

# HPLC 同时测定通脉丸中 6 个指标性成分的含量

陈天朝, 聂书慧, 翟来超

(河南中医学院 第一附属医院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的:建立了通脉丸中 6 种指标性成分士的宁、马钱子碱、芍药苷、阿魏酸、橙皮苷和丹酚酸 B 的含量测定方法,为其质量评价提供依据。方法:采用 HPLC 梯度洗脱,色谱条件:Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C,检测波长 260 nm(士的宁、马钱子碱、芍药苷、橙皮苷、丹酚酸 B),316 nm(阿魏酸)。结果:6 种成分均能达到基线分离且在该色谱条件下士的宁、马钱子碱、芍药苷、阿魏酸、橙皮苷和丹酚酸 B 的进样量分别在 0.037 ~ 1.097,0.039 ~ 1.176,0.075 ~ 2.25,0.01 ~ 0.30,0.113 ~ 3.384,0.225 ~ 6.72 μg 呈良好的线性关系。结论:经过系统的方法学考察,该方法操作简便、结果准确、重复性好,适用于通脉丸的含量测定。

**[关键词]** 高效液相色谱;通脉丸;士的宁;马钱子碱;芍药苷;阿魏酸;橙皮苷;丹酚酸 B

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0055-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030055

**Quantitative Determination of Six Indexes in Tongmai Pill by HPLC** CHEN Tian-chao, NIE Shu-hui, ZHAI Lai-chao (First Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of six indexes in Tongmai pill, provide reference for quality evaluation. **Method:** An Agilent ZORBAX SB-Aq chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-methanol-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>. Column temperature set at 35 °C. The wavelengths were 260 nm for strychnine, brucine, paeoniflorin, hesperidin, and salvianolic acid B, and 316 nm for ferulic acid. **Result:** Strychnine, brucine, paeoniflorin, hesperidin, salvianolic acid B, and ferulic acid showed good linearity in the range of 0.037-1.097, 0.039-1.176, 0.075-2.25, 0.01-0.30, 0.113-3.384, 0.225-6.72 μg, respectively. The average recoveries were 99.69%, 100.12%, 99.56%, 99.98%, 99.52%, and 99.69%. **Conclusion:** The established method is simple, accurate, and reproducible. It can be used for quality control of the Tongmai pill.

**[Key words]** HPLC; Tongmai pill; strychnine; brucine; paeoniflorin; ferulic acid; hesperidin; salvianolic acid B

通脉丸是全国周围血管专业主任委员崔公让教授的经验处方,由制附子、黄芪、两头尖、制马钱子、丹参等多味中药组成,现为河南中医学院第一附属医院院内制剂,具有祛风湿、通经络、消肿痛之功效。用于治疗血栓闭塞性脉管炎、动脉硬化闭塞症、风寒湿痹、四肢惊挛等肢体缺血性疾病,临床疗效突出。查阅目前文献报道,对通脉丸的含量测定主要是针对单一成分,本课题在前期的

试验中建立了通脉丸中竹节香附素 A 和总皂苷的含量测定方法,本次采用高效液相色谱法测定通脉丸中士的宁、马钱子碱、芍药苷、阿魏酸、橙皮苷、丹酚酸 B 6 个成分,为下一步考察物料性质对通脉丸体外溶出的影响以及通脉丸的新药研发提供了完整全面的测定方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** e2695 型高效液相色谱仪(包括 2695

**[收稿日期]** 20140423(014)

**[基金项目]** 河南省科技厅自然科学基金项目(102102310185);河南省教育厅科技攻关项目(2011A360003)

**[第一作者]** 陈天朝,主任药师,硕士生导师,从事中药剂型研究,Tel:13700845011,E-mail:ctc661111@163.com

型泵,2996 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站,美国 Waters),ZRS-8C 型智能溶出试验仪(天津大学无线电厂),CP225D 型 1/10 万分析天平(德国 Sartorius 公司)。

**1.2 试药** 甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司,磷酸(色谱纯,迪马公司),超纯水(自制)。

阿魏酸(批号 110773-201012)、丹酚酸 B(批号 111562-201212)、马钱子碱(批号 0706-201136)、芍药苷(批号 110736-201136)、橙皮苷(批号 110721-201014),以上对照品均购于中国食品药品检定研究院。土的宁对照品(批号 101207),纯度 > 98%,购于上海融合医药科技有限公司。通脉丸由河南中医药大学第一附属医院中药制剂室提供(批号 20130301)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),加 Agilent SB-Aq C<sub>18</sub> 保护柱(1.0 mm × 20 mm, 5 μm),流动相乙腈-甲醇-0.1% 磷酸水梯度洗脱(表 1),检测波长<sup>[1]</sup>:土的宁、马钱子碱、芍药苷、橙皮苷、丹酚酸 B 为 260 nm,阿魏酸 316 nm,流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C,进样量 20 μL,系统适应性试验见图 1<sup>[2-6]</sup>。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

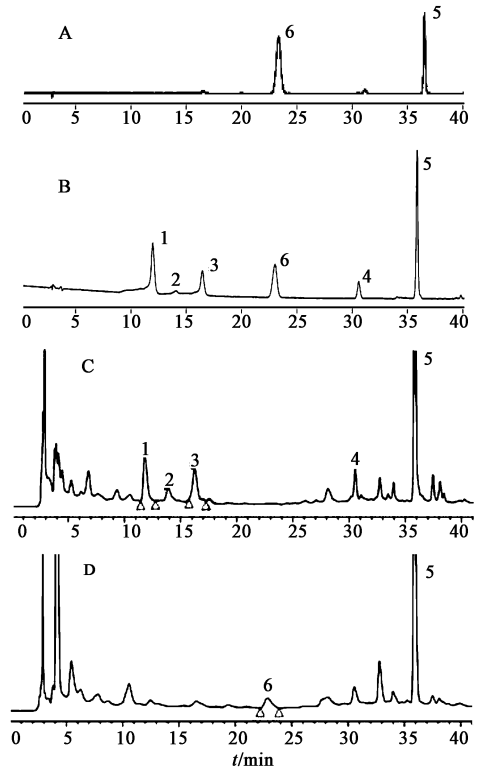
时间/min	甲醇/%	乙腈/%	0.1% 磷酸水/%
0	15	5	80
0 ~ 15	15 ~ 12	5 ~ 10	78
15 ~ 20	12	10	78
20 ~ 50	12 ~ 25	10 ~ 35	40
50 ~ 55	25 ~ 15	35 ~ 5	40 ~ 80
55 ~ 60	15	5	80

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 供试品溶液<sup>[7]</sup>** 取通脉丸约 7 g,研细,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加水 10 mL,精密称定,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用水补重,摇匀滤过,取续滤液即得供试品溶液,进样量 20 μL。

**2.2.2 对照品溶液** 分别精密称取土的宁、马钱子碱、阿魏酸、芍药苷、橙皮苷、丹酚酸 B 对照品 9.14, 9.80, 2.50, 9.38, 9.40, 9.36 mg 置于 6 个 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,再分别精密量取上述对照品溶液 1, 1, 1, 2, 3, 6 mL 加甲醇定容至 25 mL,即得混合对照品溶液。

## 2.3 方法学考察



1. 土的宁;2. 芍药苷;3. 马钱子碱;4. 橙皮苷;5. 丹酚酸 B;6. 阿魏酸;A. 混合对照品(316 nm);B. 混合对照品(260 nm);C. 样品(260 nm);D. 样品(316 nm)

图 1 通脉丸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatographic of Tangmai pills

**2.3.1 线性关系** 分别精密量取上述混合对照品溶液 1, 4, 8, 12, 16, 20, 30 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1 项色谱条件进行测定,记录色谱峰面积,绘制标准曲线,回归方程见表 2。

表 2 通脉丸中 6 种成分线性回归方程

Table 2 Each component the regression equation

成分	回归方程	r	线性范围/μg
土的宁	$Y = 2.092586.47X + 42.048.10$	0.9998	0.037 ~ 1.097
马钱子碱	$Y = 1.738215.09X - 37.473.11$	0.9997	0.039 ~ 1.176
芍药苷	$Y = 11.170354.11X - 73.681.06$	0.9996	0.075 ~ 2.25
阿魏酸	$Y = 5.253182.58X - 16.651.92$	0.9998	0.01 ~ 0.30
橙皮苷	$Y = 179.0291.49X - 41585.07$	0.9996	0.113 ~ 3.384
丹酚酸 B	$Y = 1.158593.43X - 64.756.71$	0.9996	0.225 ~ 6.72

**2.3.2 精密度试验** 取通脉丸一批(批号 20130301),按照供试品制备方法和已确定的色谱条件,连续进样 5 次,测得土的宁、马钱子碱、芍药苷、阿魏酸、橙皮苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 1.5%, 1.3%, 0.7%, 0.7%, 0.6%, 表明仪器

精密度良好。

**2.2.3 稳定性试验** 取通脉丸(批号 20130301)约 7 g,按 2.2.1 项下的方法来制备供试品溶液,分别于 0,2,4,6,12,24 h,按 2.1 项色谱条件进样测定,测得士的宁、马钱子碱、芍药苷、阿魏酸、橙皮苷、丹酚酸 B 含量的 RSD 分别为 1.3%,1.5%,1.3%,0.8%,0.9%,0.8%,表明 6 种成分在 24 h 内稳定。

**2.2.4 重复性试验** 取通脉丸(批号 20130301)约 7 g,平行取 6 份,精密称定,按 2.2.1 项下的方法制备供试品溶液,按 2.1 项色谱条件进样测定,测得士的宁、马钱子碱、芍药苷、阿魏酸、橙皮苷、丹酚酸 B 含量的 RSD 分别为 2.8%,1.6%,1.3%,2.4%,2.1%,0.9%,表明本方法重复性良好。

**2.2.5 加样回收率试验** 取重复性试验项下已知含量的通脉丸样品 6 份,每份约 7 g,分别加入一定量的对照品溶液,以 2.2.1 项下方法进行制备,按照 2.1 项色谱条件进行测定,记录色谱峰面积,计算回收率及 RSD,本方法回收率、准确度较好,见表 3。

表 3 通脉丸中 6 种成分的加样回收率试验 (n=6)

Table 3 Recovery of 6 components in Tongmai pills (n=6)

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	RSD /%
士的宁	29.51	29.50	59.00	99.69	0.6
马钱子碱	79.38	79.29	158.02	100.12	0.6
芍药苷	706.75	400.15	1 105.46	99.56	0.7
阿魏酸	10.94	11.55	22.38	99.69	0.7
橙皮苷	100.88	106.45	205.90	99.98	0.6
丹酚酸 B	812.23	816	1 619.27	99.52	0.7

**2.3 溶出液含量测定** 通过前期的考察本实验采用浆法,以超声脱气处理 30 min 的 900 mL 纯水做为溶出介质,设定溶出仪的转速为 100 r·min<sup>-1</sup>,温度为(37±0.5)℃,分别在 10,30,60,120 min 时取溶出液 10 mL,立即补充相同体积相同温度的溶出介质,溶出液滤过,取续滤液,根据已经确定的色谱条件,测定溶出液中指标成分含量,结果见表 4。

### 3 讨论

由于检测指标成分较多,梯度洗脱时流动相及流动相比例的选择需要较大的工作量。参考文献和本课题前期实验首先选择乙腈-0.1%磷酸水梯度洗脱,但重复性不好,特别是士的宁、马钱子碱、芍药苷

表 4 不同间点样品中指标成分含量测定

Table 4 Determination of the content in different time points

时间 /min	士的宁	马钱子碱	芍药苷	阿魏酸	橙皮苷	丹酚酸 B
10	7.37	11.14	15.03	2.091	23.9	38.12
30	10.16	13.55	22.12	2.80	26.69	57.03
60	11.81	16.75	26.57	3.483	29.67	64.35
120	11.99	16.78	26.63	3.42	29.78	69.29

分离度达不到要求。经过多次调整乙腈的比例,发现芍药苷出峰时间和乙腈比例的变化关系较密切,乙腈比例增加,芍药苷出峰时间提前与士的宁的峰部分重合,乙腈比例降低,芍药苷出峰时间推迟与马钱子碱的峰部分重合,最终发现只调整乙腈的比例很难使士的宁、马钱子碱、芍药苷完全分离。由于甲醇的洗脱能力小于乙腈,考虑把一部分乙腈换为甲醇,由原来的两相乙腈-0.1%磷酸水流动相换为三相乙腈-甲醇-0.1%磷酸水,通过调整乙腈-甲醇-0.1%磷酸水的比例找到士的宁、马钱子碱、芍药苷的最佳分离效果。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 刘元,宋志钊,莫海涛,等. HPLC 法测定复方中风康复片中士的宁和马钱子碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(6):74-76.
- [3] 李中娥,王春颖. HPLC 同时测定妇康片中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):143-145.
- [4] 陈日来,李玉珍,陈晓凯,等. 复方丹参片与滴丸中丹酚酸 B 和丹参酮 II<sub>A</sub> 含量的比较研究[J]. 中国药房, 2005,20:76-78.
- [5] 朱建伟,江波,王飞. 马钱子与甘草配伍前后士的宁和马钱子碱的 HPLC 分析[J]. 亚太传统医药,2009,5(10):18-19.
- [6] 陈晓明,王巍,闵庆璐. HPLC 同时测定木香分气丸中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):115-117.
- [7] 杨永刚,王震红. 联苯双酯滴丸溶出度的测定与比较[J]. 中国药事,2010,24(7):698-699.

[责任编辑 顾雪竹]