

## UPLC 法同时测定荷丹片中 8 种指标成分

赵 莉<sup>1</sup>, 唐生安<sup>2</sup>

1. 天津医科大学第二医院, 天津 300211

2. 天津医科大学药学院 基础医学研究中心 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

**摘要:** 目的 建立 UPLC 法同时测定荷丹片中荷叶碱、补骨脂素、异补骨脂素、丹参酮 II<sub>A</sub>、丹参素、番泻苷 A、番泻苷 B、熊果酸 8 种指标成分的量。方法 采用 UPLC 法, Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 甲醇-乙腈 (40:60, A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 体积流量 0.6 mL/min, 梯度洗脱: 0~4.0 min, 90% B; 4.0~6.0 min, 90%~80% B; 6.0~9.0 min, 80%~70% B; 9.0~10.5 min, 70%~60% B; 10.5~12.0 min, 60%~50% B; 12.0~16.0 min, 50%~10% B; 分段变波长测定: 0~4.0 min 为 215 nm, 4.0~12.0 min 为 270 nm, 12.0~16.0 min 为 340 nm; 柱温 40 ℃; 进样量 1 μL。分别对线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率进行考察。结果 被测定的 8 种指标成分分别在选定的范围内线性关系良好; 精密度良好, RSD 均小于 3.0%; 重复性良好, RSD 均小于 3.0%; 在室温条件下 24 h 内稳定; 平均加样回收率在 99.21%~101.91%, RSD 均小于 3.0%。结论 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于荷丹片的质量控制。

**关键词:** 荷丹片; 多指标成分; UPLC; 荷叶碱; 补骨脂素; 丹参素; 番泻苷; 熊果酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)16-2257-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.012

## Simultaneous determination of eight components in Hedan Tablets by UPLC

ZHAO Li<sup>1</sup>, TANG Sheng-an<sup>2</sup>

1. The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

2. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling, Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics Theranostics, Research Center of basic Medical Sciences, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**Abstract: Objective** To develop a UPLC method for the simultaneous determination of nuciferine, psoralen, isopsoralen, tanshinone II<sub>A</sub>, danshensu, sennoside A, sennoside B, and ursolic acid in Hedan Tablets. **Methods** The chromatographic separation was achieved on an Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with methanol-acetonitrile (40:60, A)-0.1% formic acid (B) as mobile phases at the flow rate of 0.6 mL/min for gradient elution: 0—4.0 min, 90% B; 4.0—6.0 min, 90%—80% B; 6.0—9.0 min, 80%—70% B; 9.0—10.5 min, 70%—60% B; 10.5—12.0 min, 60%—50% B; 12.0—16.0 min, 50%—10% B; Detection with variable wavelength: 0—4.0 min was 215 nm, 4.0—12.0 min was 270 nm, 12.0—16.0 min was 340 nm, and the column temperature was 40 ℃. Its linear relationship, precision, repeatability, stability, and recoveries were investigated. **Results** The results showed that the eight active components were well separated and showed good linearity. The precision was good and RSD was less than 3.0%. The repeatability was good and RSD was less than 3.0%. The stability was good in 24 h. The average recoveries were between 99.21%—101.91% and RSD was less than 3.0%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable. It could be applied to the quality control of Hedan Tablets.

**Key words:** Hedan Tablets; multi-index composition; UPLC; nuciferine; psoralen; danshensu; sennoside; ursolic acid

荷丹片是《中国药典》2010 年版一部收载的品种, 由荷叶、丹参、山楂、番泻叶、盐炒补骨脂制成,

具有化痰降浊、活血化瘀之功效, 临床用于高脂血症属痰浊挟瘀证候者<sup>[1]</sup>。荷叶提取物的主要成分为

收稿日期: 2013-04-05

作者简介: 赵 莉 (1983—), 女, 药师, 研究方向为药物分析。Tel: 13821999635 E-mail: savagesavage@sina.com

\*通信作者 唐生安 Tel: 88329098 E-mail: tangshengan@tjmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-08-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130809.0852.004.html>

荷叶碱；丹参提取物的主要活性成分为丹参素和丹参酮 II<sub>A</sub>；补骨脂的主要活性成分为补骨脂素和异补骨脂素；番泻叶提取物的主要活性成分番泻苷 A 和番泻苷 B；山楂定量测定的指标性成分为熊果酸。目前，《中国药典》2010 年版及相关文献对荷丹片的质量控制主要为采用 HPLC 法测定荷叶碱的量，而鲜有报道荷丹片中其他活性成分的定量检测<sup>[2-4]</sup>。只用 1 种成分来衡量荷丹片的质量具有一定片面性，故本实验采用 UPLC 法<sup>[5-6]</sup>同时测定上述 8 种活性成分的量，为更全面控制荷丹片的质量提供参考依据。结果表明，所建立的方法专属性强，准确、快速，可为全面控制荷丹片质量提供新的分析手段。

## 1 仪器与材料

Acquity UPLC 超高压液相色谱系统（Waters 公司，包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower2 工作站）；BP211D 型电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；Sigma 1—14 高速离心机（德国 Sigma 公司）。

荷叶碱（批号 111566-200703）、丹参素（批号 110568-201114）、丹参酮 II<sub>A</sub>（批号 110766-200619）、补骨脂素（批号 111739-201115）、异补骨脂素（批号 110738-201012）、番泻苷 A（批号 111350-201105）、番泻苷 B（批号 111351-201105）、熊果酸（批号 110742-200519）均购于中国食品药品检定研究院；荷丹片（糖衣片，规格：24 片/盒，批号 20120411、20120412、20120413，南昌济顺制药有限公司）；乙腈、甲醇、甲酸（色谱纯），水（超纯水）。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为甲醇-乙腈（40：60，A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱：0~4.0 min，90% B；4.0~6.0 min，90%~80% B；6.0~9.0 min，80%~70% B；9.0~10.5 min，70%~60% B；10.5~12.0 min，60%~50% B；12.0~16.0 min，50%~10% B；体积流量 0.6 mL/min；分段变波长测定：0~4.0 min 为 215 nm，4.0~12.0 min 为 270 nm，12.0~16.0 min 为 340 nm；柱温 40 ℃；进样量 1 μL。

### 2.2 溶液的制备

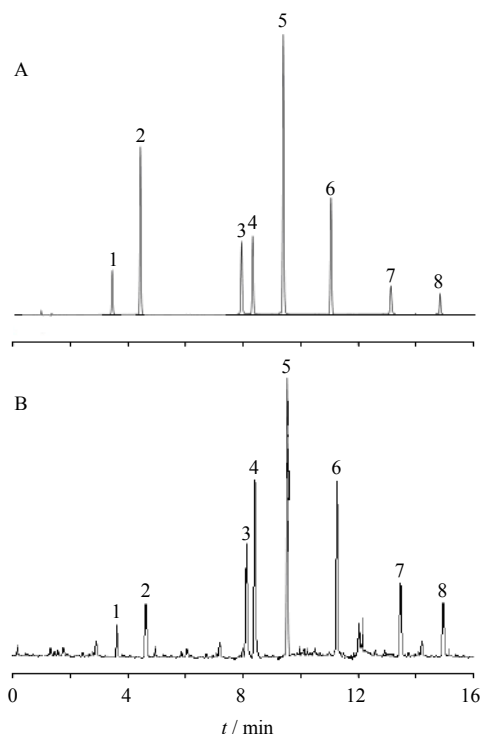
**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取荷叶碱 6.00 mg、丹参素 1.98 mg、丹参酮 II<sub>A</sub> 1.99 mg、补骨脂素 5.94 mg、异补骨脂素 6.06 mg、番泻苷 A 3.00 mg、番泻苷 B 3.09 mg、熊果酸 2.10 mg 适量，分

别置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，得各对照品储备液，备用。再精密吸取各对照品储备液适量置 25 mL 量瓶中，流动相稀释至刻度，得含荷叶碱 24 mg/L、丹参素 7.92 mg/L、丹参酮 II<sub>A</sub> 7.96 mg/L、补骨脂素 23.8 mg/L、异补骨脂素 24.2 mg/L、番泻苷 A 12.0 mg/L、番泻苷 B 12.4 mg/L、熊果酸 8.4 mg/L 的混合对照品储备液，备用。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取荷丹片糖衣片，去糖衣，研成细粉，取细粉约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%乙醇 25 mL，密塞，称定质量，超声（功率 45 W，频率 59 kHz）处理 60 min，放冷，再称定质量，用 50%乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得，备用。

### 2.3 系统适用性试验

取混合对照品溶液与供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件进样，结果 8 种被测定成分均能达到基线分离，与相邻色谱峰的分度均大于 2.0，以各成分色谱峰计算理论塔板数均超过 100 000，峰形较好。UPLC 色谱图见图 1。



1-熊果酸 2-丹参素 3-补骨脂素 4-异补骨脂素 5-荷叶碱  
6-丹参酮 II<sub>A</sub> 7-番泻苷 B 8-番泻苷 A  
1-ursolic acid 2-danshensu 3-psorale 4-isopsorale 5-nuciferin  
6-tanshinone II<sub>A</sub> 7-sennoside B 8-sennoside A

图 1 8 种混合对照品 (A) 与荷丹片 (B) 的 UPLC 色谱图  
Fig. 1 UPLC chromatograms of eight mixed reference substances (A) and Hedan Tablets (B)

## 2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 0.10、0.25、0.5、1.0、2.5 mL 于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液。分别吸取上述溶液各 1  $\mu$ L,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰峰面积,以峰面积积分值为纵坐标 ( $Y$ ),对照品质量浓度为横坐标 ( $X$ ) 进行线性回归,得回归方程:荷叶碱  $Y=12\ 358 X-56\ 392$ ,  $r=0.999\ 3$ ,线性范围 0.8~80.0 mg/L;丹参素  $Y=3\ 689.3 X-964.5$ ,  $r=0.999\ 8$ ,线性范围 0.079 2~7.92 mg/L;丹参酮 II<sub>A</sub>  $Y=6\ 984.2 X-638.5$ ,  $r=0.999\ 8$ ,线性范围 0.079 6~7.96 mg/L;补骨脂素  $Y=56\ 439 X-5\ 648$ ,  $r=0.999\ 5$ ,线性范围 0.238~23.8 mg/L;异补骨脂素  $Y=38\ 672 X-235.4$ ,  $r=0.999\ 9$ ,线性范围 0.242~24.2 mg/L;番泻苷 A  $Y=2\ 158 X-4\ 539.1$ ,  $r=0.999\ 8$ ,线性范围 0.12~12.0 mg/L;番泻苷 B  $Y=5\ 632 X-635.3$ ,  $r=0.999\ 8$ ,线性范围 0.124~12.4 mg/L;熊果酸  $Y=4\ 194 X-231.3$ ,  $r=0.999\ 6$ ,线性范围 0.084~8.4 mg/L。

## 2.5 精密度试验

取一定质量浓度的混合对照品溶液(荷叶碱 24 mg/L、丹参素 7.92 mg/L、丹参酮 II<sub>A</sub> 7.96 mg/L、补骨脂素 23.8 mg/L、异补骨脂素 24.2 mg/L、番泻苷 A 12.0 mg/L、番泻苷 B 12.4 mg/L、熊果酸 8.4 mg/L),在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录色谱峰面积,计算荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素、番泻苷 A、番泻苷 B、熊果酸峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.94%、1.28%、1.56%、1.84%、2.67%、2.46%、2.39%,表明精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项色谱条件测定,记录色谱峰面积。结果荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素、番泻苷 A、番泻苷 B、熊果酸峰面积的 RSD

分别为 0.49%、0.87%、1.21%、1.73%、1.99%、2.84%、2.88%、2.96%,说明供试品溶液中的 8 种指标成分在室温条件下 24 h 内稳定。

## 2.7 重复性试验

取同一批(批号 20120411)样品 6 份,按“2.2.2”项下方法操作,平行制备供试品溶液 6 份,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰面积,结果荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素、番泻苷 A、番泻苷 B、熊果酸质量浓度的 RSD 分别为 0.63%、0.45%、1.75%、1.98%、1.12%、2.44%、2.47%、2.32%。

## 2.8 加样回收率试验

取同一批号(批号 20120411)已测定的样品 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别精密加入对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰峰面积,计算回收率。结果荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素、番泻苷 A、番泻苷 B、熊果酸的平均回收率分别为 100.25%、100.34%、101.32%、101.91%、101.55%、99.27%、99.21%、99.63%,RSD 分别为 1.78%、2.84%、0.31%、0.99%、2.28%、1.33%、1.67%、1.56%。

## 2.9 样品测定

取 3 批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批平行 2 份,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰面积,计算每批样品中 8 种指标成分的质量分数,结果见表 1。

## 3 讨论

本实验首次建立了 UPLC 法同时测定荷丹片中 8 种指标成分的方法,由于采用 1.7  $\mu$ m 的 C<sub>18</sub> 填料色谱柱,因此具有良好的准确度、精密度和可靠性,方法简便,分析时间短,16 min 内即可同时完成 8 种成分的准确测定,溶剂消耗少,尤其适用于中药复方多指标成分的定量检测<sup>[5]</sup>。

实验中采用二极管阵列检测器在 190~400 nm

表 1 荷丹片中指标性成分的质量分数 ( $n=2$ )

Table 1 Contents of target components in Hedan Tablets ( $n=2$ )

| 批 号      | 质量分数 / (mg·g <sup>-1</sup> ) |       |                     |       |       |       |       |       |
|----------|------------------------------|-------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          | 荷叶碱                          | 丹参素   | 丹参酮 II <sub>A</sub> | 补骨脂素  | 异补骨脂素 | 番泻苷 A | 番泻苷 B | 熊果酸   |
| 20120411 | 0.140                        | 0.009 | 0.017               | 0.039 | 0.034 | 0.004 | 0.003 | 0.008 |
| 20120412 | 0.141                        | 0.008 | 0.016               | 0.038 | 0.032 | 0.003 | 0.002 | 0.008 |
| 20120413 | 0.140                        | 0.008 | 0.017               | 0.040 | 0.033 | 0.003 | 0.003 | 0.007 |

分别扫描混合对照品溶液中荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素、番泻苷 A、番泻苷 B、熊果酸色谱峰的紫外吸收, 其最大吸收波长分别为 270、280、270、245、245、340、340、210 nm。为使各成分均在其最大吸收波长下进行测定, 提高分析方法的灵敏度, 采用分段变波长检测法对此 8 种化学成分进行测定, 根据各成分保留时间差异, 在 0~4.0 min 设定检测波长为 215 nm, 以测定熊果酸; 在 4.0~12.0 min 设定检测波长为 270 nm, 以测定荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素; 在 12.0~16.0 min 设定检测波长为 340 nm, 以测定番泻苷 A 与番泻苷 B。在 270 nm 检测波长下, 补骨脂素、异补骨脂素的色谱峰的吸收也可以满足要求, 所以荷叶碱、丹参素、丹参酮 II<sub>A</sub>、补骨脂素、异补骨脂素都用 270 nm 的检测波长进行检测。在此基础上, 根据指标性成分的理化性质和色谱行为, 比较了以甲醇、乙腈-水、甲酸-水、磷酸-水构成的洗脱系统。结果表明, 以乙腈-水(或酸水)和甲醇-水(或甲酸水)

为洗脱系统各成分的分离效果不理想, 经优化后的甲醇-乙腈-甲酸水系统各成分的分离效果较好, 各色谱峰的分离度和理论塔板数均符合要求, 色谱图基线平稳, 荷丹片中 8 种指标成分分离效果较好。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈 昊, 刘 畅, 李 燕, 等. 用 HPLC-TOF-MS 法分析荷丹片的化学成分 [J]. 药学服务与研究, 2011, 11(6): 439-443.
- [3] 刘 畅, 柴逸峰, 朱臻宇, 等. 高效液相色谱法同时测定荷丹片中荷叶碱丹参酮 II<sub>A</sub> 补骨脂素和异补骨脂素的含量 [J]. 解放军药学学报, 2011, 27(1): 57-60.
- [4] 刘 畅. 中药荷丹片的化学物质基础与质量控制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [5] 吴剑威, 赵润怀, 陈 波, 等. 超高效液相色谱在中药领域的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 79-81.
- [6] 单进军, 杜丽娜, 徐建亚, 等. UPLC 法同时测定金欣口服液中 8 种指标成分 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 183-185.