

HPLC 法测定心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A

孙 辉¹, 何胜利^{2*}

1. 南阳市中心医院, 河南 南阳 473009
2. 遂成药业股份有限公司, 河南 新郑 451150

摘要: **目的** 建立高效液相色谱梯度洗脱法同时测定心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的方法。**方法** 采用 Hydrosphere C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 甲醇-乙腈 (2:1), 流动相 B: 0.2%冰醋酸溶液, 梯度洗脱 (0~11 min, 45.0% A; 11~26 min, 45.0%→68.0% A; 26~39 min, 68.0%→82.0% A; 39~45 min, 82.0%→45.0% A); 检测波长: 280 nm; 体积流量: 0.9 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量为 10 μL。**结果** 洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的线性范围分别为 2.08~41.60 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 3.36~67.20 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 4.29~85.80 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 6.26~125.20 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 3.49~69.80 μg/mL ($r=0.999\ 2$), 49.08~981.60 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 7.17~143.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$); 平均加样回收率分别为 96.81%、98.19%、99.24%、98.93%、97.39%、100.19%、98.63%, RSD 值分别为 1.51%、1.24%、0.98%、1.12%、0.84%、0.74%、1.44%。**结论** 建立的 HPLC 梯度洗脱法同时测定心无忧片中心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 7 个成分的测定方法, 供试品溶液处理简便, 溶液稳定性好, 检测方法快捷、准确、灵敏度高, 为心无忧片质量标准的提高提供了参考。

关键词: 心无忧片; 洋川芎内酯 H; 洋川芎内酯 I; 洋川芎内酯 A; 藁本内酯; 丹参素; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)03-0464-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.03.004

Determination of senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, ligustilide, danshensu, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Xinwuyou Tablets by HPLC

SUN Hui¹, HE Sheng-li²

1. Nanyang City Center Hospital, Nanyang 473009, China
2. Suicheng Pharmaceutical Co., Ltd, Xinzheng 451150, China

Abstract: Objective To develop HPLC gradient elution method for simultaneous determination of senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, ligustilide, danshensu, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Xinwuyou Tablets. **Methods** The determination was carried out on Hydrosphere C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-acetonitrile (2 : 1) and 0.2% acetic acid glacial solution with gradient elution. The elution procedures were as following: 0—11 min with 45.0% A, 11—26 min with 45.0%→68.0% A, 26—39 min with 68.0%→82.0% A, and 39—45 min with 82.0%→45.0% A. The detection wavelengths were set at 280 nm. The flow rate was 0.9 mL/min, temperature of column was set at 30 °C, and volume of injection was 10 μL. **Results** Senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, ligustilide, danshensu, salvianolic acid B, and tanshinone II_A had good linearities in the range of 2.08—41.60 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 3.36—67.20 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 4.29—85.80 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 6.26—125.20 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 3.49—69.80 μg/mL ($r=0.999\ 2$), 49.08—981.60 μg/mL ($r=0.999\ 7$), and 7.17—143.40 μg/mL ($r=0.999\ 5$), respectively. The average recoveries were 96.81%, 98.19%, 99.24%, 98.93%, 97.39%, 100.19%, and 98.63%, respectively. And the corresponding RSD values were 1.51%, 1.24%, 0.98%, 1.12%, 0.84%, 0.74%, and 1.44%, respectively. **Conclusion** The established method of HPLC gradient elution method for simultaneous determination of senkyunolide H, senkyunolide

收稿日期: 2017-12-17

作者简介: 孙 辉, 男, 河南南阳人, 主治医师, 本科, 研究方向急危重症疾病的治疗。Tel: 13703770826 E-mail: sunhui666@126.com

*通信作者 何胜利 (1981—), 男, 工程师, 本科, 主要从事药物制剂及质量标准研究。Tel: 13803995445 E-mail: scyy_hcli@yahoo.com

I, senkyunolide A, ligustilide, danshensu, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Xinwuyou Tablets is simple for the solution treatment, stable for the solution, and fast for the detection method. The method is accurate and sensitive which can be applied to reference for the quality control of Xinwuyou Tablets.

Key words: Xinwuyou Tablets; senkyunolide H; senkyunolide I; senkyunolide A; ligustilide; danshensu; salvianolic acid B; tanshinone II_A; HPLC

心无忧片由黄杨木、射干、细辛、川芎、青木香、丹参、瓜蒌皮、茵陈 8 味中药加工而成的中药复方制剂,临床上主要用于胸痛、胸闷、心悸、气短、头昏、乏力等胸痹气滞血瘀症的治疗,也可用于冠心病、心绞痛的治疗^[1-2]。心无忧片处方来源于《卫生部药品标准》中药成方制剂第 13 册^[3],方中丹参、川芎和黄杨木行气止痛、活血化瘀通络,为方中主要组分;茵陈、青木香和瓜蒌皮具有利气宽胸、祛风燥的功效,细辛和射干具有温中通阳、开窍宣痹的功效,诸药合用,共达理气活血、宽胸止痛之功效^[1, 4]。心无忧片质量标准中仅对丹参酮 II_A进行了薄层色谱鉴别研究,未对方中的任何成分进行定量测定,文献报道中也仅有对该制剂中所含丹参酮 II_A进行了定量测定^[5-6]。中药复方制剂所含成分较为复杂,单一成分难以有效控制心无忧片的质量均一性和有效性,采用高效液相色谱梯度洗脱法对中药复方制剂中多成分进行同时测定,已被广泛应用。因此本实验根据心无忧片的处方组成,选取该制剂主要药味川芎所含洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯和丹参所含丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 作为定量测定目标,对流动相体系进行不断摸索,建立了 HPLC 梯度洗脱法同时测定心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 7 个成分的方法,所建立的供试品溶液处理方法简便,溶液稳定性好,检测方法快捷,准确,灵敏度高,为心无忧片质量标准的提高提供了参考依据。

1 仪器与试药

Waters E2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);BP110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-500DE 型台式数控超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司)。

心无忧片(规格 0.25 g/片,批号 20160711、20161001、20170405)购自杭州天目山药业股份有限公司;洋川芎内酯 H(批号 94596-27-7,质量分数 97.0%)、洋川芎内酯 I(批号 94596-28-8,质量

分数 97.0%)、洋川芎内酯 A(批号 62006-39-7,质量分数 97.0%)、丹参素(22681-72-7,质量分数 98.0%)对照品购自上海纯优生物科技有限公司;藁本内酯(批号 111737-201608,质量分数 100.0%)、丹酚酸 B(批号 111562-201716,质量分数 94.1%)、丹参酮 II_A(批号 110766-201721,质量分数 99.5%)对照品购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对照品适量,用 70%甲醇制成质量浓度分别为 0.416、0.672、0.858、1.252、0.698、9.816、1.434 mg/mL 的单成分对照品贮备液;依次精密量取各对照品储备液适量,置同一量瓶中,用 70%甲醇制成洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 质量浓度分别为 10.4、16.8、42.9、62.6、34.9、490.8、71.7 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取心无忧片适量,除去糖衣后,精密称定,研成细粉(全部通过 80 目筛),取约 3.0 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 70%甲醇 40 mL,超声提取 30 min,放冷至室温,加 70%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性样品溶液的制备

按照心无忧片标准中规定的处方和制法,分别制备缺川芎、丹参的阴性样品,再按照供试品溶液的制备项下方法制成缺川芎、丹参的阴性样品溶液。

2.4 色谱条件及系统适用性试验

Hydrosphere C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A: 甲醇-乙腈(2:1),流动相 B: 0.2%冰醋酸溶液,采用梯度洗脱(0~11 min, 45.0% A; 11~26 min, 45.0%→68.0% A; 26~39 min, 68.0%→82.0% A; 39~45 min, 82.0%→45.0% A);检测波长: 280 nm^[7-9];体积流量: 0.9 mL/min;

柱温：30 ℃；进样量为 10 μL。

精密量取混合对照品溶液、心无忧片供试品溶液、缺川芎和丹参的阴性样品溶液各适量，进样测定。结果显示，阴性样品溶液对测定无干扰，理论

塔板数按照所测各色谱峰计均不低于 3 500，所测各成分洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的分离度均大于 1.5，色谱图见图 1。

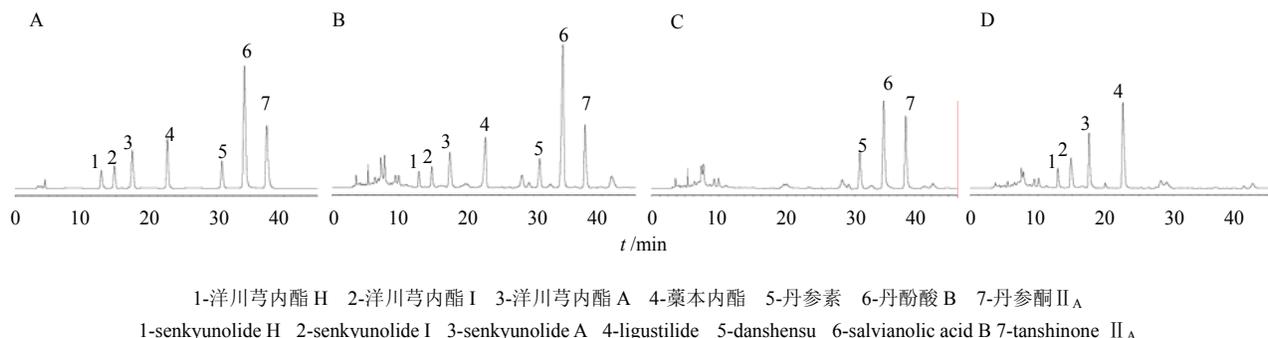


图 1 混合对照品 (A)、心无忧片 (B)、缺川芎阴性样品 (C) 和缺丹参阴性样品 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance (A), Xinwuyou Tablets (B), negative sample without *Chuanxiong Rhizoma* (C), and negative sample without *Salviae Miltiorrhizae Radix* (D)

2.5 线性范围考察

分别精密吸取对照品储备液各 2.5 mL，置于 20 mL 量瓶中，用 70% 甲醇稀释至刻度，制成混合对照品溶液 I。精密吸取混合对照品溶液 I 各适量，用 70% 甲醇分别稀释 5、10、15、20、25 倍，依次

制成混合对照品溶液 II、III、IV、V、VI，依法进样，测定洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的峰面积。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，得线性方程，结果见表 1。

表 1 线性方程、相关系数和线性范围

Table 1 Linear equation, correlation coefficient, and linear range

成分	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
洋川芎内酯 H	$Y=7.0641 \times 10^5 X-426.0$	0.999 3	2.08~41.60
洋川芎内酯 I	$Y=5.9733 \times 10^5 X+291.7$	0.999 8	3.36~67.20
洋川芎内酯 A	$Y=6.3876 \times 10^5 X+166.2$	0.999 9	4.29~85.80
藁本内酯	$Y=7.3946 \times 10^5 X-470.8$	0.999 6	6.26~125.20
丹参素	$Y=3.9572 \times 10^5 X-321.9$	0.999 2	3.49~69.80
丹酚酸 B	$Y=4.3594 \times 10^5 X-282.5$	0.999 7	49.08~981.60
丹参酮 II _A	$Y=9.3574 \times 10^5 X+337.4$	0.999 5	7.17~143.40

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液，连续进样 6 次，测定并记录洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的峰面积，结果所测各成分峰面积的 RSD 值分别为 1.16%、1.08%、0.93%、0.88%、1.06%、0.57%、0.76%。

2.7 重复性试验

取心无忧片样品 (批号 20160711) 6 份，制备供试品溶液，依法进样测定，记录洋川芎内酯 H、

洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的峰面积，计算所测各成分的质量分数，结果所测各成分质量分数的 RSD 值分别为 1.35%、0.78%、1.19%、0.95%、1.47%、0.84%、1.10%。

2.8 稳定性试验

取心无忧片样品 (批号 20160711)，制备供试品溶液，于室温下 0、2、4、6、8、16、24 h 分别依法进样测定，记录洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、

洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的峰面积, 结果心无忧片供试品溶液在室温下 24 h 稳定, 所测各成分峰面积的 RSD 值分别为 1.20%、1.07%、0.87%、0.85%、1.12%、0.60%、0.74%。

2.9 加样回收率试验

取心无忧片样品(批号 20160711) 6 份, 除去糖衣后, 研成细粉(全部通过 80 目筛), 每份约 1.5 g, 精密称定, 分别精密加入 0.293 mg/mL 洋川芎内酯 H 对照品溶液 1.0 mL、0.479 mg/mL 洋川芎内酯 I 对照品溶液 1.0 mL、1.267 mg/mL 洋川芎内酯 A 对照品溶液 1.0 mL、1.691 mg/mL 藁本内酯对照品溶液 1.0 mL、0.974 mg/mL 丹参素对照品溶液 1.0 mL、3.696 mg/mL 丹酚酸 B 对照品溶液 4.0 mL、1.942

mg/mL 丹参酮 II_A 对照品溶液 1.0 mL, 制备供试品溶液, 依法进样测定, 计算得洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的平均加样回收率分别为 96.81%、98.19%、99.24%、98.93%、97.39%、100.19%、98.63%, RSD 值分别为 1.51%、1.24%、0.98%、1.12%、0.84%、0.74%、1.44%。

2.10 样品测定

取批号分别为 20160711、20161001、20170405 心无忧片样品, 制备供试品溶液, 依法进样, 测定洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的峰面积, 采用外标法计算所测各成分的质量分数, 结果见表 2。

表 2 心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的测定结果 (n=3)
Table 2 Determination of senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, ligustilide, danshensu, salvianolic acid B, and tanshinone II_A in Xinwuyou Tablets (n = 3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	洋川芎内酯 H	洋川芎内酯 I	洋川芎内酯 A	藁本内酯	丹参素	丹酚酸 B	丹参酮 II _A
20160711	0.194	0.317	0.843	1.129	0.651	9.867	1.304
20161001	0.182	0.272	0.775	1.065	0.743	10.339	1.363
20170405	0.210	0.331	0.944	1.179	0.593	9.358	1.192

3 讨论

在实验过程中, 通过对比试验对心无忧片供试品溶液制备方法进行了优化, 首先考察了不同提取溶剂 50% 甲醇、70% 甲醇^[8,10]、甲醇^[4-6]、40% 乙醇^[11]、80% 乙醇^[7] 对心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 提取率的影响, 结果以 70% 甲醇为提取溶剂时, 所测各成分的综合提取率最佳; 同时对提取方式(超声提取^[10,12]、加热回流提取^[11]) 和提取时间(20、30、40 min) 进行了对比研究, 最终优选以 70% 甲醇超声提取 30 min 作为心无忧片供试品溶液的制备方法。

在实验过程中, 参考相关文献首先对比考察了甲醇-水流动相系统^[5]、乙腈-水流动相系统、甲醇-乙腈(2:1) 与水流动相系统^[11], 以所测各成分洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 的峰形、分离效果、色谱峰基线平稳等为考察指标, 结果甲醇-乙腈(2:1) 与水流动相系统优于甲醇-水

流动相系统和乙腈-水流动相系统, 但所测成分洋川芎内酯 H、丹酚酸 B 峰形不对称, 存在拖尾现象, 洋川芎内酯 A 分离效果欠佳; 在此基础上, 在流动相中加入适量酸(0.2% 冰醋酸溶液^[12]、0.1% 磷酸溶液^[4]、0.1% 甲酸溶液^[8]), 通过对比试验和不断摸索, 最终选取以甲醇-乙腈(2:1) 与 0.2% 冰醋酸溶液为流动相, 对心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 进行梯度洗脱, 此条件下所记录色谱峰基线平稳, 所测各成分峰形对称, 分离度符合规定要求。

本实验建立的 HPLC 梯度洗脱法同时测定心无忧片中心无忧片中洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、藁本内酯、丹参素、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 7 个成分的测定方法, 供试品溶液处理简便, 溶液稳定性好, 检测方法快捷、准确、灵敏度高, 为心无忧片质量标准的提高提供了参考。

参考文献

[1] 邵友凤. 心无忧片治冠心病心绞痛 42 例 [J]. 江西中医

- 学院学报, 2009, 12(3): 18-19.
- [2] 李剑平, 范小芬. 心无忧片治疗冠心病心绞痛 40 例观察—附复方丹参片治疗 40 例对照 [J]. 浙江中医杂志, 2001, 36(5): 230.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准 (中药成方制剂第十三册) [S]. 1997: 46.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 40-41, 76-77.
- [5] 满喜霞, 黄占海. HPLC 测定心无忧片中丹参酮 II_A 的含量 [J]. 海峡药学, 2010, 22(7): 65-67.
- [6] 龚青. 高效液相色谱法测定心无忧片中丹参酮 II_A 的含量 [J]. 中国现代应用药杂志, 2003, 20(7): 51-52.
- [7] 曹建敏, 王宗花, 丁明玉, 等. 反相高效液相色谱法同时测定川芎中的四种内酯类化合物 [J]. 色谱, 2005, 23(5): 531-533.
- [8] 翟学佳, 徐锦凤. 高效液相色谱法同时测定丹参药材水溶性和脂溶性成分的含量 [J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1345-1348.
- [9] 程沛, 韩东岐, 胡伟慧, 等. 高效液相色谱法同时测定丹参中 10 种水溶性和 4 种脂溶性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 991-996.
- [10] 周国军, 李焱, 秦民坚, 等. 高效液相色谱法快速测定丹参中 5 种活性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1357-1361.
- [11] 刘金亮, 范巧佳, 郑顺林, 等. HPLC 测定不同采收期川芎药材中 5 种药效成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1650-1655.
- [12] 刘洁, 余李敏, 翟帆. 高效液相色谱-质谱法同时测定川芎提取液中 7 种有效成分 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1380-1382.