

RP-HPLC 同时测定复方丹参片中多种有效成分的含量

游燕¹, 徐国良², 张启云², 汤喜兰², 郑琴², 杨明^{2*}

(1. 南昌大学第四附属医院, 南昌 330003;

2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱, 切换波长-梯度洗脱法同时测定复方丹参制剂中 9 个有效成分的含量。方法: 应用反相 C₁₈ 柱; 以乙腈 - 0.1% 磷酸溶液作为梯度洗脱流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 281, 203, 270 nm; 柱温 30 。结果: 9 个成分的峰面积与浓度的线性关系良好 ($r > 0.999 0$); 回收率为 94.87% ~ 104.31%。结论: 此方法可作为复方丹参制剂多成分质量控制的标准。

[关键词] 高效液相色谱法; 复方丹参片; 有效成分; 切换波长

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0050-04

Determination of Multiple Active Components in Complex Prescription of *Salvia miltiorrhiza* by RP-HPLC

YOU Yan¹, XU Guo-Liang², ZHANG Qi-Yun², TANG Xi-Lan², ZHENG Qin², YANG Ming^{2*}

(1. The Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To develop an HPLC method for determination of nine active components in complex prescription of *salvia miltiorrhiza* Bunge by wavelength switching. **Method:** This HPLC assay was performed on a reversed-phase C₁₈ column with gradient elution of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, detecting wavelength was at 281, 203 and 270 nm, and column temperature was 30 . **Result:** Nine components were linear ($r > 0.999 0$) in the range of the test concentration, and the recoveries of the method were between 94.87% - 104.31%, respectively. **Conclusion:** This method is suitable for the quality control of this commonly used complex prescription.

[Key words] HPLC; complex prescription of *salvia miltiorrhiza* bunge; multiple active components; wavelength switching

复方丹参片主要用于治疗冠心病、心绞痛, 被国家列入临床急救必备的药物之一。由丹参 *Salvia miltiorrhiza*、三七 *Panax notoginseng* 和冰片组成。研究表明, 丹参的活性成分主要为二萜醌类脂溶性及丹参酚酸类水溶性成分, 具有抗氧化、抗动脉粥样硬

化、降低心肌耗氧量等心血管作用及抗肿瘤作用^[1-4]; 三七皂苷具有扩张血管、降低心肌耗氧量、抑制血小板凝集、延长凝血时间、降血脂、清除自由基、抗炎、抗氧化等药理作用^[5]。因此, 建立一种对复方丹参片中丹参和三七中多种活性成分进行定量分析方法, 有助于有效的控制复方丹参的质量。

《中国药典》2005 年版中复方丹参片的质量标准仅有脂溶性成分丹参酮 A 和水溶性成分丹酚酸 B 的含量测定项^[6], 近年来, HPLC-DAD, HPLC-MS^[7-9] 等检测方法广泛被运用, 可涉及的指标成分

[收稿日期] 2009-09-03

[基金项目] 国家十一五支撑计划(2006BAI09B08-01)

[通讯作者] * 杨明, Tel: 0791-7119118; E-mail: yangmin16@126.com

尚不全面,不能很好的反映复方丹参制剂的特性。本文运用高效液相色谱-梯度洗脱、切换检测波长的方法,检测复方丹参片中丹参及其三七 9 种有效成分含量。

1 材料

Agilent1200 系列高效液相色谱仪;包括 G1311A 四元梯度泵、G1322A 真空脱气器、G1316A 柱温箱、G1314B 紫外检测器和 7725I 手动进样器。色谱柱 Agilent XDB-C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm);1/万电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。复方丹参片(江西,批号 071006, 070515, 070408;广州,批号 20070702;广西,批号 20070808;安徽,批号 20071214)均为市售药品。对照品:丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 A、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_g₁、人参皂苷 R_b₁(中国药品生物制品检定所提供),纯度均 >98%;甲醇(色谱纯,山东禹王试剂)、乙腈(Tedia, USA)为色谱醇;水为双蒸水。其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的配制 精密称取各对照品,以 70% 的甲醇(隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 A 加甲醇)配制成丹参素(91.5 mg·L⁻¹)、原儿茶醛(74.2 mg·L⁻¹)、丹酚酸 B(267.5 mg·L⁻¹)、隐丹参酮(192.5 mg·L⁻¹)、丹参酮 I(140.8 mg·L⁻¹)、丹参酮 A(150.2 mg·L⁻¹)、三七皂苷 R₁(342.5 mg·L⁻¹)、人参皂苷 R_g₁(430.4 mg·L⁻¹)、人参皂苷 R_b₁(437.5 mg·L⁻¹)的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的配制 复方丹参片 10 片,除去包衣,精密称重,计算平均片重,并研磨成粉末,准确称取 0.5 g,置 50 mL 棕色量瓶中,70% 甲醇水溶液定容。超声提取 30 min,放冷,加入 70% 甲醇水溶液补足质量。溶液过 0.45 μm 滤膜,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm);流动相(A)乙腈-(B)0.1% 磷酸溶液,梯度洗脱,洗脱程序 0~10 min, 5%~17% A;10~22 min, 17%~21% A;22~42 min, 21%~31% A;42~55 min, 31%~35% A;55~65 min, 35%~65% A;65~80 min, 65%~80% A。检测波长 0~15 min, 281 nm;15~60 min, 203 nm;60~80 min, 270 nm。柱温 30 ;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。分离结果见图 1。

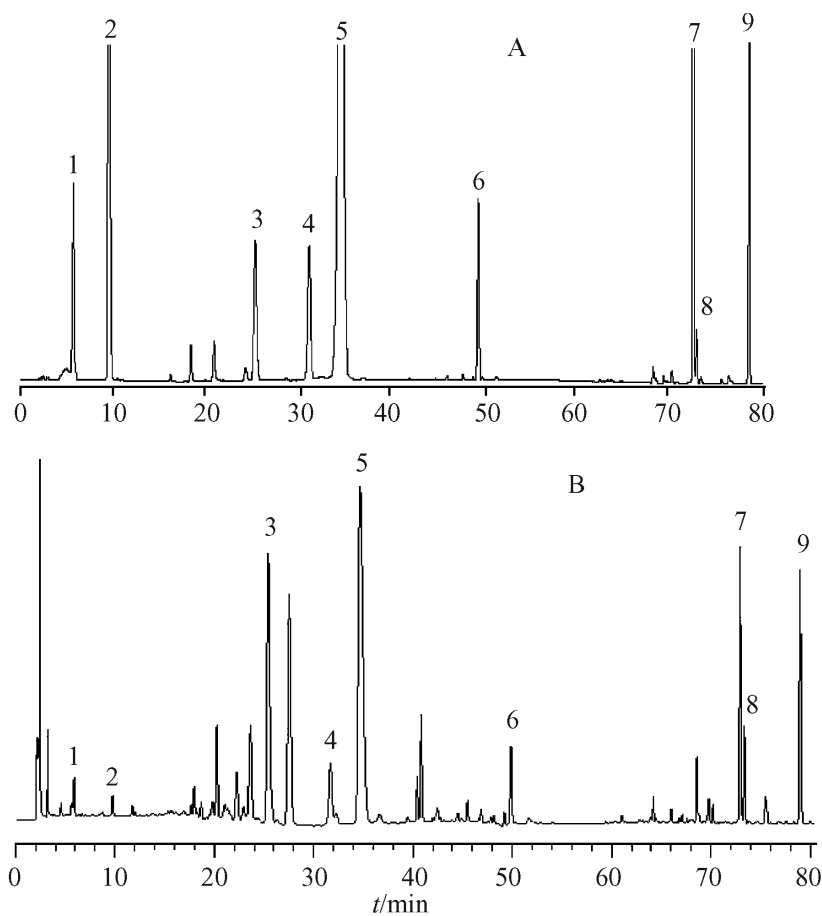


图 1 标准溶液(A)、样品溶液(B)

1. 丹参素;2. 原儿茶醛;3. 三七皂苷 R₁;4. 人参皂苷 R_g₁;
5. 丹酚酸 B;6. 人参皂苷 R_b₁;7. 隐丹参酮;
8. 丹参酮 I;9. 丹参酮 A

3 结果

3.1 线性关系和检出限 分别精密吸取混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL, 置 1 mL 量瓶中,定容至刻度,进样 20 μL,按试验方法项下的色谱条件测定(n=3),记录色谱图及峰面积。以对照品的进样量(μg)为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求出回归方程。取混合对照品溶液,用 70% 甲醇水溶液依次稀释制成一系列由高到低的梯度浓度溶液,测定峰面积为噪音 3 倍时进样浓度的检出限(LOD),结果见表 1。三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_g₁、人参皂苷 R_b₁ 的 LOD 比其他化合物偏高,在文献中曾有报道^[10-11]。

3.2 仪器精密度试验 取 2.1 项下浓度,连续进样 5 次,测得峰面积,结果见表 2。

3.3 样品溶液的稳定性试验 精密吸取同一批样品溶液,每隔 5 h 测 1 次,连续测 5 次,其 RSD 分别为原儿茶醛 RSD 0.91%;丹参素 RSD 1.03%;丹酚酸 B RSD 2.32%;三七皂苷 R₁ RSD 1.73%;人参皂苷 R_g₁ RSD 1.41%;人参皂苷 R_b₁ RSD 2.82%;隐丹参酮 RSD 1.49%;丹参酮 I RSD 2.52%;丹参酮 A RSD 2.78%。结果表明,供试品溶液在 25 h 内基本稳定。

表 1 9 种成分线性关系和检出限

成分	回归方程	相关系数	线性范围 / mg·L ⁻¹	检出限 / mg·L ⁻¹
丹参素	$Y=5\ 716X-132$	0.999 3	325.000 ~3.250	3.250
原儿茶醛	$Y=37\ 527X-1\ 195$	0.999 3	370.000 ~0.185	0.185
丹酚酸 B	$Y=38\ 513X-1\ 055$	0.999 0	1070.000 ~5.350	5.350
隐丹参酮	$Y=25\ 318X-683$	0.999 9	385.000 ~3.850	3.850
丹参酮 I	$Y=1\ 329X-29$	0.999 8	560.000 ~2.800	2.800
丹参酮 _A	$Y=12\ 399X-269$	0.999 7	300.000 ~3.000	3.000
三七皂苷 R ₁	$Y=2\ 799X-64$	0.999 9	685.000 ~6.850	6.850
人参皂苷 Rg ₁	$Y=2\ 739X-208$	0.999 0	860.000 ~8.600	8.600
人参皂苷 Rb ₁	$Y=2\ 799X-64$	0.999 3	875.000 ~8.750	8.750

表 2 日间日内精密度 %

成分	日内 RSD		日间 RSD	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
丹参素	0.73	1.30	0.87	1.91
原儿茶醛	1.08	0.09	1.09	0.55
丹酚酸 B	0.76	0.24	0.67	2.48
隐丹参酮	0.13	0.30	0.17	1.31
丹参酮	0.15	0.04	0.09	1.16
丹参酮 _A	0.15	0.23	0.11	2.45
三七皂苷 R ₁	0.54	0.29	0.74	1.30
人参皂苷 Rg ₁	0.48	1.12	0.45	2.77
人参皂苷 Rb ₁	0.07	2.24	0.09	3.37

3.4 重复性试验 取一批样品称重 5 份, 分别依样品溶液制备方法操作, 进样测定, 结果各化合物的 RSD 均小于 3%, 表明其重复性良好。

3.5 加样回收试验 称取已知含量的供试品 3 份, 分别加入适量混合对照品溶液, 按供试品溶液的

制备方法操作, 结果见表 3。

表 3 9 种成分的回收率 (n=3)

成分	样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	RSD / %
丹参素	16.30	15.35	31.68	100.20	2.78
原儿茶醛	2.68	2.28	4.89	97.37	2.99
丹酚酸 B	472.69	532.5	1025.36	103.78	1.22
隐丹参酮	25.47	19.00	44.47	99.99	1.34
丹参酮	173.08	164.13	329.54	95.33	2.67
丹参酮 _A	60.12	35.58	93.87	94.87	3.36
三七皂苷 R ₁	304.02	300.00	605.33	100.43	3.55
人参皂苷 Rg ₁	97.84	70.18	165.66	96.64	1.03
人参皂苷 Rb ₁	82.39	58.58	143.49	104.31	1.69

3.6 样品含量测定 按照 2.2 供试品溶液制备的方法处理样品 3 份, 按 2.3 色谱条件下分别测定丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮_A 含量, 结果见表 4。

表 4 不同产家复方丹参片中有效成分的含量 (x̄±s, n=3)

No.	丹参素	原儿茶醛	丹酚酸 B	隐丹参酮	丹参酮	丹参酮 _A	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Rb ₁
071006	3.20 ±0.17	0.21 ±0.01	11.79 ±0.64	0.96 ±0.01	1.11 ±0.00	2.48 ±0.01	1.34 ±0.07	4.63 ±0.15	5.05 ±0.03
070515	2.17 ±0.04	0.22 ±0.03	11.04 ±0.71	0.82 ±0.03	1.08 ±0.01	2.03 ±0.03	1.01 ±0.10	4.91 ±0.10	4.70 ±0.03
070408	1.43 ±0.11	0.16 ±0.01	10.69 ±0.04	1.00 ±0.01	1.15 ±0.03	2.05 ±0.04	1.31 ±0.03	4.36 ±0.02	4.41 ±0.02
20070702	2.79 ±0.05	0.23 ±0.04	8.20 ±0.08	0.80 ±0.01	1.33 ±0.04	2.38 ±0.01	0.78 ±0.04	3.07 ±0.01	2.92 ±0.02
20070808	2.71 ±0.42	0.14 ±0.00	12.66 ±0.54	0.87 ±0.03	1.13 ±0.01	2.56 ±0.01	1.29 ±0.01	5.69 ±0.10	5.65 ±0.24
20071214	2.89 ±0.16	0.19 ±0.00	11.97 ±0.33	1.30 ±0.02	1.59 ±0.06	3.73 ±0.02	1.22 ±0.06	4.11 ±0.34	5.07 ±0.02

4 讨论

由于丹酚酸 B 具有很强的亲水性及酸性, 比较了甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液对样品的分离效果。当采用乙腈-0.1% 甲酸水溶液时, 丹酚酸 B 与人参皂苷 Rg₁

分离困难, 丹酚酸 B 的峰形明显展宽, 对称性差。而采用甲醇-0.1% 磷酸水溶液系统时, 在切换波长处基线飘移大, 结果表明, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液优于其他梯度洗脱系统。

比较了多种提取方法, 结果表明: 回流提取温度

较高,丹参酮_A的提取回收率为 68%,脂溶性成分易分解;而常温超声能避免上述缺陷。实验考察了不同浓度的甲醇水溶液对复方丹参片粉末的超声提取效果,结果表明在纯水和 100% 甲醇中丹酚酸 B 的提取回收率低。综合考虑多种因素,采用常温超声提取法制备样品溶液,简单、稳定。

本试验采用梯度洗脱、切换检测波长的方法,一次性检测复方丹参制剂中脂溶、水溶性成分及其三七成分,本方法相对简单、具有良好的精密度、重复性和可靠性,适用于全面评价复方丹参制剂质量。

[参考文献]

- [1] 高玉桂,宋玉梅,杨友义,等.丹参酮的药理[J].药学学报,1979,14:752.
- [2] 高玉桂,王灵芝,唐冀雪.丹参的药理作用及临床应用[J].中西医结合杂志,1990,10(4):45.
- [3] 梁勇,羊裔明,袁淑兰.丹参药理作用及临床应用研究进展[J].中草药,2000,31(4):304.
- [4] 陈向荣,陆京伯,石汉平.丹参的药理作用研究新进展[J].中国医院药学杂志,2001,21(1):44.
- [5] 马珂,汤金土.三七皂甙的实验研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2002,12(3):197.
- [6] 中国药典.一部[S].2005:527.
- [7] QU HB, ZHAI XJ, SHAO Q, et al. Simultaneous deter-

mination of seven active compounds in radix salviae miltiorrhizae by temperature-controlled ultrasound-assisted extraction and HPLC [J]. Chromatographia, 2007, 66: 21.

- [8] LI L, ZHANG J L, SHENG Y X, et al. Simultaneous quantification of six major active saponins of *Panax notoginseng* by high-performance liquid chromatography-UV method [J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 38: 45.
- [9] SHI Z H, HE J T, YAO T T, et al. Simultaneous determination of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone A in traditional Chinese medicinal preparations containing Radix salvia miltiorrhiza by HPLC [J]. Pharm Biomed Anal, 2005, 37:481.
- [10] MA L J, ZHANG X Z, GUO H, et al. Determination of four water-soluble compounds in *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system [J]. Chromatography B, 2006, 833: 260.
- [11] LU Y, YU K, QU H B, et al. Development of an HPLC-UV-ELSD method for quantification of multiple components of a Chinese medicine made from Radix *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* [J]. Chromatographia, 2007, 65:19.

[责任编辑 顾雪竹]