

HPLC 法同时测定心脑血管片中 11 种成分

闫涛¹, 周慧^{2*}

1. 天津市环湖医院 药剂科, 天津 300060

2. 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津医科大学药学院, 天津 300070

摘要: **目的** 建立同时测定心脑血管片中 11 种成分(丹参酮 II_A、葛根素、β-蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷和 23-乙酰泽泻醇 B)的 HPLC 分析方法。**方法** 采用 HPLC 法测定心脑血管片中丹参酮 II_A、葛根素、β-蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷和 23-乙酰泽泻醇 B。色谱柱为 InertSustain C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 甲醇-乙腈(1:1, A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱: 0~10.0 min, 80% B; 10.0~20.0 min, 80%~70% B; 20.0~35.0 min, 70%~50% B; 35.0~50.0 min, 50%~30% B; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 10 μL。**结果** 丹参酮 II_A、葛根素、β-蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷和 23-乙酰泽泻醇 B 分离度良好, 分别在 28.24~282.42、15.89~158.90、20.53~205.26、4.09~40.94、12.08~120.76、40.03~404.30、4.08~40.75、2.13~21.25、7.91~79.14、20.30~202.96、4.10~40.96 μg/mL 线性关系良好, *r* 均大于 0.999 0, 平均加样回收率为 98.15%~101.84% (RSD 在 0.62%~1.71%)。6 批样品中丹参酮 II_A、葛根素、β-蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷和 23-乙酰泽泻醇 B 分别在 0.870~0.887、6.321~6.329、0.857~0.866、0.171~0.179、0.369~0.377、2.128~2.136、0.088~0.099、0.148~0.155、0.113~0.121、0.371~1.380、0.101~0.109 mg/g。**结论** 本法快速、灵敏度高、准确度高、专属性好, 为心脑血管片的质量控制提供依据。**关键词:** 心脑血管片; 丹参酮 II_A; 葛根素; β-蜕皮甾酮; 甘草苷; 芍药苷; 斯皮诺素; 阿魏酸; 山柰素; 大黄素; 细叶远志皂苷; 23-乙酰泽泻醇 B; HPLC

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)09-1531-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.014

Simultaneous determination of eleven ingredients in Xinnaokang Tablets by HPLC

YAN Tao¹, ZHOU Hui²

1. Department of Pharmacy, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

2. Tianjin Key Laboratory of Clinical Medicine, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish a method of HPLC for the simultaneous determination of eleven ingredients (tanshinone II_A, puerarin, β-ecdysone, liquiritin, paeoniflorin, spinosin, ferulic acid, kaempferide, emodin, tenuifolin, and 23-acetate alisol B) in Xinnaokang Tablets. **Methods** The contents of tanshinone II_A, puerarin, β-ecdysone, liquiritin, paeoniflorin, spinosin, ferulic acid, kaempferide, emodin, tenuifolin, and 23-acetate alisol B were determined by HPLC. Separation was performed on an InertSustain C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Mobile phase was methanol-acetonitrile (1:1, A)-0.1% phosphoric acid (B), gradient elution: 0—10.0 min, 80% B; 10.0—20.0 min, 80%—70% B; 20.0—35.0 min, 70%—50% B; and 35.0—50.0 min, 50%—30% B; Flow rate was 0.9 mL/min; Column temperature was 40 ℃; Injection volume was 10 μL. **Results** The separations of tanshinone II_A, puerarin, β-ecdysone, liquiritin, paeoniflorin, spinosin, ferulic acid, kaempferide, emodin, tenuifolin, and 23-acetate alisol B were good. The linear ranges were good, 28.24—282.42, 15.89—158.90, 20.53—205.26, 4.09—40.94, 12.08—120.76, 40.03—404.30, 4.08—40.75, 2.13—21.25, 7.91—79.14, 20.30—202.96, and 4.10—40.96 μg/mL for tanshinone II_A, puerarin, β-ecdysone, liquiritin, paeoniflorin, spinosin, ferulic acid, kaempferide, emodin, tenuifolin, and 23-acetate alisol B, respectively, with the correlation *r* > 0.999 0. The extraction recoveries varied from 98.15% to 101.84% (RSD varied from 0.62% to 1.71%). The contents of tanshinone II_A, puerarin, β-ecdysone, liquiritin, paeoniflorin, spinosin, ferulic acid, kaempferide, emodin, tenuifolin, and 23-acetate alisol B were 0.870—0.887,

收稿日期: 2015-12-26

作者简介: 闫涛, 天津市环湖医院药剂科, 硕士, 主管药师。Tel: 13512086882 E-mail: v.maldini@163.com

*通信作者 周慧 E-mail: zhouhui@tmu.edu.cn

6.321—6.329, 0.857—0.866, 0.171—0.179, 0.369—0.377, 2.128—2.136, 0.088—0.099, 0.148—0.155, 0.113—0.121, 0.371—1.380, and 0.101—0.109 mg/g in six batches of samples, respectively. **Conclusion** This method is rapid and has high sensitivity, high accuracy, and good specificity, which can provide the basis for the quality control of Xinnaokang Tablets.

Key words: Xinnaokang Tablets; tanshinone II_A; puerarin; β -ecdysone; liquiritin; paeoniflorin; spinosin; ferulic acid; kaempferide; emodin; tenuifolin; 23-acetate alisol B; HPLC

心脑康片是《中国药典》2015 年版一部收载的品种, 由丹参、制何首乌、赤芍、枸杞子等 16 味药材制成, 具活血化瘀、通窍止痛功效, 用于瘀血阻络所致的胸痹、眩晕, 症见胸闷、心前区刺痛、眩晕、头痛; 扩张血管, 增加冠状动脉血流量。用于冠心病、心绞痛及动脉硬化症^[1]。

组方药材丹参的指标成分为丹参酮 II_A, 制何首乌的主要指标成分为大黄素和大黄素甲醚, 赤芍的主要指标成分为芍药苷, 葛根的主要指标成分为葛根素, 川芎的主要指标成分为阿魏酸, 红花的主要指标成分为山柰素, 泽泻的主要指标成分为 23-乙酰泽泻醇 B, 牛膝的主要指标成分为 β -蜕皮甾酮, 酸枣仁的主要指标成分为斯皮诺素, 甘草的主要指标成分为甘草苷。目前, 对于心脑康片中活性成分测定的研究较少^[2]。中成药的研究多基于多指标的控制, 更能全面反映中成药的质量^[3-9]。《中国药典》2015 年版中对于该中成药的定量测定方法以芍药苷为指标进行测定。本研究首次采用 HPLC 法同时测定心脑康片中丹参酮 II_A、葛根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷和 23-乙酰泽泻醇 B 11 种指标成分, 以期为更全面地控制心脑康片的质量提供参考依据。

1 仪器与材料

Finnigan Surveyor 液相色谱仪, 美国 Finnigan 公司; Mettler Toledo AB204-N 电子天平, 十万分之一, 梅特勒-托利多仪器公司; KQ5200 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

对照品丹参酮 II_A (批号 110766-201520, 质量分数 98.9%)、葛根素 (批号 110752-201514, 质量分数 95.5%)、 β -蜕皮甾酮 (批号 111638-201505, 质量分数 95.0%)、甘草苷 (批号 111610-201106, 质量分数 93.7%)、芍药苷 (批号 110736-201438, 质量分数 96.4%)、斯皮诺素 (批号 111869-201203, 质量分数 95.4%)、阿魏酸 (批号 110773-201313, 质量分数 99.6%)、山柰素 (批号 110861-201310, 质量分数 93.2%)、大黄素 (批号 110756-201512, 质量分数 98.7%)、细叶远志皂苷 (批号 111849-

201504, 质量分数 95.6%)、23-乙酰泽泻醇 B (批号 111846-201504, 质量分数 99.0%), 购于中国食品药品检定研究院。心脑康片, 规格为每片 0.25 g, 为长春海外制药集团有限公司产品, 批号为 20150406、20150407、20150408、20150602、20150603、20150604。乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A、葛根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷、23-乙酰泽泻醇 B 对照品适量, 加 80% 甲醇制成质量浓度分别为 141.211、79.452、102.628、20.471、60.381、202.014、20.374、10.627、39.572、101.478、20.481 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取质量差异下的本品, 研细, 取 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇 (50%) 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按工艺方法制备缺少丹参、制何首乌、赤芍、葛根、川芎、红花、泽泻、牛膝、酸枣仁和甘草的阴性样品, 按“2.1.2”项方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 InertSustain C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈 (1:1, A) -0.1% 磷酸水溶液 (B), 体积流量 0.9 mL/min, 梯度洗脱: 0~10.0 min, 80% B; 10.0~20.0 min, 80%~70% B; 20.0~35.0 min, 70%~50% B; 35.0~50.0 min, 50%~30% B; 分段变波长测定: 0~10.0 min 为 270 nm, 10.0~20.0 min 为 250 nm, 20.0~28.0 min 为 230 nm, 28.0~37.0 min 为 330 nm, 37.0~40.0 min 为 254 nm, 40.0~50.0 min 为 210 nm; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

2.3 系统适用性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液,按“2.2”项条件进样测定,考察系统适用性。在“2.2”项色谱条件下,各成分色谱峰与相邻峰的分度度均大于 1.5,且阴性无干扰。色谱图见图 1。

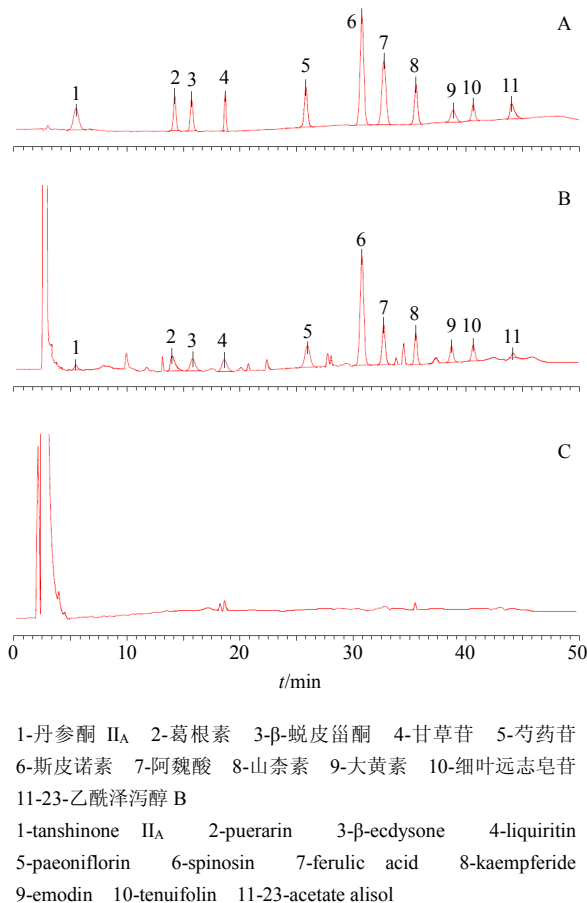


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 与阴性样品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative sample (C)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下制备的混合对照品溶液,制成 6 个不同质量浓度的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行测定。记录相应的峰面积,以峰面积积分值为纵坐标 (Y),质量浓度为横坐标 (X),绘制标准曲线并进行回归计算。11 种成分的线性回归方程分别为丹参酮 II_A: $Y=345.1 X-5.672$, $r=0.999$ 6, 线性范围 28.24~282.42 $\mu\text{g/mL}$; 葛根素: $Y=557.4 X+58.23$ 8, $r=0.999$ 4, 线性范围 15.89~158.90 $\mu\text{g/mL}$; β -蜕皮甾酮: $Y=81.27 X+372.71$, $r=0.999$ 4, 线性范围

20.53~205.26 $\mu\text{g/mL}$; 甘草苷: $Y=3.614 X+72.513$, $r=0.999$ 5, 线性范围 4.09~40.94 $\mu\text{g/mL}$; 芍药苷: $Y=11.284 X+58.247$, $r=0.999$ 8, 线性范围 12.08~120.76 $\mu\text{g/mL}$; 斯皮诺素: $Y=44.667 X+365.23$, $r=0.999$ 5, 线性范围 40.03~404.30 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸: $Y=384.2 X+55.634$, $r=0.999$ 6, 线性范围 4.08~40.75 $\mu\text{g/mL}$; 山柰素: $Y=32.11 X+644.23$, $r=0.999$ 2, 线性范围 2.13~21.25 $\mu\text{g/mL}$; 大黄素: $Y=59.28 X+1.375$, $r=0.999$ 3, 线性范围 7.91~79.14 $\mu\text{g/mL}$; 细叶远志皂苷: $Y=582.1 X+33.62$, $r=0.999$ 4, 线性范围 20.3~202.96 $\mu\text{g/mL}$; 23-乙酰泽泻醇 B: $Y=73.27 X+22.631$, $r=0.999$ 7, 线性范围 4.10~40.96 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明 11 种被测成分在标准曲线范围内质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取批号 20150604 样品,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积。结果丹参酮 II_A、葛根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷、23-乙酰泽泻醇 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.87%、0.81%、0.92%、0.56%、0.83%、0.95%、0.46%、0.58%、0.64%、0.79%、0.48%, 结果表明精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取批号 20150604 样品,按照“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,在“2.2”项色谱条件下进样分析,计算丹参酮 II_A、葛根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷、23-乙酰泽泻醇 B 质量分数 RSD 值分别为 0.99%、1.11%、1.22%、1.06%、0.85%、0.91%、1.32%、1.28%、1.14%、1.21%、1.37%, 结果表明重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取精密度试验下供试品溶液,分别于 0、2、6、8、12、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样分析,丹参酮 II_A、葛根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷、23-乙酰泽泻醇 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.65%、0.98%、0.71%、0.62%、0.77%、0.63%、1.18%、1.62%、1.39%、1.11%、1.28%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取批号 20150604 样品 9 份,每份约 0.5 g,精密称定,分成 3 组,分别按已知质量分数的 50%、100%、150% 3 个水平加入混合对照品溶液,按照“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液,进样分析,计算回收率。丹参酮 II_A、葛

根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷、芍药苷、斯皮诺素、阿魏酸、山柰素、大黄素、细叶远志皂苷、23-乙酰泽泻醇 B 的平均回收率分别为 98.15%、99.34%、100.24%、98.93%、101.64%、99.22%、98.43%、101.84%、101.27%、101.31%、99.81%，RSD 值分别为 1.11%、1.23%、1.47%、0.84%、0.75%、1.05%、

0.62%、1.37%、0.99%、0.77%、1.71%，表明本方法准确度良好。

2.5 定量测定

取 6 批样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，以外标法计算各成分的质量分数，结果见表 1。

表 1 6 批心脑康片中 11 种成分定量测定结果

Table 1 Quantitative determination of eleven components in six batches of Xinnaokang Tablets

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	丹参酮 II _A	葛根素 B	阿魏酸	β -蜕皮甾酮	甘草苷	芍药苷	斯皮诺素	山柰素	大黄素	细叶远志皂苷	23-乙酰泽泻醇
20150406	0.887	6.321	0.865	0.176	0.375	2.136	0.095	0.154	0.117	1.378	0.103
20150407	0.871	6.324	0.862	0.171	0.373	2.129	0.099	0.155	0.113	1.373	0.101
20150408	0.876	6.327	0.859	0.173	0.370	2.134	0.089	0.148	0.115	1.371	0.105
20150602	0.870	6.325	0.857	0.179	0.377	2.133	0.088	0.158	0.121	1.380	0.105
20150603	0.883	6.329	0.861	0.177	0.377	2.136	0.096	0.149	0.120	1.372	0.108
20150604	0.881	6.325	0.866	0.174	0.369	2.128	0.093	0.151	0.114	1.371	0.109

3 讨论

本实验首次建立了 HPLC 法同时测定心脑康片中 11 种成分的分析方法。通过二极管阵列检测器，根据 11 种成分不同的紫外吸收行为，分段波长检测的方法对 11 种成分进行测定，丹参酮 II_A 的检测波长为 270 nm，葛根素、 β -蜕皮甾酮、甘草苷的检测波长为 250 nm，芍药苷的检测波长为 230 nm，斯皮诺素、阿魏酸、山柰素的检测波长为 330 nm，大黄素的检测波长为 254 nm，细叶远志皂苷与 23-乙酰泽泻醇 B 的检测波长为 210 nm。由于各个化学成分的极性差异比较大，本实验采用梯度洗脱的方式来保证各个成分能得到有效分离，同时筛选了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-甲酸水、乙腈-甲酸水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水、甲醇-乙腈-磷酸水等多个流动相体系；多个型号的 C₁₈ 色谱柱，最终确定了本实验中的色谱条件。本法快速、灵敏度高、准确度高、专属性好，为心脑康片的质量控制提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 徐广侠. HPLC 法测定心脑康片中葛根素的含量 [J]. 中国医药指南, 2011, 32(9): 52-53.

- [3] 石 伟, 李家春, 刘汉清, 等. 基于多成分定量测定的六味地黄浓缩丸质量分析 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1002-1006.
- [4] 刘 廷, 狄留庆, 彭琳秀, 等. UPLC-MS/MS 同时测定双黄连口服液 17 种有效成分 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3357-3363.
- [5] 谭静玲, 丁晓萍, 聂 晶, 等. 一清片多成分、多指标质量控制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(11): 976-980.
- [6] 白 荣. HPLC 法测定三才封髓丸中地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(11): 1324-1327.
- [7] 吴 茵, 穆 华, 刘 勇, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定玄麦甘桔颗粒中 8 种有效成分 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3034-3038.
- [8] 方 昱, 万丽丽, 朱金辉, 等. HPLC-MS/MS 测定同济 2 号颗粒剂中黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和三七皂苷 R₁ [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 394-397.
- [9] 陈海燕, 李 冰. 高效液相色谱法测定鼻咽清毒剂中 4 种活性成分的含量 [J]. 中南药学, 2015, 13(3): 303-306.