

RP-HPLC 法同时测定舒胸方中 7 种有效成分

冯彬彬¹, 张建海^{1*}, 阳文武², 何世新²

1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120

2. 重庆万州食品药品检验所, 重庆 400716

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 同时测定舒胸方中盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 的方法。方法 以舒胸方为研究对象, 采用 RP-HPLC 法, 以 Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱 (0~45 min, 15%乙腈; 45~60 min, 15%~20%乙腈; 60~80 min, 20%~38%乙腈; 80~90 min, 15%乙腈), 检测波长为 203 nm, 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL。结果 7 种成分盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 线性范围分别为 0.101 0~1.364、0.064 0~0.867 0、1.020~13.77、1.699~22.95、1.869~25.23、0.171 4~2.314、0.516 0~6.966 μg/mL, 线性关系良好, *r* 值均在 0.999 3~0.999 9, 平均加样回收率在 97.25%~103.52%, RSD 均<3%。结论 该方法简便、准确可靠, 重复性好, 分离度好, 适用于同时测定舒胸方中主要 7 种有效成分。

关键词: 舒胸方; 盐酸川芎嗪; 阿魏酸; 羟基红花黄色素 A; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Re; 三七皂苷 R₁

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)10-1477-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.013

Simultaneous determination of seven effective constituents from Shuxiong prescription by RP-HPLC

FENG Bin-bin¹, ZHANG Jian-hai¹, YANG Wen-wu², HE Shi-xin²

1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China

2. Chongqing Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing 400716, China

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for the determination of ligustrazine hydrochloride, ferulic acid, hydrosafflower yellow A, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Re, and notoginsenoside R₁ in Shuxiong prescription. **Methods** The Inertsil ODS-SP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase, consisting of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution, was programmed for a gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results** The excellent linearity with correlation coefficients (*r*) of 0.999 3—0.999 9 was obtained. The average recoveries of the seven compounds were 97.25%—103.52% and all RSD values were less than 3%. **Conclusion** The method appears to be simple, accurate, and well reproducible, which could be used for the simultaneous determination of the above-mentioned seven compounds in Shuxiong prescription.

Key words: Shuxiong prescription; ligustrazine hydrochloride; ferulic acid; hydrosafflower yellow A; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Re; notoginsenoside R₁

舒胸方以片剂和胶囊剂收载于《中国药典》2010年版一部, 由三七、红花、川芎 3 味饮片制成的中药制剂, 具有活血化瘀、通络止痛功效, 临床用于瘀血阻滞所致的胸痹等症^[1]。方中君药三七的主要有效成分是 20 余种皂苷成分, 约占方中总皂苷的

98%^[2-3]; 川芎是一味常用中药, 具有镇静、解痉, 改善血液循环等药理作用, 临床上对冠心病、血栓闭塞性脉管炎、缺血性血管病等有效, 其主要有效成分有川芎嗪、阿魏酸等; 红花的主要成分有羟基红花黄色素 A 等, 研究表明红花黄色素 A 具有降血

收稿日期: 2014-10-17

基金项目: 重庆市科委自然科学基金项目 (CSTC2012jjA10012)

作者简介: 冯彬彬, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源开发利用。E-mail: fengbin1024@sina.com

*通信作者 张建海, 男, 教授, 研究方向为药用资源开发及有效成分分析。E-mail: zhjh200596@126.com

压、扩张冠脉、改善心肌缺血和脑保护等多种药理学功效,临床上多用于治疗心血管疾病^[4-7]。《中国药典》2010年版仅对舒胸片和舒胸胶囊中三七以人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 总量进行定量控制,对红花和川芎均没有进行定量控制,文献报道舒胸方定量测定仅限于盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A 的测定^[4-7],及皂苷类成分的同时测定^[8-11],同时测定方中盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 7 种主要成分未见报道。为了更全面地控制舒胸方质量,本实验建立了同时测定舒胸方 7 种主要药效成分的量,使舒胸方中每种饮片都有相应的质控标准,能更有效地控制该方的质量,也为后续的药动学研究提供一定的实验依据。

1 仪器与材料

日本岛津 LC-30A 高效液相色谱仪, H1650-W 台式微量高速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司; EL-204 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

三七(130718、130811、130821)、川芎(130201、130206、130211)、红花(13050401、13050601、13050805)各3批购自桐君阁药业有限公司,经重庆三峡医药高等专科学校张建海教授鉴定,三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根、川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,均符合《中国药典》2010年版规定。对照品盐酸川芎嗪(批号 110817-200307)、阿魏酸(批号 110773-201313)、羟基红花黄色素 A(批号 110615-200516)、人参皂苷 R_{g1}(批号 110703-201128)、人参皂苷 R_{b1}(批号 110704-201223)、人参皂苷 Re(批号 110754-201324)和三七皂苷 R₁(批号 110745-201318)均购自中国药品生物制品检定研究院,质量分数均为98%以上,舒胸方样品(自制,参照“2.2”项制备方法并结合《中国药典》2010版一部),乙腈、甲醇均为色谱纯,乙醇、磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量,加甲醇配分别制成含盐酸川芎嗪 0.101 mg/mL、羟基红花黄色素 A 1.020 mg/mL、三七皂苷 R₁ 516.0 μg/mL、人参皂苷 Re 171.4 μg/mL、人参皂苷 R_{g1} 1.699 mg/mL、人参皂

苷 R_{b1} 1.869 mg/mL、阿魏酸 64.2 μg/mL 的混合溶液,作为混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备^[1,12-13]

取三七粉末 10 g,加 8 倍量 70%乙醇回流提取 2 h,滤过,药渣再加 6 倍量 70%乙醇回流提取 1.5 h,滤过,合并 2 次滤液,回收乙醇,浓缩至含生药量为 0.5 g/mL,备用;取粉碎的川芎 20 g,加 10 倍量水煎煮 2 h,滤过,药渣和 10 g 红花加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,合并 3 次滤液,离心,上清液浓缩至含生药量为 0.5 g/mL,备用。取川芎红花合并浓缩液与三七浓缩液合并、摇匀。取混合液 1 mL,加入甲醇稀释至 10 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件

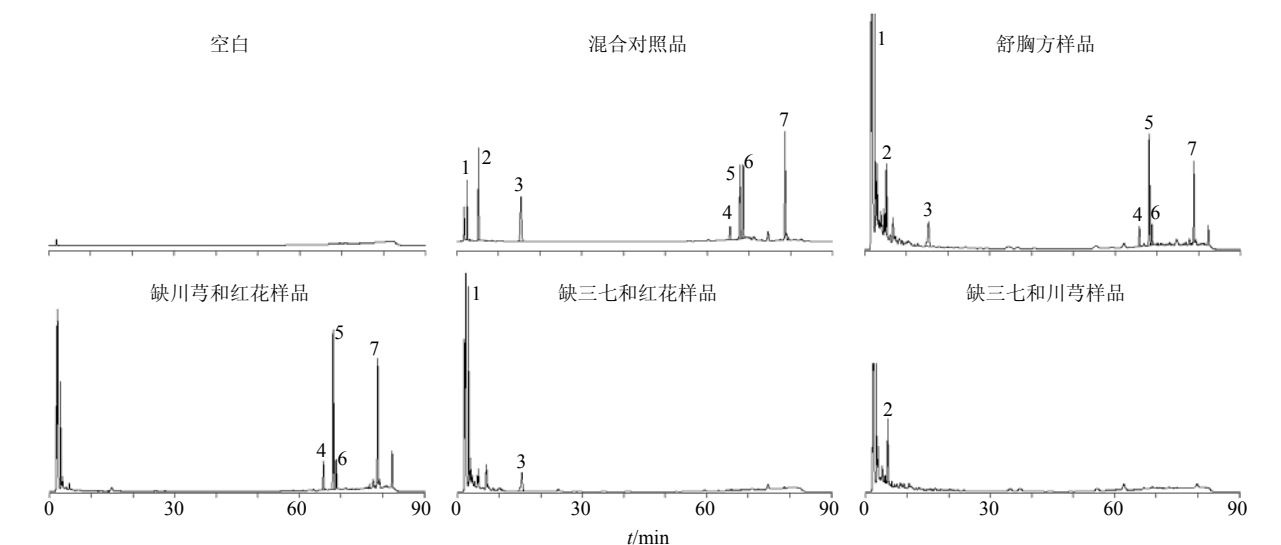
色谱柱为 Inertsil ODS-SP(编号 4CI92243, 250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~45 min, 15%乙腈;45~60 min, 15%~20%乙腈;60~80 min, 20%~38%乙腈;80~90 min, 15%乙腈;柱温 30 °C;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 203 nm;进样量为 20 μL。

根据该色谱条件,取空白溶剂、阴性对照溶液、对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,分别进样,记录色谱图。结果见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 分别取“2.1”项下混合对照品溶液,配成不同系列质量浓度,按“2.3”项下条件取 20 μL 进样,以进样量为横坐标(X)对峰面积积分值(Y)进行回归处理,计算得线性回归方程、相关系数及线性范围,结果分别为盐酸川芎嗪: $Y=3\ 407.8 X+24.197$, $r=0.999\ 6$,线性范围 0.101 0~1.364 μg/mL;阿魏酸: $Y=4\ 001\ 432 X+10\ 804$, $r=0.999\ 8$,线性范围 64.0~867.0 ng/mL;羟基红花黄色素 A: $Y=497.43 X-82.215$, $r=0.999\ 3$,线性范围 1.020~13.77 μg/mL;人参皂苷 R_{b1}: $Y=301\ 299 X+34\ 520$, $r=0.999\ 5$,线性范围 1.869~25.23 μg/mL;人参皂苷 R_{g1}: $Y=338\ 695 X+17\ 207$, $r=0.999\ 5$,线性范围 1.699~22.95 μg/mL;人参皂苷 Re: $Y=410\ 768 X+7\ 551.4$, $r=0.999\ 9$,线性范围 0.171 4~2.314 μg/mL;三七皂苷 R₁: $Y=289\ 722 X+9\ 451.51$, $r=0.999\ 9$,线性范围 0.516 0~6.966 μg/mL。

2.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液,按上述色谱条件,连续进样 6 次,记录色谱图,分别测其峰



1-盐酸川芎嗪 2-羟基红花黄色素 A 3-阿魏酸 4-三七皂苷 R₁ 5-人参皂苷 Re 6-人参皂苷 R_{g₁} 7-人参皂苷 R_{b₁}
 1-ligustrazine hydrochloride 2-hydrosafflower yellow A 3-ferulic acid 4-notoginsenoside R₁ 5-ginsenoside Re 6-ginsenoside R_{g₁} 7-ginsenoside R_{b₁}

图1 舒胸方定量测定的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of quantitative determination of Shuxiong prescription

面积, 结果盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 的 RSD 分别为 0.25%、0.31%、0.46%、0.54%、0.38%、0.61%、0.43%, 表明精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一样品 (20130206), 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按照“2.3”项下条件测定, 记录峰面积, 测定结果盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 的 RSD 分别为 1.69%、1.04%、0.86%、1.35%、1.72%、1.43%、1.57%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份 (20130206) 供试液, 分别于 0、2、4、6、8 h 按照“2.3”项下条件测定, 记录峰面积, 测定结果盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 的 RSD 分别为 1.01%、0.35%、0.26%、0.34%、0.18%、0.31%、0.21%, 表明该方法稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取 6 份已测定的舒胸方样品 (20130206) 适量, 分别加混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下条件测定并计算各成分质量分数的回收率。结果盐酸川芎嗪、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 Re、三七皂苷 R₁ 的平均回收率分别是 102.52%、98.15%、103.52%、99.28%、98.87%、97.48%、97.25%; RSD 分别为 2.28%、0.70%、1.18%、0.69%、0.38%、0.89%、0.39%。表明该方法回收率良好。

2.5 样品测定

取不同批号三七、川芎和红花, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液各 3 份, 分别取 20 μL 进样, 按“2.3”项下色谱条件测定各成分的量, 以外标法计算, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察

按《中国药典》规定君药三七以细粉直接压片

表 1 样品测定结果 (n = 3)

Table 1 Results of determinations of samples (n = 3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	盐酸川芎嗪	阿魏酸	羟基红花黄色素 A	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}	人参皂苷 Re	三七皂苷 R ₁
20130301	0.428	1.988	3.994	12.552	7.936	1.144	3.041
20130506	0.417	1.972	4.084	12.584	7.984	1.128	3.032
20130612	0.419	2.008	3.989	12.712	8.192	1.112	3.056

入药,由于本实验供试品是自制的,故三七采用粉碎后70%乙醇回流提取,然后用甲醇处理进样;在考察川芎提取工艺时,本实验分别采用《中国药典》方法和95%乙醇回流方法进行提取,结果表明用95%乙醇提取有效成分的量较高,但没有显著差异,考虑到经济节约、污染小,故选择《中国药典》提取方法;在红花的提取工艺时,由于羟基红花黄色素A是水溶性的物质,故直接考察水作为提取溶媒。

3.2 色谱条件的确定^[5-14]

本实验采用紫外分光光度计在波长160~430 nm内进行扫描,发现7种对照品成分在203 nm处均有吸收,故选择203 nm作为检测波长。本实验考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液、甲醇-0.5%冰醋酸水溶液等多种流动相系统,发现川芎嗪和阿魏酸在甲醇-0.5%冰醋酸溶液流动相系统可以很好地分开,但皂苷类成分分离不理想,乙腈-0.05%磷酸水溶液系统有助于各成分的分,且分离度较好。

本研究在文献基础上,采用HPLC法同时测定三七中4种皂苷、红花中羟基红花黄色素A及川芎中川芎嗪和阿魏酸7种有效成分的量,该方法准确可靠,分离度好,适用于同时测定舒胸方中7种主要成分的量。本研究对舒胸方中每种饮片都进行了定量控制,为建立舒胸方全面可行的多指标成分综合评价提供了实验依据。

3.3 定量测定结果的分析

测定结果表明,与文献报道相比^[6,8,15],本实验自制的舒胸方中盐酸川芎嗪和羟基红花黄色素A的量较高,阿魏酸与皂苷类成分的量较低,分析原因可能是所用药材产地、质量不同,或者是各药厂的制备工艺不同所造成。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 魏均娴, 杜元冲. 三七植物各部位的研究和开发利用 [J]. 天然产物研究与开发, 1992, 4(3): 94-100.
- [3] 李欣. 舒胸片的质量标准研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [4] 吴蓓, 杨婕, 简晖, 等. HPLC法测定舒胸滴丸中羟基红花黄色素A的含量 [J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(8): 40-42.
- [5] 高光伟, 冯向东. HPLC梯度洗脱法测定舒胸片中羟基红花黄色素A和阿魏酸的含量 [J]. 中国药师, 2010, 13(7): 971-973.
- [6] 周文君, 冯晶. 红花黄色素治疗不稳定型心绞痛的临床观察 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 548-550.
- [7] 张伟, 林凯. HPLC测定舒胸胶囊中盐酸川芎嗪的含量 [J]. 中成药, 2006, 28(6): 920-922.
- [8] 黎小伟, 梁云飞, 林伟国, 等. HPLC测定舒胸片中4种皂苷的含量 [J]. 中成药, 2007, 29(4): 522-524.
- [9] 李欣, 陈晓辉, 齐丹丹, 等. HPLC法同时测定舒胸片中三七皂苷和人参皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 648-650.
- [10] 章志明, 王远兴, 谢明勇, 等. RP-HP LC测定舒胸片中人参皂甙Rg₁的含量 [J]. 南昌大学学报: 工科版, 2004, 26(4): 43-45.
- [11] 杨毅生, 马晶, 黄东. 提高舒胸胶囊质量标准的研究 [J]. 中国药品标准, 2014, 15(1): 35-38.
- [12] 雷志丹. 舒胸片血清药物化学研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- [13] 雷志丹, 雷志钧, 夏新华, 等. 舒胸片提取液HPLC指纹图谱研究 [J]. 湘潭大学自然科学学报, 2010, 32(3): 98-102.
- [14] 冯彬彬, 张建海, 李金玲, 等. RP-HPLC法同时测定内异消大鼠血浆中各成分 [J]. 中成药, 2012, 34(7): 200-202.
- [15] 胡棠洪. 舒胸胶囊质量标准的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(1): 49-50.