

HPLC 同时测定复方生脉颗粒中有效成分的含量

魏宏伟, 刘沛*, 刘翠哲

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 同时测定复方生脉颗粒中丹参素和丹参酮 II_A 以及三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的含量。方法: 用 HPLC 法, 采用 Discovery C₁₈ 柱(25 cm × 4.6 mm, 5 μm); 丹参素和丹参酮 II_A 色谱条件: 流动相为甲醇(A)-0.5% 醋酸水(B), 洗脱梯度(0~10 min, 9%~75% A; 10~40 min, 75% A), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 275 nm; 三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 色谱条件: 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水(20:80), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 203 nm。结果: 丹参素的线性范围为 0.099 6~1.195 2 μg ($r = 0.999 9$), 丹参酮 II_A 的线性范围为 0.026~0.312 μg ($r = 0.999 9$), 二者平均回收率分别为 101.33%, 100.24%, RSD 1.28%, 1.53%; 三七皂苷 R₁ 线性范围为 0.092 6~1.182 2 μg ($r = 0.999 7$), 人参皂苷 Rg₁ 线性范围为 0.160 8~1.929 6 μg ($r = 0.999 9$), 二者平均回收率分别为 99.87%, 101.42%, RSD 为 1.07%, 2.43%。结论: 该含量测定方法简便, 分离效果好, 能同时测定复方生脉颗粒中丹参素和丹参酮 II_A 以及三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的含量, 结果准确可靠。

[关键词] 丹参素; 丹参酮 II_A; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0095-05

Simultaneous Determination of Active Components in Fufang Shengmai Granules by HPLC

WEI Hong-wei, LIU Pei*, LIU Cui-zhe

(Hebei Province key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the simultaneous determination of danshensu, tanshinone II_A and notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁ in Fufang Shengmai Granules. **Method:** Danshensu and tanshinone II_A were separated on the column of Discovery C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The chromatographic condition for danshensu and tanshinone II_A was containing mobile phase, flow rate and detect wavelength. The gradient elution program was carried out by mobile phase of methanol(A)-0.5% acetic acid(B) that follow 0-10 min, 9%-75% A; 10-40 min, 75% A. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and temperature was 25 °C. The analytes were detected at 275 nm. Chromatographic condition for notoginsenoside R₁ and ginsenoside Rg₁ was acetonitrile - 0.05% phosphoric acid(20:80) as mobile phase. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and temperature was 30 °C. The analytes were detected at 203 nm. **Result:** Calibration curves of danshensu were linear from 0.099 6 to 1.195 2 μg ($r = 0.999 9$), the linearity range of tanshinone II_A was 0.026-0.312 μg ($r = 0.999 9$), the methodology recovery of danshensu and tanshinone II_A was 101.33%, 100.24% respectively, RSD was 1.28%, 1.53%; Calibration curves of notoginsenoside R₁ were linear from 0.092 6 to 1.182 2 μg ($r = 0.999 7$), the linearity range of ginsenoside Rg₁ was 0.160 8-1.929 6 μg ($r = 0.999 9$), the methodology recovery of notoginsenoside R₁ and

[收稿日期] 20101113(004)

[第一作者] 魏宏伟, 研究生, 研究方向: 中药制剂现代化, Tel:0314-2290629, E-mail:971873109@qq.com

[通讯作者] * 刘沛, 研究方向: 中药制剂现代化研究, Tel:0314-2290629, E-mail:liupeipp123@163.com

ginsenoside R_{g₁} was 99.87% and 101.42%, RSD was 1.07% and 2.43%. **Conclusion:** The HPLC method is simple and has satisfactory efficacy, it can simultaneously determine danshensu, tanshinone II_A and notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g₁} from different areas.

[**Key words**] Danshensu; tanshinone II_A; notoginsenoside R₁; ginsenoside R_{g₁}; HPLC

复方生脉颗粒是承德医学院根据传统验方研制的中药制剂,由丹参、三七、人参等药味组成,具有活血化瘀,理气止痛,益气养阴之功效,用于气滞血瘀所致的胸痹。原方药品标准^[1]只对丹参中丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 作了含量测定,其余药味只做了薄层鉴别,为了规范药品生产,更有效地控制药品的内在质量以符合中药现代化的要求,保证临床用药的疗效稳定、安全可靠,有必要建立制剂中多味药的含量测定项目。本文在参考文献的基础上^[2-5],采用高效液相色谱法,分别同时测定复方生脉颗粒中丹参素和丹参酮 II_A 以及三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g₁} 的含量。

1 仪器与试剂

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪:四元泵,Agilent DAD 检测器,在线脱气装置,自动进样器,柱温箱和 Agilent Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司);CHRIST 实验室型冻干机(北京博励行仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHD-III 型循环水式多用真空泵(保定高新区阳光科教仪器厂);KQZ200DE 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

丹参素钠对照品(110855-200809),丹参酮 II_A 对照品(11076-200518),三七皂苷 R₁ 对照品(110745-200312),人参皂苷 R_{g₁} 对照品(110703-200726)均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯(天津市协和昊鹏色谱科技有限公司),冰醋酸、磷酸为分析纯(天津市北方天医化学试剂厂),水为重蒸水。复方生脉颗粒自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 丹参素和丹参酮 II_A 色谱条件 色谱柱 Discovery C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.5% 醋酸水(B),洗脱梯度(0 ~ 10 min, 9% ~ 75% A; 10 ~ 40 min, 75% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 275 nm,理论板数不得低于 2 000。

2.1.2 三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g₁} 色谱条件 色

谱柱 Discovery C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水(20:80),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 203 nm,理论板数不得低于 4 000。

2.2 溶液的制备

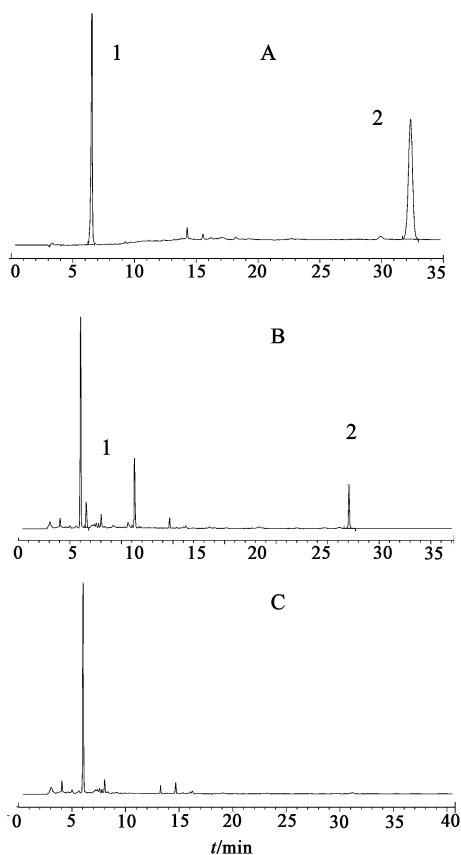
2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A 对照品 2.8 mg 置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解定容。精密称取丹参素钠 2.49 mg 置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解,另精密加入丹参酮 II_A 对照品溶液 2 mL,定容,作为丹参混合对照品溶液(A)。精密称取三七皂苷 R₁ 对照品 2.49 mg、人参皂苷 R_{g₁} 2.01 mg 置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,作为三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g₁} 混合对照品溶液(B)。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取复方生脉颗粒 1 g 置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇超声溶解并定容,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 分别制备并称取不含丹参的复方生脉颗粒和不含三七、人参的复方生脉颗粒各 1 g 置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇超声溶解并定容,即得。上述色谱条件下,有效成分分离效果良好,杂质无干扰,色谱图见图 1,2。

2.3 线性关系的考察 分别精密吸取混合对照品溶液 A 和对照品溶液 B 各 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL 进样,按 2.1 项下色谱条件进行分析,以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,得回归方程分别为:丹参素钠线性方程为 $Y = 519\,727.255X + 1.327$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.0996 ~ 1.1952 μg;丹参酮 II_A 线性方程为 $Y = 3\,352\,182.960X - 1.468$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.026 ~ 0.312 μg;三七皂苷 R₁ 线性方程为 $Y = 299\,681.339X - 2.357$ ($r = 0.9997$),线性范围为 0.0926 ~ 1.1822 μg;人参皂苷 R_{g₁} 线性方程为 $Y = 264\,792.354X - 15.019$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.1608 ~ 1.9296 μg。

2.4 精密度试验 精密吸取各对照品溶液 10 μL,于测定条件下测定,重复进样 6 次,以峰面积计算丹参素和丹参酮 II_A 的 RSD 分别为 0.10%, 0.07%;三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g₁} 的 RSD 分别为



A. 对照品(A);B. 样品;C. 丹参阴性对照;1. 丹参素;2. 丹参酮Ⅱ_A

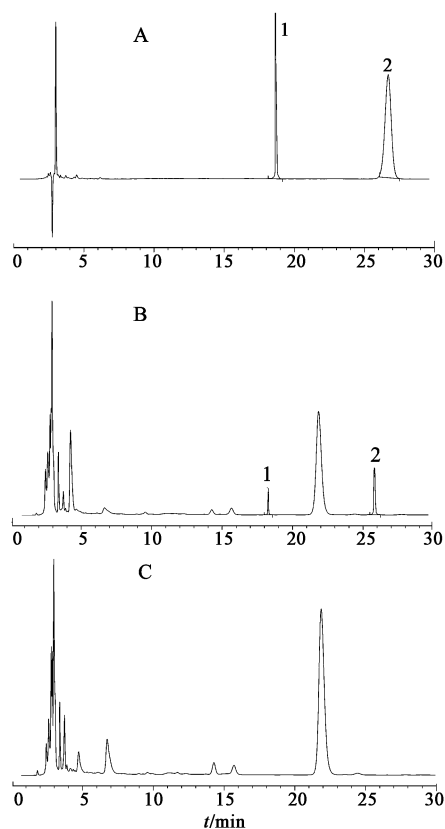
图1 复方生脉颗粒中丹参的HPLC

0.23%, 2.32%。

2.5 重复性试验 称取复方生脉颗粒6份,按供试品制备方法制备供试品溶液,取供试品溶液20 μL进样,按2.1项下色谱条件测定,计算含量,测定结果丹参素和丹参酮Ⅱ_A的平均含量分别为0.634, 0.714 mg·g⁻¹, RSD分别为0.27%, 0.36%;三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁的平均质量分数为0.843, 4.412 mg·g⁻¹, RSD为1.79%和2.69%。

2.6 加样回收率试验 分别称取丹参素钠和丹参酮Ⅱ_A对照品适量,加入到已知含量的样品中,按供试品溶液制备方法及测定条件测定含量;精密称取三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁对照品适量,加入到已知含量的样品中,按供试品溶液制备方法及测定条件测定含量,结果见表1。

2.7 稳定性考察 取同一供试品溶液,按上述色谱条件,分别在0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h进样20 μL,测定其峰面积,丹参素和丹参酮Ⅱ_A峰面积的RSD分别为1.57%, 1.88%;三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁峰面积的RSD分别为1.39%, 2.01%,结果表示供试品溶液在24 h内稳定性良好。



A. 对照品(B);B. 样品;C. 三七、人参阴性对照;

1. 三七皂苷R₁;2. 人参皂苷Rg₁

图2 复方生脉颗粒中三七、人参的HPLC

2.8 样品含量测定 取复方生脉颗粒3批,每批按供试品制备方法制备2份,按上述色谱条件进样20 μL,进行测定,计算含量,求平均值,结果见表2。

3 讨论

丹参三七配伍多以二者分别单独提取后再混合制剂,将丹参三七合提并对合提物中的有效成分进行同时测定的相关文献报道较少。本实验在制备复方生脉颗粒时将丹参和三七合提,在提取时分别进行了醇提和水提,再将两提取液混合后浓缩干燥成干浸膏,进一步制备制剂,同时兼顾了丹参水溶性成分和脂溶性成分的溶出。并建立了同时测定丹参素和丹参酮Ⅱ_A的分析方法,经过比较多种流动相及其不同配比,最终选择的流动相为甲醇A-0.5%醋酸水(B),洗脱梯度(0~10 min, 9%~75% A, 10~40 min, 75% A)的洗脱条件,使分离效果较好,分析时间较短,可用来控制复方生脉颗粒中有效成分的含量。

表 1 5 种成分加样回收率试验

	样品量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
丹参素	1.001	0.633	0.30	1.243	101.77	101.33	1.28
	1.000	0.621	0.60	1.222	101.21		
	1.001	0.639	0.60	1.254	101.89		
	1.001	0.637	0.60	1.235	99.76		
	1.002	0.641	0.60	1.256	101.51		
	1.000	0.624	0.60	1.230	100.93		
丹参酮 II _A	1.001	0.714	0.70	1.466	101.37	100.24	1.53
	1.000	0.712	0.70	1.406	99.21		
	1.003	0.723	0.70	1.440	101.46		
	1.002	0.719	0.70	1.410	98.76		
	1.002	0.720	0.70	1.422	100.01		
	1.001	0.716	0.70	1.418	100.27		
三七皂苷 R ₁	1.000	0.832	0.80	1.626	99.26	99.87	1.07
	1.002	0.841	0.80	1.637	98.87		
	1.001	0.834	0.80	1.646	101.46		
	1.000	0.833	0.80	1.623	98.76		
	1.003	0.848	0.80	1.654	100.86		
	1.001	0.834	0.80	1.635	100.18		
人参皂苷 Rg ₁	1.001	4.412	2.00	6.452	101.98	101.42	2.43
	1.000	4.404	2.00	6.439	101.75		
	1.000	4.408	2.00	6.447	101.94		
	1.002	4.421	2.00	6.420	99.93		
	1.001	4.415	2.00	6.392	98.87		
	1.003	4.430	2.00	6.455	101.23		

表 2 复方生脉颗粒含量测定 mg·g⁻¹

批号	丹参素	丹参酮 II _A	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 Rg ₁
20100801	0.632	0.715	0.832	4.326
20100802	0.633	0.717	0.834	4.330
20100803	0.635	0.718	0.833	4.327

使用二极管阵列检测器对丹参混合对照品进行全波长扫描,结果丹参素在 220,280 nm 附近有强吸收,丹参酮 II_A 在 254,270 nm 处有较强吸收,为了同时测定丹参素和丹参酮 II_A,实验过程中同时监测了 280,275,270 nm 下的测定结果,最终选择 275 nm,使二者灵敏度均较高。

据文献[6-8]报道,丹参酮 II_A 性质不稳定,见光易分解,实验中发现丹参素钠的稳定性也较差,丹参素钠放置一段时间后含量降低,故操作中应低温、避光保存,临用现配。在制备供试品过程中,分别考察了不同的溶剂对样品的溶解度,结果 50% 的甲醇

溶解度最大,有效成分较稳定,另外样品溶液经微孔滤膜过滤后也应低温保存,24 h 内测定含量,以免影响实验结果。

实验过程中曾尝试将丹参素、丹参酮 II_A、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 4 种成分进行同时测定,对不同流动相进行了筛选,其中甲醇对有末端吸收的皂苷类成分影响较大,不予采用;用乙腈-醋酸水做流动相则在末端波长下基线不平,故选择乙腈-磷酸水作为流动相;实验中比较了不同洗脱梯度和不同波长下的 4 种成分同时测定的图谱,分离效果均不理想,检测波长接近末端吸收时基线漂移严重,波长远离 220 nm 时,则皂苷类成分无吸收。4 种成分的紫外吸收波长相差太多,建议可采用可变波长检测器进行尝试^[9]。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2005:527.

小儿泻痢片质量标准

高玉琼, 刘文炜, 李凤, 刘建华*, 霍昕, 杨迺嘉
(贵州省生物技术研究开发基地, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 建立小儿泻痢片质量标准。方法: 采用薄层色谱法对方中的白芍进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定黄连中盐酸小檗碱含量。结果: TLC 鉴别分离度好, 阴性对照无干扰。HPLC 分析过程中, 盐酸小檗碱与样品中其他组分分离效果好, 盐酸小檗碱进样浓度在 $0.03 \sim 0.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有良好线性关系 ($r = 0.9999$), 平均回收率 97.36% , $\text{RSD} 1.41\%$ ($n = 6$)。结论: 采用此法测定小儿泻痢片黄连中的盐酸小檗碱含量, 准确可靠, 简便易行, 所建的标准可用于小儿泻痢片的质量控制。

[关键词] 小儿泻痢片; 白芍; 黄连; 盐酸小檗碱; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0099-03

Quality Standard of Xiao'er Xieli Tablet

GAO Yu-qiong, LIU Wen-wei, LI Feng, LIU Jian-hua*, HUO Xin, YANG Nai-jia
(Guizhou Institute of Biotechnology Research and Development, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Xiao'er Xieli tablet. **Method:** *Radix paeoniae alba* was identified by TLC. The content of berberine hydrochloride was determined by HPLC. **Result:** The TLC spots were clear and well-separated. The linear range of berberine hydrochloride was $0.03\text{-}0.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9999$), the average recovery was 97.36% ($\text{RSD} 1.41\%$, $n = 6$). **Conclusion:** The method is practicable, simple and sensitive. It can be used for the quality control of Xiao'er Xieli Tablet.

[Key words] Xiao'er Xieli tablet; *Radix paeoniae alba*; *Rhizoma coptidis*; berberine hydrochloride; TLC; HPLC

[收稿日期] 20101230(004)

[第一作者] 高玉琼, 研究员, 博士, 从事药学研究, Tel: 0851-5713626, E-mail: gaoyuqiong388@163.com

[通讯作者] * 刘建华, 研究员, 从事生物技术制药研究, Tel: 0851-5792246, E-mail: liujianhua58@yahoo.com.cn

小儿泻痢片属复方中药制剂, 功能清热化湿, 止泻止痢, 在临床上用于湿热腹泻, 红、白痢疾等症, 由葛根、黄芩、黄连、厚朴、白芍、茯苓、焦楂、乌梅、甘草、滑石粉组成, 收载于卫生部药品标准《中药成方制剂》第 19 册, 原部颁标准除显微镜观察及化学鉴

[2] 汪红, 王强. HPLC 法测定复方丹参制剂中丹参有效成分的含量[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(3): 219.
[3] 闫豫君, 杨广德, 贺浪冲, 等. RP-HPLC 法同时测定丹参中丹参酮 II_A 和隐丹参酮的含量[J]. 中草药, 2002, 33(4): 363.
[4] 陈蕾, 朱霁虹. 丹参中 4 种脂溶性成分的含量测定[J]. 中国药事, 2004, 18(12): 749.
[5] 柳涛. HPLC 法测定药典方丹参片中丹参酮 II_A 及丹酚酸 B 的含量[J]. 药物研究, 2008, 5(23): 30.
[6] 杨锁成, 汪坤, 张振凌. HPLC 同时测定复方丹参降浊丸中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B[J]. 中国实验方剂学杂

志, 2011, 17(9): 84.
[7] 谭生建, 陈培让, 王建社. RP-HPLC 法测定抗栓宝心片中丹参酮 II_A 含量[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 154.
[8] 张荣, 王涛, 何思敏. 丹参-三七药对不同配伍比例对丹参素含量的影响[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(8): 49.
[9] 游燕, 徐国良, 张启云, 等. RP-HPLC 同时测定复方丹参片中多种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 50.

[责任编辑 蔡仲德]