

HPLC 法测定活力苏口服液中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷

段光霞¹, 牛小萍², 程红杰³

1. 郑州颐和医院 药学部, 河南 郑州 450047

2. 郑州大学第五附属医院 药学部, 河南 郑州 450006

3. 安阳市食品药品检验检测中心, 河南 安阳 455000

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定活力苏口服液中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷。**方法** 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。**结果** 迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷分别在 0.59~14.75、0.81~20.25、5.07~126.75、1.86~46.50、1.18~29.50、8.79~219.75、2.07~51.75 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.999 1$); 各成分平均加样回收率分别为 96.95%、97.80%、99.43%、98.53%、99.19%、100.01%、98.77%, RSD 值分别为 1.13%、1.28%、0.91%、0.88%、0.97%、0.62%、1.33%。**结论** 所建立的方法操作便捷, 结果准确, 为全面评价活力苏口服液的内在产品质量提供了科学依据。

关键词: 活力苏口服液; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 二苯乙烯苷; 虎杖苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)10-1950-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.10.003

Determination of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, icariin, baohuoside I, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and polydatin in Huolisu Oral Liquid by HPLC

DUAN Guang-xia¹, NIU Xiao-ping², CHENG Hong-jie³

1. Department of Pharmacy, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou 450047, China

2. Department of Pharmacy, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450006, China

3. Anyang Center for Food and Drug Control, Anyang 455000, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, icariin, baohuoside I, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside and polydatin in Huolisu Oral Liquid. **Methods** Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for the separation. The mobile phase was consisted of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength were set at 280 nm. **Results** Rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, icariin, baohuoside I, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside and polydatin had good linear relationships in the ranges of 0.59 — 14.75, 0.81 — 20.25, 5.07 — 126.75, 1.86 — 46.50, 1.18 — 29.50, 8.79 — 219.75, and 2.07 — 51.75 μg/mL ($r \geq 0.999 1$). The average recoveries of components were 96.95%, 97.80%, 99.43%, 98.53%, 99.19%, 100.01%, and 98.77% with the RSD values of 1.13%, 1.28%, 0.91%, 0.88%, 0.97%, 0.62%, and 1.33%, respectively. **Conclusion** The established method is convenient and accurate, which provides a scientific basis for the comprehensive evaluation of product quality of Huolisu Oral Liquid.

Key words: Huolisu Oral Liquid; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B; icariin; baohuoside I; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside; polydatin

活力苏口服液由丹参、淫羊藿、制何首乌、黄血、滋养肝肾的功效, 临床上主要用于年老体弱、精神萎靡、失眠健忘、眼花耳聋、脱发或头发早白

收稿日期: 2020-09-18

作者简介: 段光霞, 女, 副主任药师, 本科, 研究方向为药学。E-mail: fh354876@sina.cn

等病症属气血不足、肝肾亏虚患者的治疗^[1-2]。研究表明,活力苏口服液抗衰老^[2],可改善肝肾精血亏虚型神经衰弱^[3]、治疗抑郁症^[4]和斑秃^[5-6],还可用于顽固性失眠、中老年失眠^[7-9]、脂溢性脱发^[10]、老年糖尿病骨质疏松^[11]。活力苏口服液现收载于《中国药典》2015 年版一部,标准中仅对该制剂所含淫羊藿苷进行定量检测^[1],难以全面反映活力苏口服液的整体质量。本实验采用高效液相色谱法对活力苏口服液中主要成分迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷进行同时检测,建立该制剂中多指标成分质量控制模式,有利于药品生产企业不断优化制剂生产过程控制参数,完善制剂生产所用原药材的质量控制,从源头上和生产过程中确保活力苏口服液产品质量和临床疗效的一致性,为进一步科学全面评价活力苏口服液的整体质量提供数据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);ME36S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

丹酚酸 B(批号 111562-201917)、迷迭香酸(批号 111871-201706)、淫羊藿苷(批号 110737-201516)、宝藿苷 I(批号 111852-201603)、二苯乙烯苷(批号 110844-201915)和虎杖苷(批号 111575-201603)对照品均来源于中国食品药品检定研究院;紫草酸(批号 PRF8060642)对照品来源于成都普瑞法科技开发有限公司;乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯;活力苏口服液购于成都地奥集团天府药业股份有限公司,规格 10 mL/支,批号 191105、191207、191213。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品储备液的制备 精密称取迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷对照品各适量,用 75%甲醇溶液制成质量浓度分别为 0.118、0.162、1.014、0.372、0.236、1.758、0.414 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密量取混合对照品储备液 2.5 mL,用 75%甲醇溶液稀释至 50 mL,制成混合对照品溶液(含迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷 5.9、8.1、50.7、18.6、111.8、87.9、20.7 $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.3 供试品溶液和阴性样品溶液的制备 取活

力苏口服液样品适量,精密量取 0.6 mL,置 25 mL 量瓶中,用 75%甲醇溶液稀释至刻度,即得。按活力苏口服液质量标准项下处方比例和工艺,分别制备缺丹参、缺淫羊藿、缺制何首乌的阴性样品,再按上述方法制成阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈, B 为 0.1%磷酸溶液,梯度洗脱(0~10 min, 26% A; 10~21 min, 26% $\rightarrow$ 34% A; 21~35 min, 34% $\rightarrow$ 47% A; 35~46 min, 47% $\rightarrow$ 52% A; 46~55 min, 52% $\rightarrow$ 26% A),检测波长 280 nm^[12-16],体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。

2.3 方法学考察

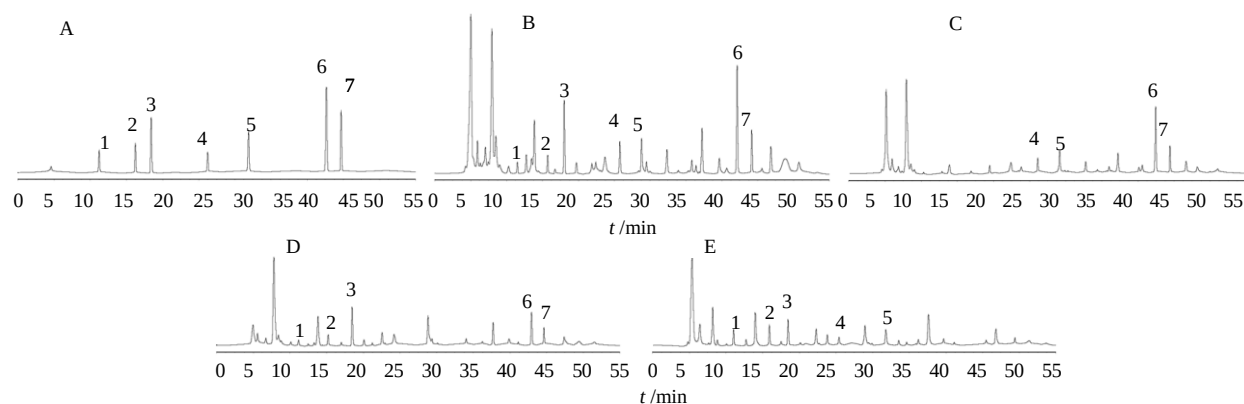
2.3.1 专属性试验 分别精密吸取各溶液各 10 μL ,依法进样测定,结果 7 种目标成分迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷峰形对称,分离度均 >1.5 ,理论塔板数按各成分色谱峰计均 $\geq 4\,500$,阴性样品对活力苏口服液中化合物的测定无干扰,色谱图见图 1。

2.3.2 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别用 75%甲醇溶液定容至 20 mL,制成系列质量浓度的混合对照品溶液,进样测定,记录峰面积。以峰面积与质量浓度进行回归,得回归方程,见表 1。

2.3.3 精密度试验 取混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定峰面积,计算得迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷峰面积的 RSD 值分别为 1.05%、0.98%、0.72%、0.93%、0.76%、0.55%、0.89%。

2.3.4 重复性试验 取批号 191105 活力苏口服液样品 6 份,制备供试品溶液,依法进样测定,记录迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷的峰面积,计算 7 种成分的质量浓度,结果其 RSD 值分别为 1.81%、1.74%、0.97%、1.39%、1.52%、0.93%、1.40%。

2.3.5 稳定性试验 取批号 191105 活力苏口服液样品,制备供试品溶液,于 0、3、6、12、18、24 h 依法进样,测定峰面积值,结果迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷峰面积的 RSD 值分别为 1.08%、1.01%、0.69%、0.88%、0.86%、0.57%、0.94%,表明活力苏口服液供试品溶液 24 h 内稳定。



1-迷迭香酸 2-紫草酸 3-丹酚酸 B 4-淫羊藿苷 5-宝藿苷 I 6-二苯乙烯苷 7-虎杖苷

1-rosmarinic acid 2-lithospermic acid 3-salvianolic acid B 4-icariin 5-baohuoside I 6-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D- glucoside 7-polydatin

图 1 混合对照品 (A)、活力苏口服液 (B)、缺丹参阴性样品 (C)、缺淫羊藿阴性样品 (D) 和缺制何首乌阴性样品 (E) 的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Huolisu Oral Liquid (B), negative sample without *Salviae Miltoprrhizae Radix et Rhizoma* (C), negative sample without *Epimedii Folium* (D), and negative sample without *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (E)

表 1 7 种成分回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of seven constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
迷迭香酸	$Y=4.564\ 8\times 10^5 X-480.7$	0.999 2	0.59~14.75
紫草酸	$Y=5.959\ 9\times 10^5 X-189.5$	0.999 7	0.81~20.25
丹酚酸 B	$Y=1.156\ 4\times 10^6 X+1\ 153.6$	0.999 3	5.07~126.75
淫羊藿苷	$Y=7.761\ 5\times 10^5 X-401.3$	0.999 6	1.86~46.50
宝藿苷 I	$Y=5.893\ 7\times 10^5 X+1\ 016.9$	0.999 1	1.18~29.50
二苯乙烯苷	$Y=1.273\ 0\times 10^6 X-925.5$	0.999 7	8.79~219.75
虎杖苷	$Y=9.107\ 3\times 10^5 X-232.2$	0.999 5	2.07~51.75

2.3.6 回收率试验 取批号 191105 活力苏口服液样品 9 份, 每份精密量取 0.3 mL, 分别精密加入混合对照品溶液 (含迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷、虎杖苷 0.043、0.057、0.389、0.131、0.083、0.648、0.139 mg/mL) 1.0、2.0、3.0 mL 各 3 份, 制备供试品溶液, 进行测定, 计算得迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷的平均加样回收率分别为 96.95%、97.80%、99.43%、98.53%、99.19%、100.01%、98.77%, RSD 值分别为 1.13%、1.28%、0.91%、0.88%、0.97%、0.62%、1.33%。

2.4 样品测定

取 3 批活力苏口服液样品, 每批平行制备 3 份供试品溶液, 依法进样测定迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖

苷的峰面积, 采用外标法计算 7 种成分的质量浓度, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测指标的选择

活力苏口服液由丹参、淫羊藿、制何首乌、黄精、黄芪和枸杞子 6 味中药组成。方中制何首乌补肝肾、益精血、乌须发, 为君药; 淫羊藿补肾阳、强筋骨, 助阳益精, 为臣药; 丹参活血凉血、清心除烦, 黄精补气养阴、健脾益肾, 枸杞子滋补肝肾、益精明目, 黄芪补气升阳、生津养血, 合为佐使药。全方共奏益气补血、滋养肝肾之功效。本实验选取制何首乌中活性成分二苯乙烯苷和虎杖苷, 淫羊藿所含特征成分淫羊藿苷、宝藿苷 I, 丹参中活性成分迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 为检测指标, 为更加全面地评价活力苏口服液整体质量提供参考。

表 2 活力苏口服液中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷的测定结果 ($n=3$)Table 2 Determination of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, icariin, baohuoside I, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, and polydatin in Huolisu Oral Liquid ($n=3$)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)						
	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	淫羊藿苷	宝藿苷 I	二苯乙烯苷	虎杖苷
191105	0.285	0.372	2.594	0.891	0.536	4.314	0.923
191207	0.244	0.416	2.361	0.792	0.462	4.948	1.056
191213	0.313	0.329	2.975	1.005	0.615	3.917	0.799

3.2 色谱条件的优化

本实验在优化考察色谱条件时,参考相关文献首先采用乙腈-水为流动相进行梯度洗脱检测,结果部分色谱峰出现拖尾现象,造成待测目标成分分离不完全,影响测定结果。考虑加入酸类溶液加以改善,遂又对乙腈-0.1%磷酸^[12-14]、乙腈-0.1%甲酸^[17]和乙腈-0.1%冰醋酸^[18-19]进行对比,最终以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相,进行梯度洗脱时,基线平稳,各目标成分分离度良好,峰形对称。

本实验采用高效液相色谱法对活力苏口服液中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、淫羊藿苷、宝藿苷 I、二苯乙烯苷和虎杖苷进行同时测定,建立了活力苏口服液中多指标成分质量评价模式,所建立的方法操作便捷,结果准确,为全面评价活力苏口服液的内在产品质量提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 1291-1292.
- [2] 林欣,谭喜莹,郑玉姣. 活力苏口服液对自然衰老小鼠肝、脑、肾组织 p16 基因表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(2): 142-143, 226.
- [3] 顾耘,潘露茜,郑舜华,等. 活力苏口服液治疗肝肾精血亏虚型神经症(神经衰弱)临床研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2005, 28(1): 10-12.
- [4] 谢姗姗,宁征远,陈亚青,等. 活力苏口服液联合阿戈美拉汀治疗老年抑郁症的临床疗效 [J]. 山西医药杂志, 2018, 47(3): 325-327.
- [5] 张春华. 活力苏口服液联合卤米松乳膏治疗斑秃的临床观察 [J]. 中国医学创新, 2011, 8(36): 37-38.
- [6] 葛进满,高尚璞. 活力苏口服液联合复方甘草酸苷片治疗斑秃的疗效及对血清 IFN- γ 和 IL-4 的影响 [J]. 现代实用医学, 2018, 30(9): 1219-1221.
- [7] 李建新,范焕芳,潘丽敏. 活力苏口服液联合乌灵胶囊对顽固性失眠 40 例疗效观察 [J]. 临床荟萃, 2009,

24(18): 1634-1635.

- [8] 詹淑琴,王玉平,高利,等. 活力苏口服液治疗失眠的疗效观察 [J]. 北京中医药, 2008, 27(10): 789-790.
- [9] 李亚玲,李俊,叶云. 活力苏和艾司唑仑治疗中老年失眠症的临床疗效对比 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(10): 2145-2146.
- [10] 栾立云,朱黎明,李英,等. 活力苏口服液联合中药外洗治疗脂溢性脱发 20 例临床观察 [J]. 河北中医, 2013, 35(11): 1685-1686.
- [11] 崔春便,张会凯,程华. 活力苏口服液辅助伊班膦酸钠治疗气血亏虚型老年骨质疏松症的临床观察 [J]. 医学理论与实践, 2017, 30(4): 536-538.
- [12] 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.
- [13] 骆媛,潘娉婷,章建华,等. HPLC 法同时测定丹参-当归药对中 7 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1689-1696.
- [14] 冯伟红,李春,张锴镔,等. “一测多评”模式在淫羊藿药材、饮片及含淫羊藿中成药黄酮类成分检测中的一体化研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2843-2854.
- [15] 徐向红,平欲晖,谢一辉. 制何首乌中四个有效成分含量的高效液相色谱法测定 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 58-59.
- [16] 李安平,杨锡,丁永辉,等. 一测多评 HPLC 法测定丹参注射液中 7 个水溶性成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1534-1540.
- [17] 罗益远,刘娟秀,刘廷,等. UPLC-MS/MS 法同时测定何首乌中二苯乙烯、蒽醌、黄酮及酚酸类成分 [J]. 质谱学报, 2016, 37(4): 327-335.
- [18] 邢婧,任红,汪轩,等. HPLC 法同时测定淫羊藿-川芎药对 8 种化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 960-965.
- [19] 付卫华. HPLC 法测定何首乌炮制过程中主要化学成分含量 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(7): 50-51.