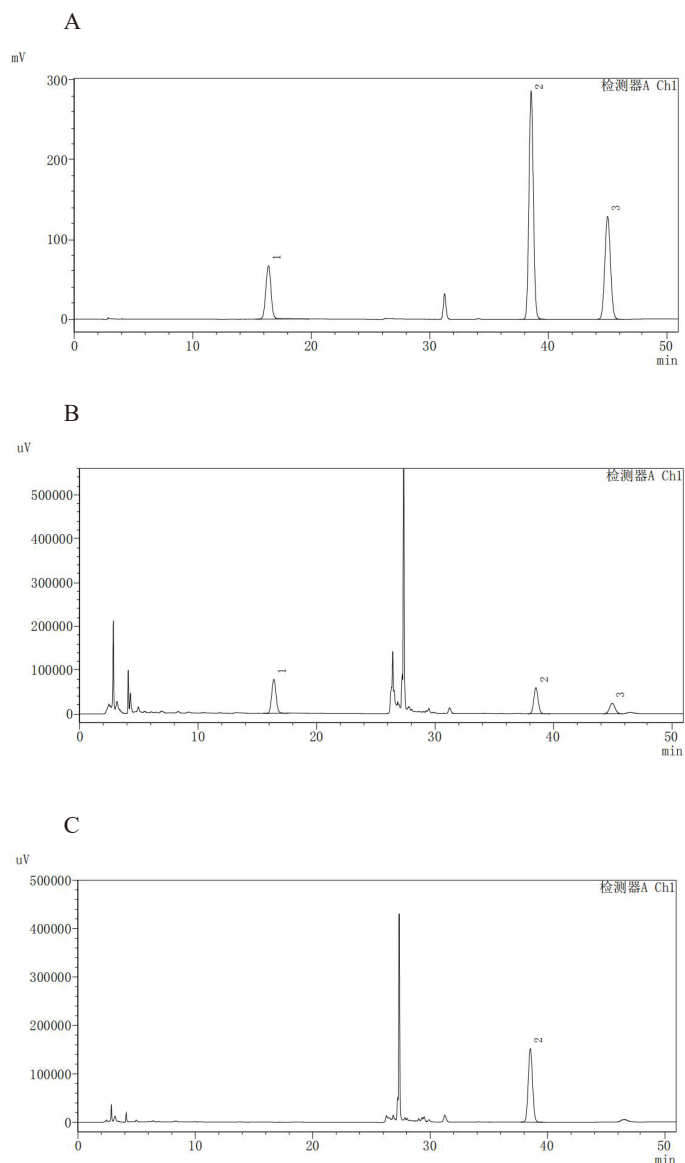
### 1.4 色谱条件及测定方法

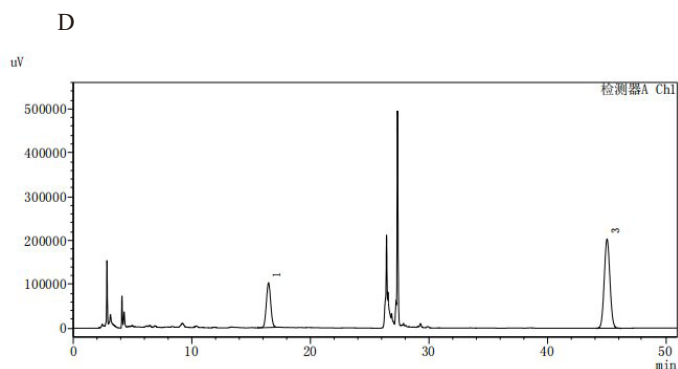
色谱柱:ES Epic C<sub>18</sub>(4.6mm $\times$ 250mm,5 $\mu$ m),以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,0~19min,15%A;19~23min,45%A;23~40min,35%A;40~51min,15%A,流速为1.0mL/min,柱温为25 $^{\circ}$ C,检测波长为230nm(0~25min)、290nm(25~41min)、274nm(41~51min),进样量为20 $\mu$ L,按外标法以峰面积分别计算芍药苷、桂皮醛及丹皮酚三种成分含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 专属性试验

取1.3项下的溶液,照1.4项下方法进行测定,结果表明,供试品溶液中芍药苷、桂皮醛、丹皮酚保留时间与混合对照品溶液一致,阴性对照溶液对各成分测定无干扰,见图1。





A: 混合对照品; B: 供试品; C: 缺赤芍、牡丹皮阴性样品; D: 缺桂枝阴性样品; 1: 芍药苷; 2: 桂皮醛; 3: 丹皮酚

图 1 桂枝肌瘤丸 HPLC 图

Fig.1 The HPLC graphs of Guizhi Jiliu Pills

## 2.2 线性关系考察

取 1.3.2 项下的三种对照品储备液, 精密量取各 0.1 mL, 置于同一 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 备用。然后精密量各取 0.5、1、1.5、2、2.5 mL, 同法操作。取制备好的各溶液, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 分别取 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪中, 依法测定, 以对照品进样浓度 (C) 为横坐标, 峰面

积值(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得芍药苷的线性回归方程为  $A=2.7848 \times 10^4 C+1.2058 \times 10^4$ ,  $r=0.9993$ ; 桂皮醛的线性回归方程为  $A=1.99715 \times 10^5 C+1.1646 \times 10^4$ ,  $r=0.9999$ ; 丹皮酚的线性回归方程为  $A=1.05861 \times 10^5 C+8.0561 \times 10^3$ ,  $r=0.9999$ 。结果表明, 芍药苷、桂皮醛、丹皮酚分别在 3.6169~90.4232  $\mu\text{g/mL}$ , 1.8388~45.9695  $\mu\text{g/mL}$ , 2.0240~50.5994  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 与峰面积有良好的线性关系。

## 2.3 精密度试验

取 1.3.2 项下的混合对照品溶液, 依法重复测定 6 次, 芍药苷峰面积 RSD 为 0.3%, 桂皮醛峰面积 RSD 为 0.8%, 丹皮酚峰面积 RSD 为 0.5%, 精密度良好。

## 2.4 加样回收率试验

取桂枝肌瘤丸供试品约 0.4 g(批号: 20220302, 已知芍药苷、桂皮醛、丹皮酚含量分别为 2.220 mg/g、0.233 mg/g、0.226 mg/g) 共 6 份, 分别置于具塞锥形瓶中, 精密加入芍药苷对照品溶液 (0.4454 mg/mL) 2.0 mL、桂皮醛对照品溶液 (0.0993 mg/mL) 1.0 mL、丹皮酚对照品溶液 (0.0999 mg/mL) 1.0 mL, 挥干溶剂, 照 1.3.1 项下方法制备溶液, 并依 1.4 项下方法测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果( $n=6$ )  
Table 1 Recovery rate test results ( $n=6$ )

待测成分	供试品取样量(m/g)	供试品中含有量(m/mg)	对照品加入量(m/mg)	测定结果(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
芍药苷	0.4025	0.8936	0.8908	1.7362	94.6	95.4	1.2
	0.4022	0.8929	0.8908	1.7446	95.6		
	0.4029	0.8944	0.8908	1.7620	97.4		
	0.4032	0.8951	0.8908	1.7430	95.2		
	0.4019	0.8922	0.8908	1.7446	95.7		
	0.4030	0.8947	0.8908	1.7311	93.9		
桂皮醛	0.4025	0.0938	0.0993	0.1853	92.1	93.0	0.7
	0.4022	0.0937	0.0993	0.1865	93.5		
	0.4029	0.0939	0.0993	0.1861	92.9		
	0.4032	0.0939	0.0993	0.1873	94.1		
	0.4019	0.0936	0.0993	0.1856	92.6		
	0.4030	0.0939	0.0993	0.1863	93.1		
丹皮酚	0.4025	0.0910	0.0999	0.1860	95.1	94.2	1.2
	0.4022	0.0909	0.0999	0.1842	93.4		
	0.4029	0.0911	0.0999	0.1847	93.7		
	0.4032	0.0911	0.0999	0.1869	95.9		
	0.4019	0.0908	0.0999	0.1834	92.7		
	0.4030	0.0911	0.0999	0.1853	94.3		

## 2.5 稳定性试验

精密吸取 1.3.1 项下桂枝肌瘤丸供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 分别于 0、4、8、12、24 h, 注入高效液相色谱仪测定峰面积, 结果表明, 芍药苷 RSD 为 1.0%, 桂皮醛 RSD 为 1.2%, 丹皮酚 RSD 为 0.7%, 供试品在 24 h 内稳定性良好。

## 2.6 重复性试验

取桂枝肌瘤丸(批号: 20220302)共 6 份, 约 0.8 g, 精密称定, 照 1.3.1、1.4 项下方法制备及测定, 计算供试品中三种成分含量。芍药苷平均含量为 2.220 mg/g, RSD 为 0.6%; 桂皮醛平均含量为 0.233 mg/g, RSD 为 1.1%; 丹皮酚平均含量为 0.226 mg/g,

RSD 为 0.9%。该方法重复性良好。

## 2.7 样品测定

取桂枝肌瘤丸 3 批, 照 1.3.1 项下方法制备溶液, 照 1.4 项下方法测定三种成分含量, 结果见表 2。

表 2 含量测定结果  
Table 2 Content determination results

样品批号	芍药苷含量 (mg/g)	桂皮醛含量 (mg/g)	丹皮酚含量 (mg/g)
20220302	2.220	0.233	0.226
20220801	2.241	0.232	0.230
20221019	2.310	0.238	0.235

## 3 讨论与结论

### 3.1 流动相的确定

本文通过查阅《中国药典》<sup>[10]</sup> 桂枝、赤芍、牡丹皮、桂枝茯苓丸检测方法及其他参考文献<sup>[11-15]</sup>, 试验了甲醇-水及乙腈-0.1% 磷酸水溶液系统, 三种待测成分在乙腈-0.1% 磷酸水溶液系统峰形良好, 且柱压适中, 另通过梯度洗脱调整乙腈与 0.1% 磷酸水溶液比例, 使三个主成分保留时间适中, 且与相邻杂质分离度均大于 1.5。

### 3.2 波长的选择

用流动相初始比例配制三种对照品溶液, 分别置紫外-可见分光光度计中, 在 190~600 nm 波长范围内扫描, 芍药苷、桂皮醛、丹皮酚分别在 230、290、274 nm 的波长处有最大吸收, 本文选用波长切换方法使三种成分均在最大吸收波长处检测, 达到较高灵敏度。

### 3.3 柱温选择

通过试验室温、25℃、30℃ 三种柱温, 发现在 25℃ 条件下, 色谱峰拖尾情况得到改善, 且分离度更佳。

### 3.4 提取条件选择

本文考察了甲醇超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 供试品 15、30、45 min 三种条件, 结合三种成分特性及提取效率, 确定 30 min 为最佳提取条件。

### 3.5 结论

本方法实现复杂样品中多种待检成分同时检测, 灵敏度高, 减少了操作步骤及试剂的消耗, 节省时间, 节约检测成本, 更加具有实用性。为基层医疗机构制剂室、基层药品监管部门全面控制制剂质量提供了科学依据, 并为其他医院制剂含量测定方法建立及质量标准提升工作提供参考。

## 参考文献

- [1] JZBZ 20091050-2012 河北省食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准[S]. 石家庄: 河北省食品药品监督管理局, 2012: 1.
- [2] 张越, 陈健, 李洋. 经典名方温经汤标准汤剂HPLC指纹图谱建立及 9 种成分含量测定[J]. 中草药, 2020, 51(18): 4664-4672.
- [3] 李怀伟, 张朋, 全桂平. HPLC同时测定桂附地黄丸(浓缩丸)中 4 种活性成分的含量[J]. 山东化工, 2019, 48(18): 71-73.
- [4] 鲍慧玮, 徐阳, 王楚盈, 等. HPLC法同时测定哮喘宁颗粒中 9 种成分的含量[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2856-2859.
- [5] 邵长森, 张国青, 韩真真, 等. HPLC法同时测定温经汤中 10 种活性成分的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2640-2643.
- [6] 王晓蕾, 刘永利, 李香荷, 等. 高效液相色谱法同时测定济生肾气片中 4 种成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(18): 1589-1593.
- [7] 李晓燕, 张侠, 张紫微, 等. HPLC双波长切换法同时测定不同产地牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 药品评价, 2022, 19(15): 904-907.
- [8] 曲别军长, 俸明康, 张少山, 等. 基于多指标成分评价川西高原野生川赤芍的质量[J]. 中草药, 2022, 53(18): 5842-5850.
- [9] 吴纯伟, 梁生旺, 王淑美. 桂枝、牡丹皮效应组分中肉桂酸和芍药苷的含量测定[J]. 中医学报, 2016, 31(01): 79-82.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1439.
- [11] 樊辉, 田原, 魏新智, 等. 高效液相色谱法测定桂枝茯苓丸制剂及含药血清中芍药苷、肉桂酸、丹皮酚[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(12): 12-14.
- [12] 于艳, 张立德, 田原, 等. HPLC波长切换法同时测定桂枝茯苓丸中 4 种成分[J]. 中成药, 2013, 35(11): 2426-2429.
- [13] 吴修红, 方衡, 朴成玉, 等. 桂枝茯苓丸的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 分析科学学报, 2014, 30(01): 100-102.
- [14] 王珩, 钟清泽, 殷敏, 等. 高效液相色谱法同时测定桂枝茯苓丸中 5 个成分含量[J]. 中药材, 2022, 45(04): 927-930.
- [15] 李智慧, 吴素香, 石森林, 等. HPLC测定不同厂家桂枝茯苓丸中丹皮酚及芍药苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(09): 121-123.

## 作者简介



曹薇薇, 高级工程师, 研究方向为药物分析检验。