

HPLC同时测定心可舒片中 3种有效成分

廖正根,赵国巍,梁新丽,王光发(现代中药制剂教育部重点实验室,江西中医学院,南昌 330004)

摘要:目的 建立同时测定心可舒片中 3种有效成分——葛根素、丹参酮 II A和熊果酸含量的 HPLC。方法 C_{18} 色谱柱,梯度洗脱,流动相为乙腈-水(含 0.3%磷酸),流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,MWD检测器。结果 葛根素、丹参酮 II A和熊果酸的线性范围分别为 $52.6\sim 262.8$ 、 $4.2\sim 21.1$ 和 $20.5\sim 102.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, r 值分别为 0.999 7、0.999 9和 0.999 7;平均加样回收率分别为 100.63%、97.08%和 96.92%,RSD分别为 1.4%、1.3%和 1.4%。结论 该方法准确,操作简便,又可降低质量检验成本,可以用于心可舒片的质量控制。

关键词:葛根素;丹参酮 II A;熊果酸;心可舒片;HPLC

中图分类号:R917.101;R927.2

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2008)06-0536-04

The Simultaneous Determination of Three Major Bioactive Components in Xinkeshu Tablets by HPLC

LIAO Zheng-gen, ZHAO Guo-wei, LIANG Xin-li, WANG Guang-fa (Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiang Xi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of puerarin, tanshinone II A and ursolic acid in Xinkeshu tablets as three major bioactive components. **METHODS** A C_{18} column was used. The chromatography was carried

作者简介:廖正根,男,博士,副教授

Tel: (0791) 7119011

E-mail: lyzlyg@163.com

out with a stepwise gradient programming. The mobile phase was acetonitrile-water (containing 0.3% phosphorous) and the flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **RESULTS** The linear ranges of puerarin, tanshinone II A and ursolic acid were $52.6 \sim 262.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r = 0.9997$, $4.2 \sim 21.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r = 0.9999$ and $20.5 \sim 102.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r = 0.9997$, respectively. The average recovery rates of puerarin, tanshinone II A and ursolic acid were 100.63% with RSD 1.4%, 97.08% with RSD 1.3% and 96.92% with RSD 1.4%, respectively. **CONCLUSION** The method is successfully applied to analyze three major bioactive components in Xinkeshu tablets. This method is simple, accurate and effective for the quality control of Xinkeshu tablets.

KEY WORDS puerarin; tanshinone II A; ursolic acid; Xinkeshu tablets; HPLC

心可舒片收载于部颁标准第十五册,处方为山楂 375 g, 丹参 375 g, 葛根 375 g, 三七 25 g, 木香 25 g, 具有活血化瘀、行气止痛的功能,用于气滞血瘀型冠心病引起的胸闷、心绞痛、高血压、头晕、颈项疼痛及心律失常、高血脂等症^[1]。其中葛根素^[2]、丹参酮 II A^[3]和熊果酸^[4]均为其中的有效成分。但未见采用 HPLC 测定心可舒片中熊果酸的含量,及同时测定葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸 3 种有效成分含量方法的报道。为降低工作量,减少检验成本,且能全面有效地控制产品质量,笔者采用 HPLC 法同时对心可舒片中的有效成分葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸进行了含量测定。

1 仪器与试药

Agilent 1200 全自动液相色谱仪。心可舒片为市场购得;葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸对照品均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用;水为重蒸水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent ZOBAX SB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相:乙腈-水 (含 0.3% 磷酸),洗脱条件为:0~12 min 乙腈-水 (12:88);12~23 min 乙腈由 12% 线性增加到 84%;23~23.1 min 乙腈-水 (84:16);23.1~35 min 乙腈由 84%

线性递减到 67%;23.1~35 min 乙腈-水 (67:33)。流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 25 °C,检测波长 250 nm (0~12 min),270 nm (12~23 min),210 nm (23~35 min)。

2.2 对照品储备溶液的制备

精密称取丹参酮 II A 对照品 4.22 mg 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀。精密称取葛根素对照品 13.14 mg 和熊果酸对照品 5.13 mg 置于 50 mL 量瓶中,加入丹参酮 II A 对照品溶液 2.5 mL,再加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀即得混合对照品储备液 (葛根素 $262.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹参酮 II A $21.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和熊果酸 $102.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 10 片除去包衣,研细,精密称取细粉 0.1 g 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,超声处理 30 min 放至室温,补甲醇至原刻度,过滤,作为供试品溶液。取空白片粉 (取除葛根外其他成分按处方量混合) 按供试品溶液制备方法制备葛根的阴性供试品溶液。同法分别制备丹参和山楂的阴性供试品溶液。

2.4 系统适用性试验

在上述色谱条件下,葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸的理论塔板数分别大于 6000、7000 和 3000,葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸与其相邻峰基线分离。阴性供试品溶液对测定无干扰,见图 1。

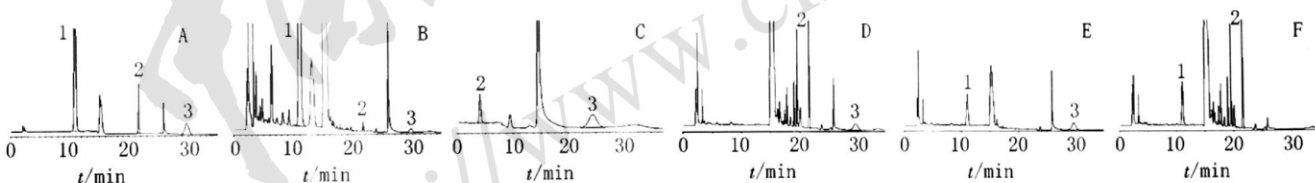


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-2、3峰放大图; D-葛根阴性供试品溶液; E-丹参阴性供试品溶液; F-山楂阴性供试品溶液; 1-葛根素; 2-丹参酮 II A; 3-熊果酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A- control solution; B- sample solution; C- enlarged chromatogram of 2 and 3 peaks; D- Gegen negative sample solution; E- salvia negative sample solution; F- havthom negative sample solution; 1- puerarin; 2- tanshinone II A; 3- ursolic acid

2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品储备液 (葛根素 $262.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹参酮 II A $21.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和熊果酸 $102.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 \text{ mL}$ 置于 1 mL 量瓶中,加甲醇配成系列含量的混合对照品溶液。精密吸取上述各混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,在上述色谱条件下测定,并以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X ($n = 3$) 为横坐标进行线性回归,得葛根素的回归方程为 $Y = 39.21X + 14.644$, $r = 0.9997$,在 $52.6 \sim 262.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系;丹参酮 II A 的回归

方程为 $Y = 3.1883X + 1.0602$, $r = 0.9999$,在 $4.2 \sim 21.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系;熊果酸的回归方程为 $Y = 16.247X + 3.3757$, $r = 0.9997$,在 $20.5 \sim 102.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。

2.6 重复进样精密度试验

精密吸取上述对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,重复进样 6 次,测定色谱峰面积,计算葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸的 RSD 分别为 1.3%, 1.7% 和 1.4%。结果表明重复进样精密度良好。

2.7 重复性试验

取上述供试品,分别精密称取 6 份,每份 0.1 g,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,测定含量,按照回归方程计算葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸的色谱峰面积。结果葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸的含量平均值分别为 21.586,0.201 和 1.593 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.6%,1.8%和 1.5%。

2.8 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 10 μL,按 0,2,4,6,8 h 时间间隔,分别进样分析,测定葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸的色谱峰表 1 葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸加样回收率实验

Tab 1 Recovery of puerarin, tanshinone II A and ursolic acid

测定成分	取样量 /g	理论值 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
葛根素	0.051 2	1.105 4	1.314 0	2.436 8	100.72	100.63	1.4
	0.050 1	1.081 6		2.377 3	99.24		
	0.052 6	1.135 6		2.505 9	102.30		
	0.050 8	1.096 8		2.380 9	98.76		
	0.051 7	1.116 2		2.475 2	101.85		
	0.053 1	1.146 4		2.487 2	101.09		
丹参酮 II A	0.051 2	0.009 8	0.105 5	0.113 3	98.26	97.08	1.3
	0.050 1	0.009 6		0.112 2	97.48		
	0.052 6	0.010 1		0.113 5	98.18		
	0.050 8	0.009 7		0.109 6	95.14		
	0.051 7	0.009 9		0.110 4	95.67		
	0.053 1	0.010 2		0.113 1	97.75		
熊果酸	0.051 2	0.081 1	0.513 0	0.565 7	95.22	96.92	1.4
	0.050 1	0.079 4		0.570 9	96.37		
	0.052 6	0.083 3		0.587 9	98.59		
	0.050 8	0.080 5		0.582 6	98.16		
	0.051 7	0.081 9		0.581 7	97.78		
	0.053 1	0.084 1		0.569 7	95.41		

2.10 样品含量测定

取 3 个批号的心可舒片内容物,每批各 3 份,每份约 0.1 g,按供试品溶液制备方法及色谱条件进行测定,根据回归方程计算含量,结果见表 2。

表 2 样品中熊果酸、丹参酮 II A 和葛根素含量测定结果 (n = 3)

Tab 2 Determination of ursolic acid, tanshinone II A and puerarin in samples(n = 3)

批号	葛根素 /mg·g ⁻¹	RSD /%	丹参酮 II A /mg·g ⁻¹	RSD /%	熊果酸 /mg·g ⁻¹	RSD /%
050441	21.642	1.1	0.199	1.6	1.615	1.2
060433	21.586	1.6	0.201	1.8	1.593	1.5
060434	21.590	1.7	0.192	1.9	1.584	1.4

3 讨论

3.1 建立了 HPLC 同时测定心可舒片中的有效成分葛根素、丹参酮 II A 和熊果酸的含量,该方法精密度高,重复性好,适宜心可舒片中 3 个有效成分的同时测定。采用同一供试品制备方法,同时测定多个有效成分,可以降低质量检验成本。

3.2 原部颁标准仅对心可舒片中山楂的有效成分熊果酸进行了鉴别,刘冰等^[5]采用 HPLC 对葛根素和丹参酮 II A 进行

面积,三者的 RSD 分别为 1.4%,1.9%和 1.2%。

2.9 加样回收率试验

称取已知含量的供试品 6 份,每份 0.5 g,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入混合对照品溶液 5 mL,按照供试品溶液制备方法制备并测定。本方法葛根素的加样回收率在 98.76%~101.85%之间,RSD 为 1.4%;丹参酮 II A 的加样回收率在 95.14%~98.26%之间,RSD 为 1.3%;熊果酸的加样回收率在 95.22%~98.59%之间,RSD 为 1.4%,见表 1。

了含量测定,但没有检测山楂的质量控制项。本试验建立了 3 个有效成分同时进行含量测定的方法,有利于更为全面地控制心可舒片的质量,也可建立其它多成分制剂的含量测定方法提供参考。

3.3 张冬梅等^[6]采用 HPLC 同时测定心可舒片中葛根素和丹参酮 II A 的含量时,葛根素在 4 min 左右出峰。本实验发现,葛根素的出峰时间过早会使供试品溶液的含量测定受到杂质峰的干扰,因此采用梯度洗脱,延长葛根素出峰时间至 11 min 左右。

对乙腈-水和乙腈-水(含 0.3%磷酸)进行了比较,结果发现在流动相中加入 0.3%磷酸,得到色谱图的峰形较好。

REFERENCES

[1] Standard by People's Republic of China medical department, Chinese traditional medicine 15 th fascicle (中华人民共和国卫生部部颁标准, 中药第十五分册) [S]. 2000: 90.

[2] YIN H, YUAN Q, DONG X Y, *et al*. RP-HPLC determination of puerarin in Xinkeshu tablet [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2006,17(6): 455-457.

[3] WU G, HE Z B, WU H B. The researching advancement of pharmacology of tanshinone [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2005,14(10): 1382-1385.

[4] LI G H, SUN J Y, ZHANG X L, *et al*. Experimental studies on antihyperlipidemia effects of two compositions from hawthorn in mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(1): 50-52.

[5] LIU B, XU Y B, WANG R H. Simultaneous determination of puerarin and tanshinone II A in Xinkeshu Capsule by HPLC [J].

Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(5): 669-671.

[6] ZHANG D M, LIU B, SAN Y. Simultaneous determination of the contents of puerarin and tanshinone II A in Xinkeshu tablets by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2005, 14(7): 41-42.

收稿日期: 2007-11-27