

HPLC 法测定软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷

马伟国¹, 马灵珍²

1. 新密市中医院 药剂科, 河南 郑州 452370

2. 亳州职业技术学院 药学院, 安徽 亳州 236800

摘要: **目的** 建立 HPLC 法测定软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷。**方法** 采用 Venusil XBP C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 检测波长分别为 330 nm (0~17 min 检测毛蕊花糖苷和焦地黄苯乙醇苷 B1)、280 nm (17~50 min 检测迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。**结果** 毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷分别在 1.23~30.75、0.59~14.75、0.71~17.75、1.47~36.75、9.78~244.50、6.57~164.25、1.19~29.75 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.999 1$); 平均回收率分别为 99.14%、97.62%、96.84%、98.96%、100.11%、99.46%、98.92%, RSD 值分别为 1.15%、1.27%、1.02%、0.96%、0.65%、1.41%、0.87%。**结论** 该方法操作简便、重复性好, 为软脉灵口服液中多指标质量评价和临床应用提供参考依据。

关键词: 软脉灵口服液; 毛蕊花糖苷; 焦地黄苯乙醇苷 B1; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷; 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)12-2321-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.12.006

Determination of verbascoside, jionoside B1, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and polydatin in Ruanmailing Oral Liquid by HPLC

MA Wei-guo¹, MA Ling-zhen²

1. Department of Pharmacy, Xinmi Hospital of TCM, Zhengzhou 452370, China

2. School of Pharmacy, Bozhou Vocational and Technical College, Bozhou 236800, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of verbascoside, jionoside B1, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and polydatin in Ruanmailing Oral Liquid. **Methods** Venusil XBP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile - 0.1% formic acid as mobile phase with gradient elution. The detection wavelength were set at 330 nm (for verbascoside and jionoside B1) and 280 nm (for rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and polydatin). The column temperature was 30 °C, flow rate was set at 1.0 mL/min, and volume was 10 μL. **Results** Verbascoside, jionoside B1, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and polydatin showed good linear relationships within the ranges of 1.23 — 30.75, 0.59 — 14.75, 0.71 — 17.75, 1.47 — 36.75, 9.78 — 244.50, 6.57 — 164.25, and 1.19 — 29.75 μg/mL ($r \geq 0.999 1$). The average recoveries of those components were 99.14%, 97.62%, 96.84%, 98.96%, 100.11%, 99.46%, and 98.92% with the RSD values of 1.15%, 1.27%, 1.02%, 0.96%, 0.65%, 1.41%, and 0.87%, respectively. **Conclusion** The method is simple and repeatable, which provides reference for the quality evaluation and clinical application of Ruanmailing Oral Liquid.

Key words: Ruanmailing Oral Liquid; verbascoside; jionoside B1; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside; polydatin; HPLC

收稿日期: 2020-11-14

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究项目 (KJ2017A770)

作者简介: 马伟国 (1962—), 男, 副主任中药师, 主要从事中药质量控制和临床应用工作。E-mail: zrvung861@163.com

软脉灵口服液现收载于《中国药典》2020年版一部^[1],由熟地黄、丹参、制何首乌、当归、炙黄芪等16味药材加工而成,临床上用于肝肾阴虚、气虚血瘀所致的头晕、失眠、胸闷、胸痛、心悸、乏力等症的治疗,亦可用于早期脑动脉硬化、冠心病、心肌炎、中风后遗症出现上述证候的治疗。现有质量标准^[1]和文献报道^[2-3]的单一成分质量控制模式不能准确反映产品的整体质量,同时中药材质量受其种属、产地、采收季节、加工储存方法等因素的直接影响,难以确保药品质量和临床疗效的一致性,给临床合理用药带来困扰,严重限制了中医药国际化的进展。中药质量标志物依据中药属性、制造过程以及配伍理论等特点,从中药方剂整体研究体系出发^[4-5],采取以君药所含成分为首选,同时兼顾臣、佐、使药所含成分,有效地促进了中药及其制剂的整体质量控制。本实验根据中医药配伍理论、参考中药质量标志物确认原则,采用HPLC法对君药熟地黄中主要活性成分毛蕊花糖苷和焦地黄苯乙醇苷B1,臣药制何首乌代表性成分2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷以及佐药丹参中主要药效成分迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸B进行同时测定,建立软脉灵口服液中多指标成分质量评价方法。

1 试药与仪器

毛蕊花糖苷、迷迭香酸、丹酚酸B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品均购于中国食品药品检定研究院,批号分别为111530-201914、111871-201706、111562-201917、110844-201915,质量分数分别为95.2%、90.5%、96.6%、90.7%;焦地黄苯乙醇苷B1、紫草酸对照品购于成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为PRF7041822、PRF8060642,质量分数分别为98.0%、98.9%;虎杖苷对照品购于上海同田生物技术股份有限公司,批号为18011741,质量分数为97.8%;软脉灵口服液购于水仙药业(建瓯)股份有限公司,规格10 mL/支,批号分别为20190703、20190801、20191104;乙腈购于德国Merck公司,为色谱纯,其余试剂为分析纯。Waters Alliance e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);BT125D型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷B1、迷

迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷对照品各适量,用75%甲醇制成质量浓度分别为0.246、0.118、0.142、0.294、1.956、1.314、0.238 mg/mL的混合对照品贮备液。精密吸取上述贮备液0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,用75%甲醇稀释至20 mL,制成6个质量浓度的线性考察混合对照品溶液。取中间质量浓度的线性考察混合对照品溶液作为混合对照品溶液(毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷的质量浓度分别为12.3、5.9、7.1、14.7、97.8、65.7、11.9 μ g/mL)。

2.2 供试品溶液的制备

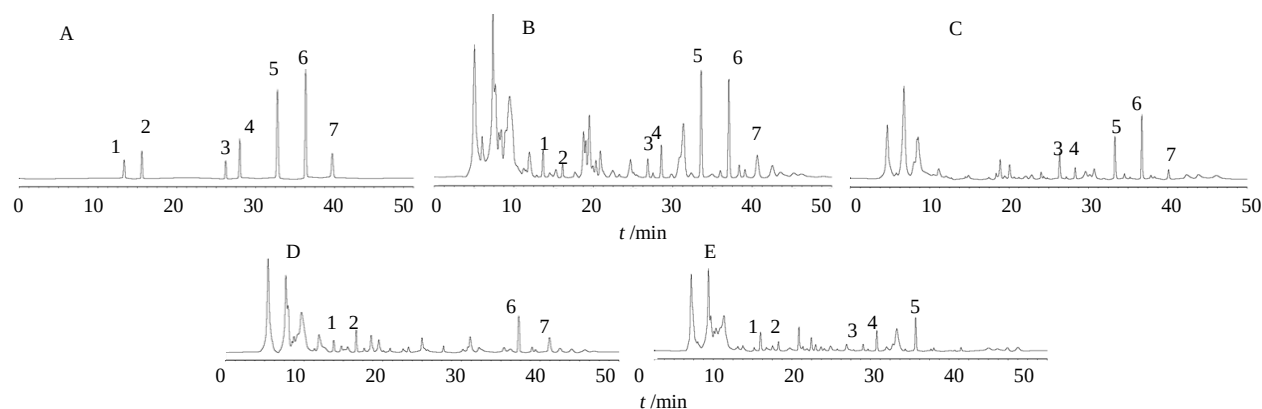
精密量取软脉灵口服液2.0 mL,用75%甲醇稀释至25 mL,摇匀,滤过,即得。取按软脉灵口服液质量标准项下制法和处方比例制得的缺熟地黄、缺丹参和缺制何首乌的阴性样品适量,按上述方法制成阴性供试品溶液。

2.3 色谱条件

采用Venusil XBP C₁₈色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~11 min, 16.0% A; 11~17 min, 16.0% $\rightarrow$ 28.0% A; 17~35 min, 28.0% $\rightarrow$ 41.0% A; 35~43 min, 41.0% $\rightarrow$ 52.0% A; 43~50 min, 52.0% $\rightarrow$ 16.0% A);检测波长分别为330 nm(0~17 min 检测毛蕊花糖苷和焦地黄苯乙醇苷B1)^[6-7]、280 nm(17~50 min 检测迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷)^[8-12];体积流量1.0 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;进样量10 μ L。

2.4 系统适用性试验

精密吸取软脉灵口服液供试品溶液、阴性供试品溶液和混合对照品溶液各10 μ L,在上述色谱条件下进样分析,结果软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷能够达到有效分离(分离度均大于1.5);待测成分色谱峰峰形对称,拖尾因子符合规定要求;阴性供试品对软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷的同时测定无干扰;理论塔板数按各目标化合物色谱峰计均 $\geq$ 3 500。见图1。



1-毛蕊花糖苷 2-焦地黄苯乙醇苷 B1 3-迷迭香酸 4-紫草酸 5-丹酚酸 B 6-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 7-虎杖苷
1-verbascoside 2-jionoside B1 3-rosmarinic acid 4-lithospermic acid 5-salvianolic acid B 6-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside
7-polydatin

图 1 混合对照品 (A)、软脉灵口服液 (B)、熟地黄阴性供试品 (C)、丹参阴性供试品 (D)、制何首乌阴性供试品 (E) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference (A), Ruanmailing Oral Liquid (B), sample without *Rehmanniae Radix Praeparata* (C), sample without *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (D), and sample without *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (E)

2.5 线性关系考察

精密吸取 6 个质量浓度的线性考察混合对照品溶液各 10 μL, 按照以上色谱条件, 依次进样测定毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草

酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷的峰面积。以各成分的质量浓度对峰面积进行线性回归, 得回归方程和线性范围, 见表 1。

表 1 各成分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation, and linear relationships of components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
毛蕊花糖苷	$Y=1.685\ 2\times 10^6 X-625.6$	0.999 9	1.23~30.75
焦地黄苯乙醇苷 B1	$Y=1.135\ 9\times 10^6 X+590.8$	0.999 6	0.59~14.75
迷迭香酸	$Y=1.402\ 7\times 10^6 X+488.5$	0.999 4	0.71~17.75
紫草酸	$Y=2.054\ 9\times 10^6 X-347.0$	0.999 7	1.47~36.75
丹酚酸 B	$Y=1.910\ 4\times 10^6 X-592.9$	0.999 1	9.78~244.50
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=2.388\ 7\times 10^6 X+1\ 005.6$	0.999 5	6.57~164.25
虎杖苷	$Y=1.533\ 9\times 10^6 X-744.2$	0.999 7	1.19~29.75

2.6 精密度试验

取同一份软脉灵口服液 (批号 20190703) 供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算得毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷峰面积的 RSD 值分别为 1.15%、1.27%、1.03%、0.99%、0.56%、0.74%、1.08%。

2.7 重复性试验

取批号 20190703 软脉灵口服液样品 6 份, 制

成供试品溶液, 依法进样分析, 计算得毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷质量浓度的 RSD 值分别为 1.71%、1.88%、1.76%、1.69%、1.25%、1.44%、1.83%。

2.8 稳定性试验

取批号 20190703 软脉灵口服液同一份供试品溶液, 于 0、4、8、12、16、20、24 h 各精密进样 10 μL, 考察软脉灵口服液供试品溶液的稳定性。结

果供试品溶液 24 h 内稳定,毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷峰面积的 RSD 值分别为 1.09%、1.30%、0.98%、1.01%、0.59%、0.68%、1.12%。

2.9 回收率试验

精密吸取毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷质量浓度已知的同一批软脉灵口服液(批号 20190703) 1.0 mL,取 9 份,随机分成 3 组,每组 3 份,分别精密加入混合对照品溶液(含毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、虎杖苷 0.144、0.068、0.082、0.176、1.138、0.722、0.126 mg/mL) 0.5、

1.0、1.5 mL 各 1 组,制成加样回收样品溶液,依法进样测定,计算毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷的质量浓度,用测得量与样品原有量之差除以对照品加入量计算得 7 种成分的平均加样回收率,分别为 99.14%、97.62%、96.84%、98.96%、100.11%、99.46%、98.92%,RSD 值分别为 1.15%、1.27%、1.02%、0.96%、0.65%、1.41%、0.87%。

2.10 样品测定

取软脉灵口服液样品 3 批,分别制备供试品溶液,进样测定毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷的峰面积,并采用外标法计算各成分的质量浓度,见表 2。

表 2 软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of verbascoside, jionoside B1, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and polydatin in Ruanmailing Oral Liquid (n=3)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)						
	毛蕊花糖苷	焦地黄苯乙醇苷 B1	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	虎杖苷
20190703	0.141	0.067	0.085	0.172	1.136	0.719	0.124
20190801	0.128	0.058	0.092	0.194	1.022	0.786	0.141
20191104	0.160	0.077	0.078	0.156	1.303	0.651	0.112

3 讨论

3.1 流动相的选择

在选择流动相时,对比考察了乙腈-水^[13]、甲醇-水、甲醇-0.5%醋酸溶液^[12]、乙腈-0.1%甲酸溶液^[10-11,14]、乙腈-0.2%磷酸溶液^[6-7]和乙腈-0.1%磷酸溶液^[8-9]流动相体系梯度洗脱时所记录色谱图基线分离情况,待测成分色谱峰的响应值、峰形、分离情况,结果发现乙腈-磷酸溶液体系检测时,杂质峰较多;甲醇-0.5%醋酸溶液检测时,个别色谱峰峰形变形严重,无法准确检测;甲醇-水和乙腈-水体系检测时,基线不平稳,干扰检测,而乙腈-0.1%甲酸溶液体系检测时,色谱图基线平稳,色谱峰分离效果良好,所测成分响应值较大,检测用时合理。进一步优化了有机相与水相的洗脱比例,最终确定了流动相梯度洗脱程序对软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、

紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷和虎杖苷进行同时测定。

3.2 待测成分的选择

软脉灵口服液由熟地黄、丹参、制何首乌、当归、炙黄芪等 16 味中药组成,方中熟地黄养血滋阴、补精益髓,人参大补元气、补脾益肺、生津止渴,当归补血活血、调经止痛,三者合为君药,滋补肝肾、益气滋阴、活血养血;制何首乌、五味子、枸杞子共为臣药,丹参、川芎活血祛瘀、通经止痛,炙黄芪补气行滞,牛膝补肝肾、强筋骨,茯苓健脾和中,淫羊藿补肾壮阳,白芍养血柔肝,陈皮行气调中,合为佐药;远志、柏子仁宁心安神、益智开窍,为其使药。诸药合用,共奏滋补肝肾、益气活血之功。本实验按照中医药配伍理论结合中药质量标志物确认原则,选取君药熟地黄中主要活性成分毛蕊花糖苷和焦地黄苯乙醇苷 B1,臣药制何首乌中

代表性成分 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷以及佐药丹参中主要药效成分迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸为定量控制指标成分,以期为更加全面地评价软脉灵口服液的整体质量提供参考依据。

本实验采用 HPLC 法对软脉灵口服液中毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷 B1、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷和虎杖苷进行了同时检测,建立了软脉灵口服液中多指标成分质量控制模式,为进一步提高软脉灵口服液质量控制水平提供了实验基础,通过对制剂中多种指标成分的质量控制,不断加强对原药材来源、内控质量标准的完善,最终达到产品质量和临床疗效的稳定性和一致性,为临床的合理用药提供保障。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1120-1121.
- [2] 黄以钟, 林元生. 高效液相色谱法测定软脉灵口服液中丹参素含量 [J]. 海峡药学, 2002, 14(6): 39-41.
- [3] 胡敏. 软脉灵口服液质量标准研究 [J]. 海峡药学, 2009, 21(8): 54-56.
- [4] 叶霁, 李睿旻, 曾华武, 等. 基于整体观中药质量标志物的发现及研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4529-4537.
- [5] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [6] 张文萌, 张石, 付锦楠, 等. RP-HPLC 双波长法同时测定熟地黄中 4 种成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(5): 367-372.
- [7] 张留记, 周志敏, 屠万倩, 等. HPLC 同时测定地黄中 5 种苷类成分的含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29: 87-90.
- [8] 薛静, 叶正良, 李德坤, 等. HPLC 同时测定丹参多酚酸中丹酚酸 D, 迷迭香酸, 紫草酸, 丹酚酸 B 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 70-73.
- [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] 厉瑶, 郭正泰, 龚行楚, 等. 丹参红花混煎液中丹参素, 羟基红花黄色素 A, 迷迭香酸, 紫草酸和丹酚酸 B 的 HPLC 测定方法 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1653-1656.
- [11] 曾慧婷, 沙秀秀, 朱邵晴, 等. 丹参及丹参茎叶水提物 UPLC 指纹图谱研究与丹酚酸类成分定量分析 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 602-609.
- [12] 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.
- [13] 栗力杰. HPLC 法测定何首乌中二苯乙烯苷的含量 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(18): 41-42.
- [14] 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.