

HPLC-DAD 法测定脑血栓片中苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A

周 军, 张 蕾, 王 杰

天津市药品检验所, 天津 300070

摘 要: **目的** 建立测定脑血栓片中苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的 HPLC-DAD 法。**方法** 采用 HPLC-DAD 法, Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相: 甲醇-0.2%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长分别为 210 nm (苦杏仁苷)、403 nm (羟基红花黄色素 A)、230 nm (芍药苷)、321 nm (阿魏酸)、286 nm (丹酚酸 B)、270 nm (丹参酮 II_A); 体积流量: 0.7 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量 3~5 μL。**结果** 苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 6 个成分的线性范围分别为 11.90~1 158.90、9.14~91.39、11.70~1 173.50、4.04~1 011.00、3.97~992.20、4.40~551.00 ng; 平均回收率分别为 96.47%、96.92%、99.96%、97.20%、97.57%、96.50%, RSD 值分别为 1.3%、1.6%、1.3%、1.7%、1.9%、0.7%。**结论** 所建立的方法可同时测定脑血栓片中苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A。

关键词: 脑血栓片; 苦杏仁苷; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 阿魏酸; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)03-0262-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.03.007

Determination of amygdalin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Naoxueshuan Tablets by HPLC-DAD

ZHOU Jun, ZHANG Lei, WANG Jie

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-DAD method for determination of amygdalin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Naoxueshuan Tablets. **Methods** HPLC-DAD chromatography was used. The analysis was carried out on an Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) with methanol - 0.2% phosphoric acid as mobile phases at the flow rate of 0.7 mL/min for gradient elution. Detection with variable wavelength were used, and set at 210 nm for amygdalin, 403 nm for hydroxysafflor yellow A, 230 nm for paeoniflorin, 321 nm for ferulic acid, 278 nm for salvianolic acid, and 270 nm for tanshinone II_A. The column temperature was 30 ℃ with injection volume of 3—5 μL. **Results** The linear ranges of six components were 11.90—1158.90, 9.14—91.39, 11.70—1173.50, 4.04—1011.00, 3.97—992.20, 4.40—551.00 ng, respectively. The average recoveries were 96.47%, 96.92%, 99.96%, 97.20%, 97.57%, and 96.50% with RSD 1.3%, 1.6%, 1.3%, 1.7%, 1.9%, and 0.7%, respectively. **Conclusion** This method can be used to simultaneously determine amygdalin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Naoxueshuan Tablets.

Key words: Naoxueshuan Tablets; amygdalin; hydroxysafflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; salvianolic acid B; tanshinone II_A; HPLC-DAD

脑血栓片是临床治疗中风和脑血栓的常用中成药, 由丹参、红花、桃仁、赤芍等 10 味中药组成, 具有活血化瘀、醒脑通络、潜阳熄风的功效, 用于因瘀血、肝阳上亢出现的中风先兆, 如肢体麻木、

头晕目眩等和脑血栓形成出现的中风不语、口眼歪斜、半身不遂等症, 具有预防和治疗作用。天津同仁堂集团股份有限公司生产的薄膜衣片药品执行标准为国家食品药品监督管理局标准 YBZ04962004,

收稿日期: 2014-11-25

作者简介: 周 军 (1976—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事中药药品检验及质量控制分析工作。

Tel: (022) 23513806 E-mail: happy76dragon.com@aliyun.com

标准中均无定量指标,无法有效地控制药品的质量。处方中红花、桃仁、赤芍具有通经活络的功效,丹参、当归具有祛瘀生新的功效,均为臣药,因此本研究建立 DAD-HPLC 法同时测定脑血栓片中上述中药的主要有效成分苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A,对控制和提高脑血栓片的质量有重要的意义。

1 仪器与试药

Waters e2695 高效液相色谱仪,配有四元泵、2998 二极管阵列紫外检测器、自动进样器、empower 色谱工作站。

苦杏仁苷(质量分数 93.6%,批号 110820-201004)、羟基红花黄色素 A(质量分数 92.5%,批号 111637-201106)、芍药苷(质量分数 96.5%,批号 110736-201035)、阿魏酸(质量分数 99.6%,批号 110773-201012)、丹酚酸 B(质量分数 95.4%,批号 111562-201212)和丹参酮 II_A(批号 110766-200619)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,购于默克公司;水为超纯水。

脑血栓片为天津同仁堂集团股份有限公司生产,薄膜衣片,规格为 0.6 g/片,批号分别为 C90023、D86004、B83006。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm);流动相:甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱,0~25 min, 15% A→50% A, 25~30 min, 50% A→70% A, 30~37 min, 70% A→90% A, 37~38 min, 90% A→15% A, 38~55 min, 15% A;检测波长分别为 210 nm(苦杏仁苷)、403 nm(羟基红花黄色素 A)、230 nm(芍药苷)、321 nm(阿魏酸)、286 nm(丹酚酸 B)、270 nm(丹参酮 II_A);体积流量:0.7 mL/min;柱温:30 ℃;进样量 3~5 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对照品适量,加甲醇制成分别含 70、1、230、3、40、2 μg/mL 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 10 片,除去包衣,精密称定,研细,精密称取 0.2 g,置离心管中,加入甲醇 50 mL,超声处理 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,残渣加甲醇

重复提取 2 次,每次 25 mL,分别取上清液,置圆底烧瓶中,40 ℃减压浓缩至约 1~2 mL,用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 专属性试验

按处方比例分别制备缺桃仁、红花、赤芍、当归和川芎以及丹参的阴性样品,制备成阴性样品溶液。分别取上述对照品溶液 5 μL、脑血栓片供试品溶液及阴性样品溶液各 3 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果见图 1~6。

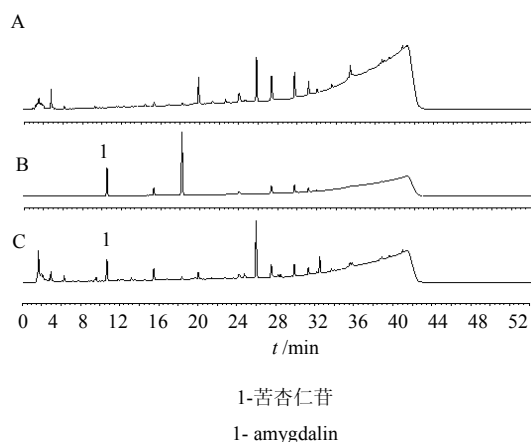


图 1 缺桃仁阴性样品(A)、苦杏仁苷对照品(B)和脑血栓片(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample without *Persicae Semen* (A), amygdalin reference substance (B), and Naoxueshuan Tablets (C)

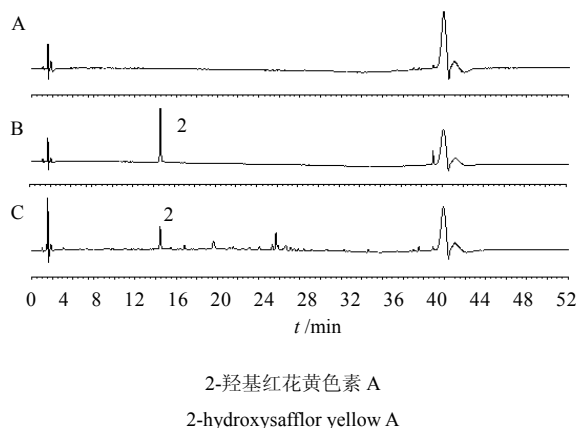


图 2 缺红花阴性样品(A)、羟基红花黄色素 A 对照品(B)和脑血栓片(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of negative sample without *Carthami Flos* (A), hydroxysafflor yellow A reference substance (B), and Naoxueshuan Tablets (C)

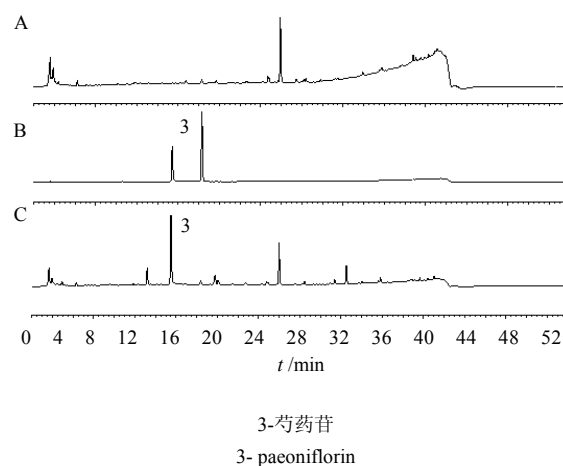


图3 缺赤芍阴性样品(A)、芍药苷对照品(B)和脑血栓片(C)的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of negative sample without *Paeoniae Rubra Radix* (A), paeoniflorin reference substance (B), and Naoxueshuan Tablets (C)

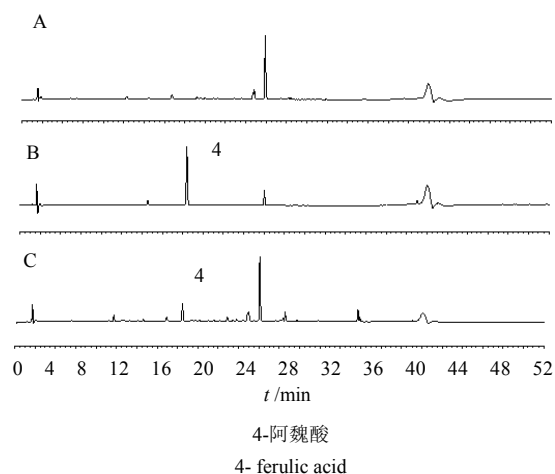


图4 缺当归、川芎阴性样品(A)、阿魏酸对照品(B)和脑血栓片(C)的HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of negative sample without *Angelicae Sinensis Radix* and *Chuanxiong Rhizoma* (A), ferulic acid reference substance (B), and Naoxueshuan Tablets (C)

2.5 线性关系考察

精密称取苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B和丹参酮II_A对照品适量,用甲醇制成质量浓度分别为0.237 2、0.0182 8、0.234 5、0.202 2、0.198 4、0.110 2 mg/mL的混合对照品储备溶液。分别精密吸取上述溶液0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mL,置10 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取上述稀释后对照品溶液及储备液各5 μL,进样,按上述色谱条件测定峰面

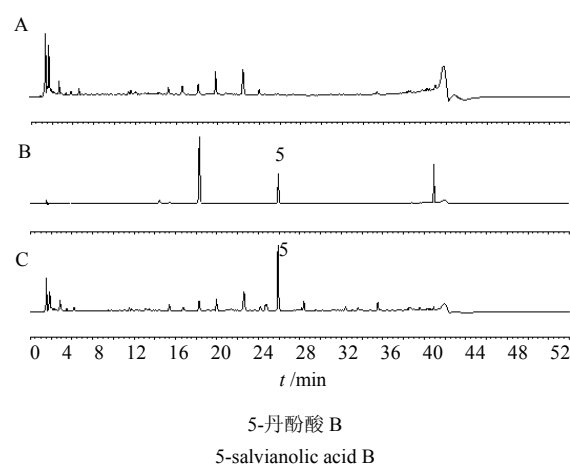


图5 缺丹参阴性样品(A)、丹酚酸B对照品(B)和脑血栓片(C)的HPLC色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of negative sample without *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (A), salvianolic acid B reference substance (B), and Naoxueshuan Tablets (C)

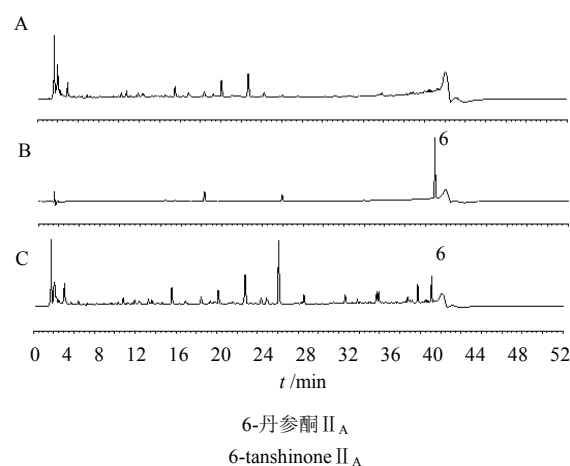


图6 缺丹参阴性样品(A)、丹参酮II_A对照品(B)和脑血栓片(C)的HPLC色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of negative sample without *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (A), tanshinone II_A reference substance (B), and Naoxueshuan Tablets (C)

积。以进样质量对峰面积值进行线性回归,得回归方程,见表1。

2.6 精密度试验

取批号B83006血栓片样品0.2 g,制备供试品溶液,进样测定,结果样品中苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B、丹参酮II_A的峰面积RSD值分别为1.92%、2.23%、1.99%、2.04%、1.81%、1.79%。

表1 苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B和丹参酮II_A的线性方程Table 1 Linear regressions of amygdalin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, salvianolic acid B, and tanshinone II_A

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ng
苦杏仁苷	$Y=1\,477\,169.43X-5\,024.94$	0.999 9	11.90~1 158.90
羟基红花黄色素A	$Y=4\,594\,490.84X-740.94$	0.999 9	9.14~91.39
芍药苷	$Y=2\,134\,028.93X-21\,674.03$	0.999 9	11.70~1 173.50
阿魏酸	$Y=8\,227\,197.51X-36\,174.69$	0.999 9	4.04~1 011.00
丹酚酸B	$Y=1\,914\,885.17X+3\,481.02$	0.999 9	3.97~992.20
丹参酮II _A	$Y=8\,473\,131.07X-7\,024.81$	0.999 9	4.40~551.00

2.7 重复性试验

取批号B83006脑血栓片样品0.2 g, 平行精密称取6份, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算, 结果苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B、丹参酮II_A质量分数分别为5.893 6、0.096 7、9.691 9、0.233 9、3.536 7、0.166 3 mg/g, RSD值分别为0.65%、1.18%、1.09%、0.48%、0.90%、0.67%。

2.8 稳定性试验

取批号B83006脑血栓片样品0.2 g, 制备供试品溶液, 分别在0、2、4、8、12、18、24 h进样测定, 结果样品中苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B、丹参酮II_A峰面积的RSD值分别为1.90%、1.93%、1.32%、1.93%、1.62%、1.89%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 回收率试验

取批号B83006脑血栓片样品6份, 每份0.1 g, 精密称定, 分别精密加入含苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B、丹参酮II_A 11.64、0.186、19.84、0.46、7.1、0.32 μg/mL混合对照品溶液50 mL, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果各成分的平均回收率分别为96.47%、96.92%、99.96%、97.20%、97.57%、96.50%, RSD值分别为1.3%、1.6%、1.3%、1.7%、1.9%、0.7%。

2.10 样品测定

取3批脑血栓片样品, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 记录峰面积, 按外标法计算质量分数。结果见表2。

表2 脑血栓片中苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B和丹参酮II_A的测定结果(*n*=3)Table 2 Determination of amygdalin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Naoxueshuan Tablets (*n* = 3)

批号	苦杏仁苷		羟基红花黄色素A		芍药苷		阿魏酸		丹酚酸B		丹参酮II _A	
	质量分数/ (μg·片 ⁻¹)	RSD/ %	质量分数/ (μg·片 ⁻¹)	RSD/ %	质量分数/ (μg·片 ⁻¹)	RSD/ %	质量分数/ (μg·片 ⁻¹)	RSD/ %	质量分数/ (μg·片 ⁻¹)	RSD/ %	质量分数/ (μg·片 ⁻¹)	RSD/ %
C90023	2621.2	1.32	26.0	1.80	5 537.5	0.55	13.6	1.59	2 681.4	0.84	98.6	1.74
D86004	4228.0	0.95	21.4	1.72	4 413.7	0.28	11.9	1.68	2 767.3	1.27	97.5	1.62
B83006	3536.2	1.16	58.0	1.91	5 815.1	0.36	140.3	1.89	2 122.0	1.03	99.8	1.85

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

采用规格为100 mm×4.6 mm, 粒径为2.7 μm的色谱柱, 与常规的粒径为5 μm色谱柱比较, 提高了分离效果, 减少了分析时间, 节约了有机溶剂, 极大地提高了工作效率; 同时由于可以在普通液相色谱仪器上使用, 粒径为2.7 μm的色谱柱具有非常大的应用前景。

3.2 提取方法考察

分别采用甲醇、70%甲醇、乙醇、70%乙醇作为提取溶剂, 比较加热回流和超声处理两种提取方法, 并对提取溶剂用量和提取时间进行考察, 结果表明加入甲醇50、25、25 mL超声提取, 可将样品中6种成分提取完全。

3.3 流动相的选择

苦杏仁苷与其他成分的分离是实验中的难点,

经参考文献^[1-2]比较2种流动相体系:(1)以乙腈-0.2%磷酸进行梯度洗脱,结果样品色谱中部分色谱峰与杂质峰分离较差^[3-4];(2)采用甲醇-0.2%磷酸为流动相,结果品色谱中苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B、丹参酮II_A色谱峰与杂质峰分离效果较好,分离度均大于1.5,效果较好。

3.4 检测波长的确定

苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B、丹参酮II_A的最大吸收波长从210 nm至403 nm,相差极大,因此本实验分析时采用Waters 2998 二极管阵列检测器,设定相关成分的最大吸收波长作为检测波长:210 nm(苦杏仁苷)、403 nm(羟基红花黄色素A)、230 nm(芍药苷)、321 nm(阿魏酸)、286 nm(丹酚酸B)、270 nm(丹参酮II_A),达到最佳的分析效果。

3.5 柱温的选择

比较30、35、40℃不同柱温条件下样品的分离情况,结果以柱温为30℃时样品分离较好。

3.6 进样量的影响

实验发现,当供试品溶液进样量为5 μL时,样品色谱图中大部分色谱峰峰形较差,出现肩峰;经调整进样量,减小为3 μL或更小时,峰形较好。分析原因为粒径为2.7 μm的色谱柱承载量较5 μm色谱柱小,应该减小进样量,避免色谱柱超载。

3.7 耐用性试验

采用Waters e2695 高效液相色谱仪,分别以Agilent Porshell 120 SB- C₁₈色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)、Kinetex C₁₈色谱柱(100 mm×4.6

mm, 2.6 μm)对3批血栓片样品的供试品溶液进行测定,计算样品中丹6种成分。结果不同色谱柱测定样品的结果基本一致。

3.8 检测指标的确定

文献报道中采用HPLC法测定脑血栓片中丹参素等5种成分的含量^[5],但丹参素、原儿茶醛为丹酚酸的水解产物,并且中药制剂发挥功效的物质基础是多种成分协同起效,脑血栓片处方中红花、桃仁、赤芍、丹参、当归、川芎均具有活血、祛瘀的功效,与脑血栓片的功效一致,故本实验采用HPLC法对上述6种有效成分进行了测定,可以更好的控制药品质量。

本实验建立的方法简单、快速、准确,为脑血栓片质量控制提供新方法,提高了药品的质量标准,可用于药品的质量控制。

参考文献

- [1] 贾桂艳,马莉,韩锋,等. HPLC法测定脑通胶囊中丹酚酸B[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 142-144.
- [2] 王敏,马玉梅. 安肾丸的质量控制研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 47-50.
- [3] 马旭伟,韦辉,刘素香,等. HPLC法测定强肝胶囊中龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1125-1128.
- [4] 王世祥,王晓雯,高志娟,等. HPLC法测定活血胶囊中芍药苷、苦杏仁苷、川芎嗪和阿魏酸[J]. 中成药, 2011, 33(4): 619-622.
- [5] 陈斌,叶隽,纪峰,等. 高效液相色谱法测定脑血栓片中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸和丹酚酸B的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(12): 1891-1894.