

# HPLC 同时测定复方血栓通片中丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸 B、迷迭香酸、哈巴俄苷、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、人参皂苷 Re 的含量

尤立华\*, 赵希贤, 杨秉呼, 叶萌, 武扬

(北京市东城区药品检验所, 北京 100027)

**[摘要]** 目的: 建立高效液相色谱法同时测定复方血栓通片中丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸 B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、人参皂苷 Re 的含量。方法: 采用 HPLC, 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 0.05% 磷酸溶液为流动相 B, 以乙腈为流动相 A, 梯度洗脱, 柱温 20 °C, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 203, 270 nm。结果: 丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸 B、迷迭香酸、哈巴俄苷、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、人参皂苷 Re 在测定范围内呈良好线性关系, 回收率符合要求。结论: 方法简便、准确、重复性好, 可用于复方血栓通片中丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸 B、迷迭香酸、哈巴俄苷、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、人参皂苷 Re 的含量测定。

**[关键词]** 复方血栓通片; 丹参酮 II<sub>A</sub>; 隐丹参酮; 丹酚酸 B; 迷迭香酸; 哈巴俄苷; 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; 人参皂苷 R<sub>b1</sub>; 人参皂苷 Re

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0102-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2014100102

## Simultaneous Determination Tanshinone II<sub>A</sub>, Cryptotanshinone, Salvianolic Acid B, Harpagoside, Rosmarinicacid, Notoginsenoside R<sub>1</sub>, Ginsenoside R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> and Re in Fufang Xueshuantong Tablet by HPLC

YOU Li-hua\*, ZHAO Xi-xian, YANG Bing-hu, YE Meng, WU Yang

(Dongcheng District Institute for Drug Control, Beijing 100027, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the simultaneous determination of tanshinone II<sub>A</sub>, cryptotanshinone, salvianolic acid B, rosmarinicacid, harpagoside, notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> and Re in Fufang Xueshuantong tablets. **Method:** HPLC was performed on C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with 0.05% phosphoric acid solution as mobile phase B and acetonitrile as mobile phase A. The column temperature was 20 °C. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> with the detection wavelength at 203, 270 nm. **Result:** tanshinone II<sub>A</sub>, cryptotanshinone, salvianolic acid B, rosmarinicacid, harpagoside, notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub>, Re are in the determination of a good linear relationship within the scope. Recovery rate of the determination method corresponded to the experimental standard. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate, separable and reproducible, and can be used to control the quality of Fufang Xueshuantong tablets.

**[Key words]** Fufang Xueshuantong tablets; tanshinone II<sub>A</sub>; cryptotanshinone; salvianolic acid B; rosmarinicacid; harpagoside; notoginsenoside R<sub>1</sub>; ginsenoside R<sub>g1</sub>; ginsenoside R<sub>b1</sub>; ginsenoside Re

**[收稿日期]** 20131217(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81060359)

**[通讯作者]** \* 尤立华, 主管药师, 从事药品检验及其质量分析研究, Tel: 010-64635612, E-mail: blue56789@sohu.com

复方血栓通片是由三七、黄芪、丹参、玄参组成的中药制剂,具有活血化瘀、益气养阴的作用,用于治疗血瘀兼气阴两虚证的视网膜静脉阻塞,症见视力下降或视觉异常,眼底瘀血征象,神疲乏力,咽干,口干等。现有质量标准<sup>[1]</sup>及文献报道<sup>[2]</sup>均有三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>的含量测定。未对丹参的水溶性有机酸类成分及脂溶性的丹参酮类成分及黄芪、玄参进行监控,药效学实验表明,丹参的水溶性类成分具有活血化瘀的作用<sup>[3-4]</sup>,脂溶性的丹参酮类成分具有抗氧化<sup>[5]</sup>、抗菌消炎和扩张血管、改善微循环的作用。黄芪主要活性成分为多糖类、黄酮类和皂苷类化合物<sup>[6]</sup>;玄参主要成分为环烯醚萜类化合物,有哈巴俄苷、哈巴苷等;具有抗炎、滋阴及免疫促进作用,中成药成分复杂,药效是多成分共同发挥作用的结果,因此中成药快速、简便、全面的多成分同时测定的方法,成为药品质量控制方法的最佳选择。本文采用HPLC同时测定丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Re的含量<sup>[7-10]</sup>,以更好地保证复方血栓通片的质量。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 液相色谱仪。丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>(批号110766-200619)、隐丹参酮(批号110852-200806,含量98.7%)、丹酚酸B(批号111562-201110,含量98.0%)、迷迭香酸(批号111871-201102)、哈巴俄苷(批号111730-201106,含量96.0%)、三七皂苷R<sub>1</sub>(批号110745-200617)、人参皂苷Rg<sub>1</sub>(批号110703-201027,含量96.3%)、人参皂苷Rb<sub>1</sub>(批号110704-200921,含量92.6%)、人参皂苷Re(批号110754-200822)对照品均由中国药品生物制品检定所提供,试剂为分析纯,复方血栓通片(批号130421,扬州中惠制药有限公司),乙腈为色谱纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** WAT045905 C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈为流动相A,以0.05%磷酸溶液为流动相B;梯度洗脱(0 ~ 15 min, 15% A ~ 21% A; 15.01 ~ 35 min, 21% A ~ 26% A; 35.01 ~ 50 min, 26% A ~ 34% A; 50.01 ~ 70 min, 34% A ~ 61% A; 70.01 ~ 85 min, 61% A ~ 75% A; 85.01 ~ 90 min, 75% A ~ 95% A; 90.01 ~ 95 min, 95% A ~ 15% A; 95.01 ~ 100 min, 15% A),柱温20℃,流速1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长203, 270 nm,进样量10 μL。

### 2.2 溶液配制

**2.2.1 对照品溶液制备** 取丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、隐丹参酮、

丹酚酸B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Re,精密称定,加70%甲醇制成每1 mL含丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 0.211 2 mg、隐丹参酮0.312 3 mg、丹酚酸B 0.147 4 mg、哈巴俄苷0.141 0 mg、迷迭香酸0.110 8 mg、三七皂苷R<sub>1</sub> 0.325 2 mg、人参皂苷Re 0.659 3 mg的对照品储备液。精密量取不同体积的上述对照品储备液并精密称取人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>置100 mL的量瓶中,制成每1 mL含丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 3.38 μg、隐丹参酮3.12 μg、丹酚酸B 58.96 μg、哈巴俄苷2.82 μg、迷迭香酸2.22 μg、三七皂苷R<sub>1</sub> 81.30 μg、人参皂苷Re 39.56 μg、人参皂苷Rg<sub>1</sub> 431.23 μg、人参皂苷Rb<sub>1</sub> 334.44 μg的混合对照品溶液,即得。

**2.2.2 供试品溶液制备** 取本品10片,除去薄膜衣,精密称定,研细,取约0.5 g,精密称定,置25 mL量瓶中,加70%甲醇20 mL,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)20 min,放冷,加70%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

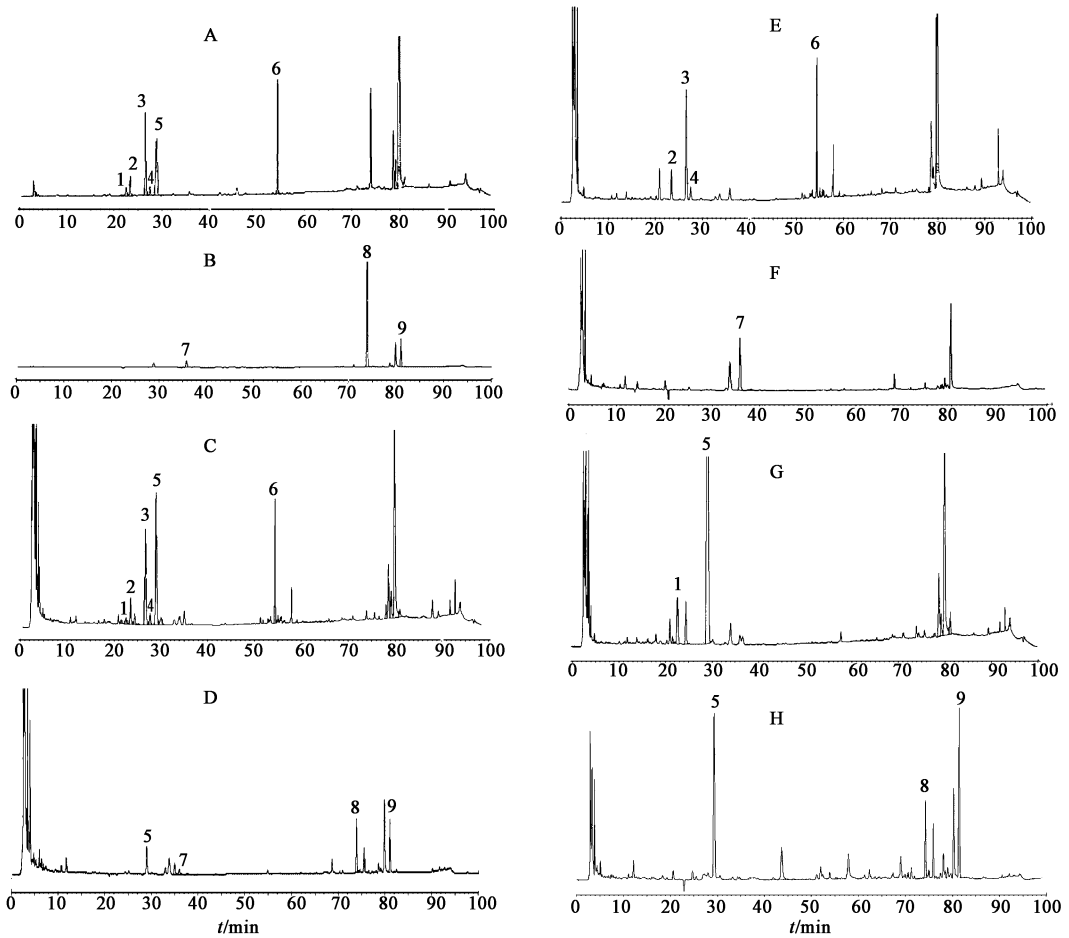
**2.2.3 空白对照溶液制备** 按照处方比例及制法要求,分别取除丹参外的其余药材,取除三七外的其余药材,取除玄参外的其余药材,按工艺及**2.2.2**供试品溶液制备制成不含丹参、三七、玄参的空白对照溶液。

**2.3 系统适应性试验** 在上述色谱条件下,注入对照品溶液,供试品溶液,空白对照溶液,记录色谱图(图1),理论板数按迷迭香酸计算不低于4万。丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Re、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>的分离度均>1.5。空白对照溶液处未见干扰。

**2.4 线性试验** 精密吸取**2.2.1**项下混合对照品溶液1, 2, 5, 10, 15, 20 μL,注入液相色谱仪,以对照品进样的量为横坐标(X, μg)和峰面积值为纵坐标进行回归分析,得到各指标成分的线性回归方程和线性范围,见表1。

**2.5 精密度试验** 取同一批样品溶液,按上述色谱条件,连续测定6次,丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Re峰面积平均值RSD分别为0.17%, 0.09%, 0.12%, 1.77%, 0.95%, 0.09%, 0.25%, 0.13%, 1.16% (n=6)。结果表明该方法的精密度较好。

**2.6 稳定性试验** 取同一批样品溶液,放置0, 4, 9, 14, 19, 24 h,按上述色谱条件测定,丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷



A. 对照品 203 nm; B. 对照品 270 nm; C. 样品 203 nm; D. 样品 270 nm; E. 缺丹参的 203 nm 的阴性样品;

F. 缺丹参的 270 nm 的阴性样品; G. 缺三七的 203 nm 的阴性样品; H. 缺玄参的 270 nm 的阴性样品

1. 迷迭香酸; 2. 三七皂苷  $R_1$ ; 3. 人参皂苷  $R_{g_1}$ ; 4. 人参皂苷  $R_e$ ; 5. 丹酚酸 B; 6. 人参皂苷  $R_{b_1}$ ; 7. 哈巴俄苷; 8. 隐丹参酮; 9. 丹参酮  $II_A$

图 1 复方血栓通片 HPLC

表 1 各指标成分的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$
丹参酮 $II_A$	$Y = 6.547 \times 10^8 X - 1.064 \times 10^4$	0.999 9	0.003 379 ~ 0.050 69
隐丹参酮	$Y = 5.753 \times 10^8 X + 3.465 \times 10^5$	0.999 9	0.006 246 ~ 0.062 46
丹酚酸 B	$Y = 6.007 \times 10^8 X + 5.397 \times 10^5$	0.999 9	0.058 96 ~ 0.884 4
哈巴俄苷	$Y = 2.842 \times 10^8 X - 4.686 \times 10^3$	0.999 9	0.002 820 ~ 0.042 30
迷迭香酸	$Y = 8.099 \times 10^8 X - 2.922 \times 10^4$	0.999 9	0.002 216 ~ 0.033 24
三七皂苷 $R_1$	$Y = 3.682 \times 10^7 X + 7.083 \times 10^5$	0.999 7	0.162 6 ~ 1.626
人参皂苷 $R_e$	$Y = 4.106 \times 10^7 X - 1.489 \times 10^5$	0.999 5	0.079 1 ~ 7.911
人参皂苷 $R_{g_1}$	$Y = 3.241 \times 10^7 X + 2.298 \times 10^6$	0.999 7	0.862 5 ~ 8.625
人参皂苷 $R_{b_1}$	$Y = 2.960 \times 10^7 X + 4.729 \times 10^5$	0.999 9	0.668 9 ~ 6.688

$R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$ 、人参皂苷  $R_e$  峰面积平均值 RSD 分别为 0.10% , 0.19% , 0.13% , 1.57% , 1.01% , 0.29% , 0.32% , 0.42% , 1.11% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,按

2.2.2 方法制备样品,按上述色谱条件测定,测得丹参酮  $II_A$ 、隐丹参酮、丹酚酸 B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$ 、人参皂苷  $R_e$  平均含量分别为 0.119 2, 0.118 8, 2.092 4, 0.044 48, 0.072 7, 5.507 1, 24.979, 18.230 3, 2.462

6 mg · g<sup>-1</sup>; RSD 分别为 0.60%, 0.27%, 1.94%, 1.59%, 0.51%, 0.57%, 0.49%, 0.52%, 1.38%, 表明该方法的重复性较好。

**2.8 加样回收试验** 精密称取同一批样品 0.25 g 共 12 份,其中 6 份分别精密加入对照品溶液各 15 mL,另外 6 份分别精密加入由对照品储备液制成每 1 mL 含丹参酮 II<sub>A</sub> 2.112 μg、隐丹参酮 2.186 μg、丹酚酸 B 29.478 μg、哈巴俄苷 0.705 μg、迷迭香酸 1.108 μg 混合对照品溶液 15 mL,按 2.2.2 方法制备样品,按上述色谱条件测定,测得丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸 B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Re 的含量,计算回收率,结果见表 2。9 个待测成分加样回收率在 98% ~ 104%,说明该方法准确度较好。

表 2 各指标成分加样回收试验(n=6)

成分	平均回收率/%	RSD/%
丹参酮 II <sub>A</sub>	98.01	0.34
隐丹参酮	98.90	1.08
丹酚酸 B	100.63	1.73
哈巴俄苷	100.47	1.16
迷迭香酸	98.56	1.87
三七皂苷 R <sub>1</sub>	102.80	1.54
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	102.39	1.22
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	103.85	0.76
人参皂苷 Re	102.71	1.10

### 3 讨论

**3.1 测定成分的选择** 中药的药效是多种成分共同作用的结果,复方血栓通片有 4 味药味组成,本实验采用 HPLC 同时测定丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹酚酸 B、哈巴俄苷、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、毛蕊异黄酮苷的含量,但是毛蕊异黄酮苷的出峰时间快,分离度欠佳,含量稍低,所以选择了除毛蕊异黄酮苷以外的其他 9 个成分的含量测定指标,以更好地保证复方血栓通片的质量。

**3.2 检测波长的选择** 对各种成分进行了紫外同步扫描测定,在 203 nm 波长为末端吸收,可以检测样品中的丹酚酸 B、迷迭香酸、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Re,在 270 nm 波长可以检测丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、哈巴俄苷,所以选择

203,270 nm 测定。

**3.3 提取条件的优化** 考察了溶剂浓度对各种成分提取效率的影响,选择 50%,60%,70%,80% 不同浓度的甲醇提取,结果表明 70% 的甲醇提取各种成分的峰面积达到最大;考察了超声提取时间,分别超声提取 10,20,30 min,结果表明,提取 20 min 时各种成分已较完全;对色谱柱的温度进行考察,在相同的流动相下,柱温 20 °C 时分离度 > 1.5,峰形好,流动相采用梯度洗脱,能够达到较好的分离效果。

**3.4 耐用性考察** 选择了 WAT045905 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Discover C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 的色谱柱进行测定,结果均能取得较好的分离效果,且阴性无干扰,说明建立的方法有较好的耐用性。

### [参考文献]

- [1] SFDA. 国家药品标准[S]. YBH00302007.
- [2] 成伙清,李顺浓. 复方血栓通片的质量标准及其稳定性研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(7):52.
- [3] 杜冠华,张均田. 丹参现代研究概况与进展(续一)[J]. 医药导报,2004,23(6):355.
- [4] 杜冠华,张均田. 丹参水溶性有效成分-丹酚酸研究进展[J]. 基础医学与临床,2000,20(5):10.
- [5] 曹恩华,刘晓麟,李景福,等. 天然抗氧化剂丹参酮 II<sub>A</sub> 对肝细胞脂质过氧化产物与 DNA 相互作用的影响[J]. 生物物理学报,1996,12(2):339.
- [6] 肖培根. 新编中药志. 第 1 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:876.
- [7] 张英丰,朱黎霞,梁东辉. HPLC 同时检测丹参提取物中 5 种水溶性和脂溶性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):76.
- [8] 梁洁萍,刘忠政,彭维,等. 复方血栓通胶囊 HPLC 指纹图谱质量控制方法研究[J]. 中药材,2012,35(11):1854.
- [9] 宋肖炜,李清,叶静,等. 黄芪不同炮制品中黄酮类成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):85.
- [10] 王超群,贾秀虹,陈季,等. 中药三七“一测多评”质量控制方法的系统研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(22):3438.

[责任编辑 邹晓翠]