

# HPLC 测定复方小活络丸中芍药苷含量和乌头碱的限量

尤立华\*

(北京市东城区药品检验所, 北京 100027)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC 测定复方小活络丸中芍药苷含量的方法以及乌头碱的限量检查。方法: 采用 HPLC, 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 芍药苷检测以乙腈-0.1% 磷酸溶液(14:86)为流动相, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 230 nm。乌头碱检测乙腈-四氢呋喃(25:15)为流动相 A, 以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL)为流动相 B, 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 235 nm。结果: 芍药苷在 0.035 5~0.709 6 μg 线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ), 平均加样回收率 101.9% (RSD 1.86%,  $n=6$ ); 乌头碱在 0.066 0~0.495 0 μg 线性关系良好( $r=0.999\ 8$ ), 平均加样回收率 102.0% (RSD 1.75%,  $n=6$ )。结论: 方法简便, 准确, 重复性好, 可用于复方小活络丸芍药苷的含量测定和乌头碱的限量检查。

**[关键词]** HPLC; 芍药苷; 乌头碱; 复方小活络丸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)09-0158-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013090158

## Determination of Paeoniflorin and Limit Examination of Aconitine in Compound Xiaohuoluo Pills By HPLC

YOU Li-hua\*

(Dongcheng District Institute for Drug Control, Beijing 100027, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a HPLC method for determination of paeoniflorin and limit examination of aconitine in compound Xiaohuoluo pills. **Method:** For paeoniflorin, C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used at 30 °C; with the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphate solution (14:86). The detection wavelength was 230 nm and the flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. For aconitine, C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used at 35 °C; with the mobile phase was acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15) and 0.1 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate solution by gradient elution. The detection wavelength was 235 nm and the flow rate was set at 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** The linear range of Paeoniflorin was 0.035 5-0.709 6 μg ( $r=0.999\ 9$ ). The average recoveries was 101.9% and RSD was 1.86% ( $n=6$ ). The linear range of aconitine was 0.066 0-0.495 0 μg ( $r=0.999\ 8$ ). The average recoveries was 102.0% and RSD was 1.75% ( $n=6$ ). **Conclusion:** The method is simple, accurate, stable and can be used for determination of paeoniflorin and limit examination of aconitine in compound Xiaohuoluo pills.

**[Key words]** HPLC; paeoniflorin; aconitine; compound Xiaohuoluo pills

复方小活络丸是由《太平惠民和剂局方》中的活络丹加味而成, 为大蜜丸<sup>[1]</sup>, 为便于服用, 增加了水蜜丸的规格。复方小活络丸由制川乌、制草乌、当归、川芎、白芍、地龙、乳香、没药、香附、胆南星组成, 具有舒筋活络、散风止痛的作用, 用于风寒湿邪引起的风寒湿痹, 肢节疼痛, 麻木拘挛, 半身不遂, 行步艰

难<sup>[1]</sup>。处方中白芍以原药材投料, 含有芍药苷<sup>[2]</sup>, 为有效地控制该品种的质量, 本文采用液相色谱法测定芍药苷; 方中含有制川乌和制草乌, 它的痕量成分是乌头碱, 乌头碱的毒性很强<sup>[3-4]</sup>, 为保证用药安全, 对复方小活络丸中痕量毒性成分乌头碱进行质量控制, 本文建立了乌头碱的限量检查方法<sup>[5-7]</sup>。

**[收稿日期]** 20121113(008)

**[通讯作者]** \* 尤立华, 主管药师, 从事药品检验及其质量分析研究, Tel:010-64635612, E-mail:blue56789@sohu.com

## 1 仪器与试药

岛津 LC2010 液相色谱仪,芍药苷对照品(批号 110736-201035,中国药品生物制品检定所);乌头碱对照品(批号 110720-200410,由中国药品生物制品检定所);复方小活络丸(批号 2030030,北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂);试剂为分析纯,乙腈为色谱纯。

## 2 芍药苷含量测定方法

**2.1 色谱条件** WAT045905 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(14:86),柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 230 nm。进样量 10 μL。

### 2.2 溶液配制

**2.2.1 对照品溶液制备** 取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 35.48 μg 的溶液。

**2.2.2 供试品溶液制备** 取本品装量项下的内容物,研细,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 1 000 W,频率 50 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**2.2.3 空白对照溶液制备** 按照处方比例及制法要求,取本品中缺白芍的其余药材,按 2.2.2 方法制备空白对照溶液,测定。

**2.3 系统适应性试验** 在上述色谱条件,注入对照品溶液,供试品溶液,空白对照溶液,记录色谱图(图 1),理论板数按芍药苷计算应不低于 3 000。空白对照溶液处未见干扰。

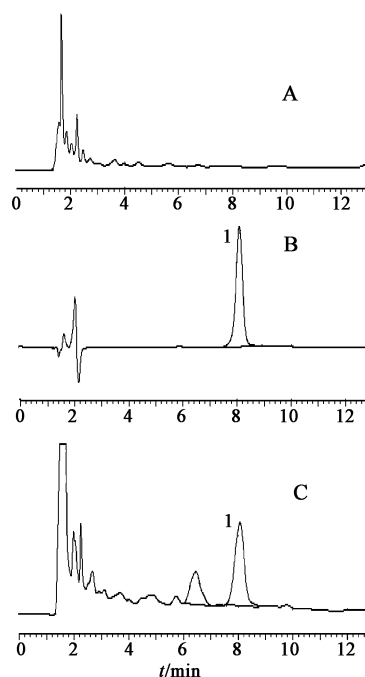
**2.4 线性试验** 精密吸取对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,以对照品的浓度为自变量,峰面积为因变量,得芍药苷回归方程  $Y = 1.33 \times 10^6 X + 0.006$  ( $r = 0.999 9$ ),芍药苷在 0.035 5 ~ 0.709 6 μg 线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 取同一批样品溶液,按上述色谱条件,连续测定 6 次,依法测定,芍药苷的峰面积平均值 RSD 0.47%。

**2.6 稳定性试验** 取同一批样品溶液,放置 0, 5, 12, 17, 22, 27 h,依法测定,芍药苷峰面积平均值 RSD 0.94%。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批样品 6 份,按 2.2.2 方法制备样品,测定其芍药苷的含量,结果芍药苷质量分数 0.805 9 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 1.10%。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取同一批样品 0.5 g,共 6 份,分别精密加入稀释一倍的对照品溶



A. 空白;B. 对照品;C. 样品;1. 芍药苷

图 1 复方小活络丸 HPLC

液 25 mL,按 2.2.2 项下及 2.1 色谱条件,测定其芍药苷的含量,并计算回收率,见表 1。

表 1 芍药苷加样回收率试验

样品量 /mg	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
0.515 1	0.855 7	0.440 6	102.94	101.90	1.86
0.501 1	0.827 7	0.423 8	99.02		
0.512 7	0.845 6	0.432 5	101.05		
0.511 6	0.845 2	0.432 9	101.14		
0.521 3	0.867 1	0.447 0	104.44		
0.520 7	0.859 7	0.440 1	102.83		

注:加入量均为 0.428 0 mg。

## 3 乌头碱限量检查方法

**3.1 色谱条件** WAT045905 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相以乙腈-四氢呋喃(25:15)为流动相 A,以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL)为流动相 B,按下列程序进行梯度洗脱;0 min, 15% A; 48 min, 26% A; 48.1 min, 35% A; 58 min, 35%。柱温 35 °C,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 235 nm。进样量 10 μL。

### 3.2 溶液配制

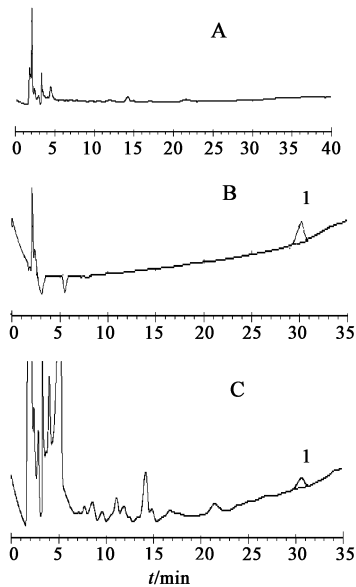
**3.2.1 对照品溶液制备** 取乌头碱对照品适量,精密称定,加异丙醇-三氯甲烷(1:1)混合溶液制成每 1 mL 含 33.3 μg 的溶液,即得。

**3.2.2 供试品溶液制备** 取本品装量项下的内容物,研细,取约 4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨试液 3 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶

液 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz, 水温在 25 ℃ 以下)30 min, 放冷, 再称定质量, 用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 挥干, 用异丙醇-三氯甲烷(1:1)混合溶液溶解, 至 2 mL 量瓶中, 再用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。

**3.2.3 空白对照溶液制备** 按照处方比例及制法要求, 取本品中缺制川乌、制草乌的其余药材, 按 **3.2.2** 方法制备空白对照溶液, 测定。

**3.3 系统适应性试验** 在上述色谱条件, 注入对照品溶液, 供试品溶液, 空白对照溶液, 记录色谱图(图 2), 理论板数按乌头碱计算应不低于 5 000。空白对照溶液处未见干扰。



A. 空白; B. 对照品; C. 样品; 1. 乌头碱

图 2 复方小活络丸 HPLC

**3.4 线性试验** 精密吸取对照品溶液 2, 3, 5, 10, 15 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以对照品的浓度为自变量, 峰面积为因变量, 得乌头碱的回归方程为  $Y = 1.65 \times 10^6 X + 0.007$ ; 相关系数  $r = 0.999 8$ ; 乌头碱在 0.066 0 ~ 0.495 0 μg 线性关系良好。

**3.5 精密度试验** 取同一批样品溶液, 按上述色谱条件, 连续测定 6 次, 依法测定, 乌头碱的峰面积 RSD 1.33%。

**3.6 稳定性试验** 取同一批样品溶液, 放置 0, 5, 10, 20, 24 h, 依法测定, 乌头碱峰面积, RSD 1.29%。

**3.7 重复性试验** 精密称取同一批样品 6 份, 按 **3.2.2** 方法制备样品, 测定其乌头碱的含量, 结果测定乌头碱质量分数 0.031 7 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.20%。

**3.8 加样回收率试验** 精密称取同一批样品 2 g,

共 6 份, 分别精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液制成的每 1 mL 含乌头碱 1.11 μg 的溶液 50 mL, 按 **3.2.2** 项下及 **3.1** 色谱条件, 测定其乌头碱的含量, 并计算回收率, 见表 2。

表 2 乌头碱加样回收率试验

样品量 /mg	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.067 0	0.124 3	0.057 3	103.24	102.04	1.75
0.064 1	0.120 0	0.055 9	100.72		
0.069 3	0.126 4	0.057 1	102.88		
0.063 0	0.119 4	0.056 4	101.62		
0.063 5	0.118 7	0.055 2	99.46		
0.066 7	0.124 6	0.057 9	104.32		

注: 加入量均为 0.055 5 mg。

**3.9 检出限和定量限** 精密量取质量浓度为 11.1 mg·L<sup>-1</sup> 的乌头碱溶液稀释至不同浓度, 进样测定, 乌头碱的检出限(信噪比 3:1)和定量限(信噪比 10:1)分别为 2.22, 5.55 μg。

#### 4 讨论

白芍为复方小活络丸的组成成分, 有效成分为芍药苷, 不同产地和生长环境因素, 可造成药材的质量有很大差异<sup>[8]</sup>, 白芍的饮片炮制工艺对其含量也有较大影响<sup>[9]</sup>, 导致中成药中芍药苷含量的差异较大; 方中因制川乌、制草乌所占比例大, 乌头碱的毒性较大, 应制定限量检查的方法, 本实验以芍药苷含量、乌头碱限量为质量控制指标, 方法简便、灵敏、准确, 分离度、重复性好, 可作为控制质量的一种方法。

#### [参考文献]

- [1] SFDA. 国家药品标准(试行)[S]. YBZ09152004.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 医药工业出版社, 2010: 96.
- [3] 符华林. 我国乌头属药用植物的研究概况[J]. 中药材, 2004, 27(2): 149.
- [4] 张硕峰, 吴金英, 贾占红, 等. 附子中乌头碱对大鼠心功能效-毒剂量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 222.
- [5] 张启云, 朱站杰, 余日跃, 等. RP-HPLC 法测定白附片中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(12): 1.
- [6] 林华, 邓广海. 川乌 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 73.
- [7] 聂黎行, 张丰梅, 鲁静, 等. 附子和附片质量标准研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(15): 1182.
- [8] 胡建焜, 梁煜霞. 不同产地白芍中芍药苷含量比较[J]. 临床医学工程, 2009, 16(2): 89.
- [9] 郭富华, 黄海燕. 不同白芍炮制品中芍药苷含量的比较[J]. 中国药事, 2007, 21(7): 509.

[责任编辑 邹晓翠]