

HPLC 法测定消渴平片中 5 种成分

姜 晖¹, 张丽英², 王绍志¹, 张熙洁¹, 刘晓红^{1*}

1. 河北唐山市工人医院, 河北 唐山 063000

2. 石家庄市第一医院 药学部, 河北 石家庄 050000

摘 要: **目的** 通过色谱条件的优化, 建立了一种同时测定消渴平片中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱的多指标分析方法。**方法** 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱分离柱, 流动相为乙腈 (A) - 甲醇 (B) - 0.5% H₃PO₄ 水溶液 (C), 采用梯度洗脱 (0 min: 4% A, 96% C; 7 min: 4% A, 1% B, 95% C; 20 min: 10% A, 3% B, 87% C; 30 min: 15% A, 3% B, 82% C; 45 min: 25% A, 10% B, 65% C; 60 min: 30% A, 10% B, 60% C), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 波长 280 nm (丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B)、250 nm (葛根素)、265 nm (小檗碱)。**结果** 丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱分别在 33.02~528.41、1.44~22.46、374.51~5 992.20、84.86~1 357.82、312.50~5 000.00 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率分别为 98.24% (RSD 0.26%)、98.37% (RSD 1.01%)、98.86% (RSD 0.50%)、98.93% (RSD 0.68%)、99.04% (RSD 0.29%)。**结论** 此方法分离效果好、操作简单、方便, 能达到较好地控制产品质量的目的。

关键词: 消渴平片; HPLC; 丹参素; 原儿茶醛; 丹酚酸 B; 葛根素; 盐酸小檗碱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0530-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.013

Simultaneous determination of five components in Xiaokeping Tablets by HPLC

JIANG Hui¹, ZHANG Li-ying², WANG Shao-zhi¹, ZHANG Xi-jie¹, LIU Xiao-hong¹

1. Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China

2. Department of Pharmacy, The First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective By optimizing the chromatographic conditions, to establish a method of multi-target content analysis, the components of danshensu, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B, puerarin, and berberine hydrochloride in Xiaokeping Tablets were simultaneously determined. **Methods** Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic separation column was used, mobile phase was composed of acetonitrile (A), methanol (B), and 0.5% H₃PO₄ aqueous solution (C) in a linear gradient elution mode (0 min: A 4%, C 96%; 7 min: A 4%, B 1%, C 95%; 20 min: A 10%, B 3%, C 87%; 30 min: A 15%, B 3%, C 82%; 45 min: A 25%, B 10%, C 65%; and 60 min: A 30%, B 10%, C 60%). The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was set at 30 ℃, and injection volume was 10 μL. The detection wavelength was set at 280 nm for danshensu, protocatechuic aldehyde, and salvianolic acid B, 250 nm for puerarin, and 265 nm for berberine hydrochloride. **Results** There was a good linear relationship over a range of 33.02—528.41 μg/mL for danshensu, 1.44—22.46 μg/mL for protocatechuic aldehyde, 374.51—5 992.20 μg/mL for salvianolic acid B, 84.86—1 357.82 μg/mL for puerarin, and 312.50—5 000.00 μg/mL for berberine hydrochloride, respectively. The average recovery rates were 98.24% (RSD = 0.26%), 98.37% (RSD = 1.01%), 98.86% (RSD = 0.50%), 98.93% (RSD = 0.68%), 99.04% (RSD = 0.29%), respectively. **Conclusion** The separation effect is good, the operation is simple and convenient, so as to achieve the better quality control of the products by this method.

Key words: Xiaokeping Tablets; high performance liquid chromatography; danshensu; protocatechuic aldehyde; salvianolic acid B; puerarin; berberine hydrochloride

收稿日期: 2014-09-18

基金项目: 河北省自然科学基金石药集团医药联合研究基金资助项目 (C2011105042)

作者简介: 姜 晖, 硕士研究生在读, 主管药师, 研究方向为药理学、药物分析学。Tel: (0315)3722840 E-mail: jianghui910@163.com

*通信作者 刘晓红, 教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为药理学、临床药学、药物分析学。

Tel: (0315)3722435 E-mail: 13930520000@163.com

消渴平片收载于《中国药典》2010年版一部^[1], 由人参、黄连、天花粉、天冬、黄芪、丹参、枸杞子、沙苑子、葛根、知母、五味子、五倍子12味中药组成, 具有益气养阴、清热泻火、益肾缩尿的功效, 用于治疗糖尿病。其中丹参^[2]用于胸肋胁痛、风湿痹痛、症瘕结块、疮疡肿痛、跌仆伤痛、月经不调、经闭痛经、产后瘀痛等; 葛根中的葛根素具有提高免疫力、增强心肌收缩力、保护心肌细胞、降低血压、抗血小板聚集等作用; 黄连中的小檗碱用于治疗细菌性痢疾和肠胃炎。

为了更好地评价消渴平片的质量, 本实验选取丹参^[3]、黄连及葛根中的活性成分丹参素^[4]、原儿茶醛^[5]、丹酚酸B^[6]、小檗碱^[7]和葛根素^[8], 建立了同步测定5种指标成分的分析方法。此方法分离效果好、操作简单、方便, 能达到较好控制产品质量的目的。

1 仪器与试剂

Agilent 1200系列HPLC仪, 包括G1311A-四元泵, G1322A-脱气机, G1316A-柱温箱, G1329A-自动进样器, G1315D-DAD检测器, HPLC Rev. B.0302化学工作站, 美国安捷伦公司; 摩尔纯水机细胞型1810D, 上海摩勒科学仪器有限公司; 真空抽滤泵, 大连依利特公司; Sartorius CP225D分析天平, 德国Sartorius公司; 80-2离心沉淀机, 上海手术器械厂; FS-150N数控系列超声处理器, 上海生析超声仪器有限公司; YMST-250Q索氏提取装置, 上海豫明仪器厂。

对照品均购于中国药品生物制品检定研究院, 批号分别为丹参素110855-200507(质量分数100%)、原儿茶醛110810-200205(质量分数100%)、丹酚酸B111562-201212(质量分数95.4%)、盐酸小檗碱110713-200208(质量分数98.1%)和葛根素110752-200511(质量分数100%)。消渴平片由广州白云山中一药业有限公司生产, 批号S0001、S0002、S0003、R0001、R0002、R0003, 规格0.34 g×96片/盒。

乙腈为色谱纯, 美国Fisher公司; 甲醇为色谱纯, 天津市协和昊鹏色谱科技有限公司; 磷酸溶液为分析纯, 天津市北方天医化学试剂厂; 冰乙酸为分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司; 甲酸为分析纯, 天津市博迪化工有限公司; 无水乙醇为分析纯, 天津市天大化工实验厂; 超纯水为摩尔纯水机所制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-甲醇(B)-0.5% H₃PO₄水溶液(C), 采用梯度洗脱, 0 min: 4% A, 96% C; 7 min: 4% A, 1% B, 95% C; 20 min: 10% A, 3% B, 87% C; 30 min: 15% A, 3% B, 82% C; 45 min: 25% A, 10% B, 65% C; 60 min: 30% A, 10% B, 60% C; 波长280 nm(丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B)、250 nm(葛根素)、265 nm(小檗碱), 本实验所用为二极管阵列检测器, 可以同时选择多个波长, 根据每种成分在最大吸收波长下的峰面积计算其量, 体积流量1.0 mL/min, 柱温30℃, 进样量10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定对照品丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、葛根素和盐酸小檗碱适量, 用色谱级甲醇溶解并稀释制备质量浓度分别为2 642.05、112.30、29 961.00、6 789.10、25 000.00 μg/mL的单一成分对照品储备液。精密吸取各对照品储备液1 mL置于同一容器即得混合对照品储备液I(丹参素528.41 μg/mL、原儿茶醛22.46 μg/mL、丹酚酸B5 992.20 μg/mL、葛根素1 357.82 μg/mL和盐酸小檗碱5 000.00 μg/mL), 精密吸取混合对照品储备液I 1 mL加入色谱级甲醇3 mL即得混合对照品储备液II(丹参素132.10 μg/mL、原儿茶醛5.62 μg/mL、丹酚酸B1 498.05 μg/mL、葛根素339.46 μg/mL和盐酸小檗碱1 250.00 μg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备

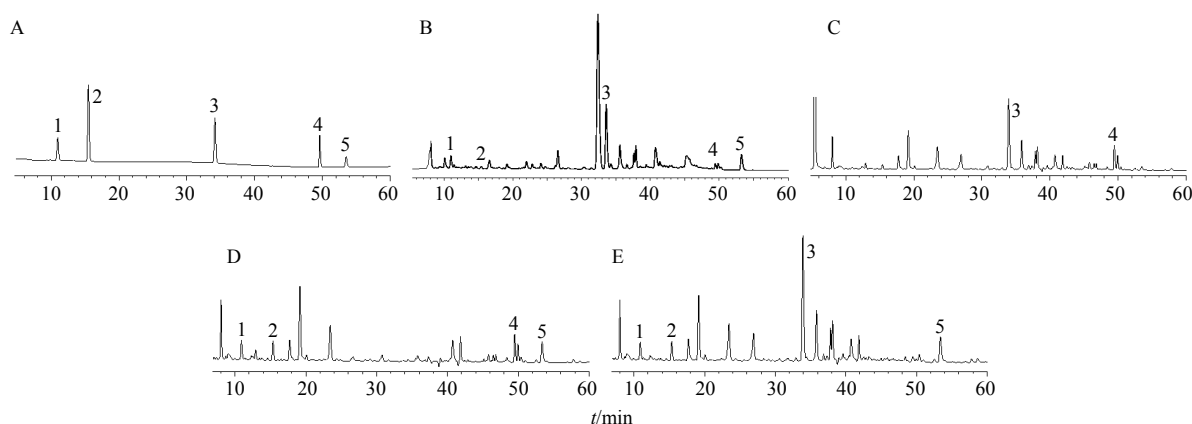
取质量差异项下的本品10片, 精密称定, 研细, 取0.4 g, 精密称定, 置10 mL量瓶中, 加超纯水溶解, 超声30 min, 静置冷却至室温后用超纯水补足容量, 离心, 0.45 μm的微孔滤膜滤过, 取续滤液即得供试品溶液。

2.4 阴性样品溶液的制备

用免煎颗粒按处方工艺制备不含丹参、葛根、黄连药材的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下的混合对照品储备液II及“2.3”、“2.4”项下溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。由图1可见, 在该色谱条件下, 消渴平片中的5种待测成分可达到基线分离,



1-丹参素 2-原儿茶醛 3-葛根素 4-盐酸小檗碱 5-丹酚酸 B
1-danshensu 2-protocatechuic aldehyde 3-puerarin 4-berberine hydrochloride 5-salvianolic acid B

图1 混合对照品 (A)、消渴平片供试品 (B) 及缺丹参 (C, 280 nm)、缺葛根 (D, 250 nm)、缺黄连 (E, 265 nm) 阴性对照品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), Xiaokeping Tablets samples (B), and negative control without *Salviae Miltiorrhizae Radix* (C, 280 nm), without *Puerariae Radix* (D, 250 nm), or without *Coptidis Rhizoma* (E, 265 nm)

分离度在相应检测波长下均大于 1.5, 理论塔板数均大于 4 000, 具有良好的分离效果。

2.6 线性关系考察

精密量取储备液 I 适量, 制备丹参素 33.02、66.05、132.10、264.20、528.41 $\mu\text{g/mL}$, 原儿茶醛 1.44、2.81、5.62、11.23、22.46 $\mu\text{g/mL}$, 丹酚酸 B 374.51、749.02、1 498.05、2 996.10、5 992.20 $\mu\text{g/mL}$, 葛根素 84.86、169.73、339.46、678.91、1 357.82 $\mu\text{g/mL}$ 和盐酸小檗碱 312.50、625.00、1 250.00、2 500.00、5 000.00 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。再分别精密吸取 10 μL 注入色谱仪, 以色谱峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性拟合。丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱的回归方程分别为 $Y=5.33X-10.82$, $r=0.9999$, 表明丹参素在 33.02~528.41 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系; $Y=31.63X+5.88$, $r=1.0000$, 表明原儿茶醛在 1.44~22.46 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系; $Y=1.08X+20.15$, $r=0.9999$, 表明丹酚酸 B 在 374.51~5 992.20 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系; $Y=41.49X-359.03$, $r=0.9999$, 表明葛根素在 84.86~1 357.82 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系; $Y=0.87X+54.60$, $r=0.9999$, 表明盐酸小檗碱在 312.50~5 000.00 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.7 检测限及定量限

精密吸取储备液 II, 采用倍比稀释的方法, 检测限按照信噪比 (S/N) 大于 3, 定量限按照 S/N 大

于 10 的要求检测。5 种成分的检测结果为丹参素检测限为 1.06 ng, 定量限为 2.12 ng; 原儿茶醛检测限为 0.10 ng, 定量限为 0.36 ng; 丹酚酸 B 检测限为 45 ng, 定量限为 150 ng; 葛根素检测限为 0.08 ng, 定量限为 0.27 ng; 盐酸小檗碱检测限为 0.05 ng, 定量限为 0.20 ng。

2.8 精密度试验

精密吸取储备液 II 10 μL , 重复进样 6 次, 测定峰面积。丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.03%、1.87%、0.73%、0.41%、0.50%, 表明仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测定峰面积。丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.73%、1.26%、0.46%、0.29%、0.98%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 重复性试验

取同一批号 (批号 S00001) 样品, 按“2.3”项方法平行制备供试品溶液 6 份, 测定峰面积, 计算质量分数。丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱质量分数的 RSD 分别为 1.07%、1.65%、1.03%、0.60%、1.57%, 表明本方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验

取已测定的样品 (批号 S00001) 6 份, 每份约 0.2 g, 分别精密加入一定量的丹参素、原儿茶醛、丹

酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱对照品,按“2.3”项方法制得供试品溶液,进行测定并计算加样回收率,结果丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱的平均回收率分别为 98.24%、98.37%、98.86%、98.93%、99.04%,RSD 分别为 0.26%、1.01%、0.50%、0.68%、0.29%。

2.12 样品定量测定

取样品 6 批(批号 S0001、S0002、S0003、R0001、R0002、R0003),每批样品取 3 份,按“2.3”项方法分别制成供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,测定峰面积,按外标法计算样品中 5 种成分的量,结果见表 1。

表 1 样品的定量测定结果 ($n=3$)
Table 1 Quantitative determination of samples ($n=3$)

批号	丹参素		原儿茶醛		丹酚酸 B		葛根素		盐酸小檗碱	
	含量/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%	含量/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%	含量/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%	含量/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%	含量/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%
S00001	1.273 8	1.44	0.036 8	1.89	19.408 7	0.24	3.507 0	1.02	9.001 3	0.40
S00002	1.228 9	1.53	0.034 2	1.55	19.335 1	0.21	3.454 6	1.06	8.949 5	0.36
S00003	1.255 4	1.63	0.035 1	1.56	19.376 9	0.17	3.439 5	0.82	8.917 0	0.32
R00001	1.261 2	2.05	0.036 5	1.90	19.362 0	0.22	3.436 8	1.43	8.943 0	0.66
R00002	1.271 8	1.65	0.036 9	1.68	19.398 4	0.16	3.445 8	0.73	8.955 1	0.57
R00003	1.244 2	1.98	0.035 6	1.77	19.359 4	0.27	3.429 3	0.72	8.911 8	0.55

3 讨论

3.1 提取方式和溶剂的选择

3.1.1 提取方法的比较 比较了索氏提取和超声提取方法,结果索氏提取的提取率与超声提取无明显的区别,但超声提取简单、方便、安全,所以采用超声提取。

3.1.2 超声提取时间的比较 按照“2.3”项下方法制备样品溶液 6 份,超声时间分别设置为 10、20、30、40、50、60 min,结果提取率相差不多,但丹参素、原儿茶醛、盐酸小檗碱在 30 min 提取率相对较大,丹酚酸 B 和葛根素在 40 min 提取率相对较大,所以采用 30 min 超声提取。

3.1.3 提取溶剂的选择 考察了 30%、50%、75%、100%甲醇及 30%甲醇-0.5%磷酸、50%甲醇-0.5%磷酸、75%甲醇-0.5%磷酸、甲醇-0.5%磷酸提取。结果 30%甲醇提取的干扰较小以及峰形也较好。

3.2 流动相的选择

流动相考察了甲醇-水、甲醇-醋酸溶液、甲醇-甲酸溶液、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液、甲醇-乙腈-磷酸溶液。结果乙腈-磷酸溶液和甲醇-乙腈-磷酸溶液对 5 种成分均有较好的分离,但考虑到乙腈的毒性和成本,故采用甲醇-乙腈-磷酸溶液。

本研究建立了同步测定消渴平片中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、葛根素和盐酸小檗碱 5 种有效成分的 HPLC 法,经实验证明该方法精密度、准确

性良好,完全符合药品检测要求,可用于消渴平片的质量监测及有关研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Zou C, Lu F H, Mao W, et al. Chinese herbal medicine Danshen formulations for preventing renal disease in Henoch-Schonlein Purpura: a systematic review and meta-analysis [J]. *Altern Complement Med*, 2012, 18(4): 394-401.
- [3] Wang X L, Zhang Z R, Fu H L, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of water-soluble and lipid-soluble components of danshen in rat plasma using HPLC-UV method [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(11): 1180-1184.
- [4] 栾晓琳, 陈 俊, 周 瑾, 等. HPLC 法同时测定丹香冠心注射液中 3 个成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(7): 1414-1416.
- [5] 施 法, 吴 怡, 王 洋. HPLC 法测定复方丹参滴丸中 7 个活性成分的含量 [J]. *中国药师*, 2013, 16(3): 339-341.
- [6] 暴风伟, 刘玉强, 胡丽萍, 等. HPLC 波长切换法同时测定丹参酚酸提取物中 5 种成分 [J]. *中成药*, 2012, 34(12): 2368-2372.
- [7] 梁玉香, 洪岩斌, 贺 玲. HPLC 法测定消渴平片中盐酸小檗碱的含量 [J]. *中国医药指南*, 2013, 11(10): 78-79.
- [8] 吴永芹, 冯 凯, 周 慧, 等. HPLC 法同时测定葛根芩连片中葛根素和黄芩苷的含量 [J]. *中国药事*, 2012, 26(3): 282-284.