

HPLC-DAD 同时测定益心通胶囊中 6 种活性成分的含量

刘斌(泰安市食品药品检验检测中心, 山东 泰安 271000)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定益心通胶囊中葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚 6 种活性成分含量的方法。方法 采用 XSELECT™ HSS C₁₈ 色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 阿魏酸、毛蕊花糖苷和丹酚酸 B 为 220 nm, 葛根素为 250 nm, 龙胆苦苷和丹皮酚为 275 nm。结果 葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的线性范围分别为 7.56~113.4 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$), 4.36~65.4 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$), 1.18~17.7 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 3$), 1.90~28.5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 4$), 4.48~67.2 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 3$) 和 11.7~175.5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$), 平均加样回收率分别为 98.7%, 97.8%, 97.6%, 98.6%, 99.0%, 98.7%, RSD 分别为 1.0%, 1.3%, 1.4%, 1.1%, 1.2%, 1.3%。结论 本法专属性强, 结果准确, 重现性好, 可用于益心通胶囊的质量控制。**关键词:** 高效液相色谱-二极管阵列检测器; 益心通胶囊; 葛根素; 龙胆苦苷; 阿魏酸; 毛蕊花糖苷; 丹酚酸 B; 丹皮酚; 含量

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)14-1792-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.14.013

引用本文: 刘斌. HPLC-DAD 同时测定益心通胶囊中 6 种活性成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1792-1796.

Simultaneous Determination of Six Kinds of Components in Yixintong Capsules by HPLC-DAD

LIU Bin(Taian Testing Center for Food and Drug Control, Tai'an 271000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-DAD method for determination of six bioactive components in Yixintong capsules, including puerarin, gentiopicroside, ferulic acid, acteoside, salvianolic acid B and paeonol. **METHODS** A stable HPLC method was established and the chromatography was accomplished on a XSELECT™ HSS C₁₈ column, the mobile phase consisted of methanol(A)-0.2% phosphoric acid(B) in a gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was set at 30 ℃. The detection wavelength was set at 220 nm for paeoniflorin, acteoside and salvianolic acid B, 250 nm for puerarin, 275 nm for gentiopicroside and paeonol, respectively. **RESULTS** The linear ranges of puerarin, gentiopicroside, paeoniflorin, acteoside, salvianolic acid B and paeonol were 7.56~113.4 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$), 4.36~65.4 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$), 1.18~17.7 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 3$), 1.90~28.5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 4$), 4.48~67.2 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 3$) and 11.7~175.5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$), respectively. The average recoveries were 98.7%, 97.8%, 97.6%, 98.6%, 99.0% and 98.7%, RSD were 1.0%, 1.3%, 1.4%, 1.1%, 1.2% and 1.3%. **CONCLUSION** The method is specificity, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Yixintong capsules.

KEYWORDS: HPLC-DAD; Yixintong capsules; puerarin; gentiopicroside; ferulic acid; acteoside; salvianolic acid B; paeonol; content

益心通胶囊是由黄芪、葛根、龙胆、当归、熟地黄、丹参和牡丹皮等 15 味中药组成的胶囊剂, 为泰安市中医医院生产的一种医疗机构制剂。经过多年的中医临床应用和现代中药药理学研究表明, 益心通胶囊具有益气养阴, 化瘀通络, 活血止痛的功效, 可用于气阴两虚, 瘀血阻络所致的胸痹心痛, 亦可用于冠心病和心绞痛的治疗。其中葛根具有解肌退热, 生津止渴的作用, 其有效成分葛根素具有降低血压, 减缓心率, 扩张冠状血管, 改善心肌的作用^[1-2]; 龙胆具有清热燥湿, 泻肝胆火的作用, 龙胆苦苷具有保护心肌, 护肝,

消炎等作用^[3-4]; 当归具有补血活血, 调经止痛, 润肠通便的作用, 其有效成分阿魏酸具有抗凝, 降压, 抗氧化的作用^[5-6]; 熟地黄具有补血滋阴, 益精填髓的作用, 其有效成分毛蕊花糖苷具有增强机体造血, 增强免疫力, 抗氧化等作用^[7-8]; 丹参具有活血祛瘀, 通经止痛的作用, 其有效成分丹酚酸 B 具有保护心肌, 保护心脏, 抗纤维化的作用^[9-10]; 牡丹皮具有清热凉血, 活血化瘀的作用, 其有效成分丹皮酚具有抗心律失常, 保护心血管, 保肝护肾的作用^[11-12]。目前对于上述几种成分的含量测定方法均有报道^[13-20], 但未见关于益心通

作者简介: 刘斌, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0538)5357512

E-mail: 185799841@qq.com

· 1792 · Chin J Mod Appl Pharm, 2019 July, Vol.36 No.14

中国现代应用药学 2019 年 7 月第 36 卷第 14 期

胶囊中多成分含量测定方法的研究。益心通胶囊的质量标准仅有其君药黄芪的薄层鉴别,无含量测定项目。本研究以葛根中的葛根素,龙胆中的龙胆苦苷,当归中的阿魏酸,熟地黄中的毛蕊花糖苷,丹参中的丹酚酸 B 和牡丹皮中的丹皮酚为定量指标,根据 6 种成分紫外吸收特征的不同,采用 HPLC-DAD 在 3 个紫外波长下同时测定益心通胶囊中该 6 种成分的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 Infinity II 高效液相色谱仪(DAD 检测器,美国 Agilent 公司);XS205DU 型十万分之一电子天平(Mettler Toledo)。

1.2 试剂

葛根素对照品(批号:110752-201514;含量:95.5%)、龙胆苦苷对照品(批号:110770-201314;含量:99.1%)、阿魏酸对照品(批号:110773-201313;含量:99.6%)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201411;含量:94.4%)、丹酚酸 B 对照品(批号:111562-201212;含量:100%)、丹皮酚对照品(批号:110708-200506;含量:100%)均购自中国食品药品检定研究院;益心通胶囊(自制,每粒 0.35 g,批号:180601,180602,180603);乙腈(色谱纯,Fisher Scientific);磷酸(分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:XSELECT™ HSS C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),采用梯度洗脱(0~18 min, 5%→15%A; 18~19 min, 15%→20%A; 19~26 min, 20%A; 26~35 min, 20%→30%A; 35~36 min, 30%→40%A; 36~45 min, 40%A; 45~50 min, 40%→5%A;检测波长:阿魏酸、毛蕊花糖苷和丹酚酸 B 为 220 nm,葛根素为 250 nm,龙胆苦苷和丹皮酚为 275 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的分离度均>1.5,理论板数按葛根素色谱峰计算应≥5 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚

对照品适量,分别加甲醇制成浓度为 756, 436, 118, 190, 448, 1 170 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。再分别精密量取储备液 1 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 中分别含葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚 75.6, 43.6, 11.8, 19.0, 44.8, 117.0 μg 的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品 10 粒内容物,研细,混匀,取约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 350 W,频率 50 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性供试品溶液 按益心通胶囊处方,分别制备不含葛根、龙胆、当归、熟地黄、丹参和牡丹皮的益心通胶囊阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性供试品溶液。

2.3 空白试验

按“2.1”项下色谱条件,分别取对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液,依法测定,记录色谱图。结果表明,供试品溶液中葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的色谱峰与对照品溶液中的保留时间一致;阴性供试品溶液中,在与葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚对照品相同保留时间处无干扰峰,表明处方中其他药味对测定结果无影响。HPLC 图谱见图 1。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚对照品储备液各 0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成不同浓度的混合对照品溶液,依法测定。以浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归,葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的回归方程分别为 $A=18.67C-8.487(r=0.999\ 8)$ 、 $A=20.60C+1.425(r=0.999\ 7)$ 、 $A=62.73C-1.517(r=0.999\ 3)$ 、 $A=32.26C+14.31(r=0.999\ 4)$ 、 $A=15.51C-0.703(r=0.999\ 3)$ 和 $A=26.09C-6.816(r=0.999\ 7)$,线性范围分别为 7.56~113.4, 4.36~65.4, 1.18~17.7, 1.90~28.5, 4.48~67.2, 11.7~175.5 μg·mL⁻¹。

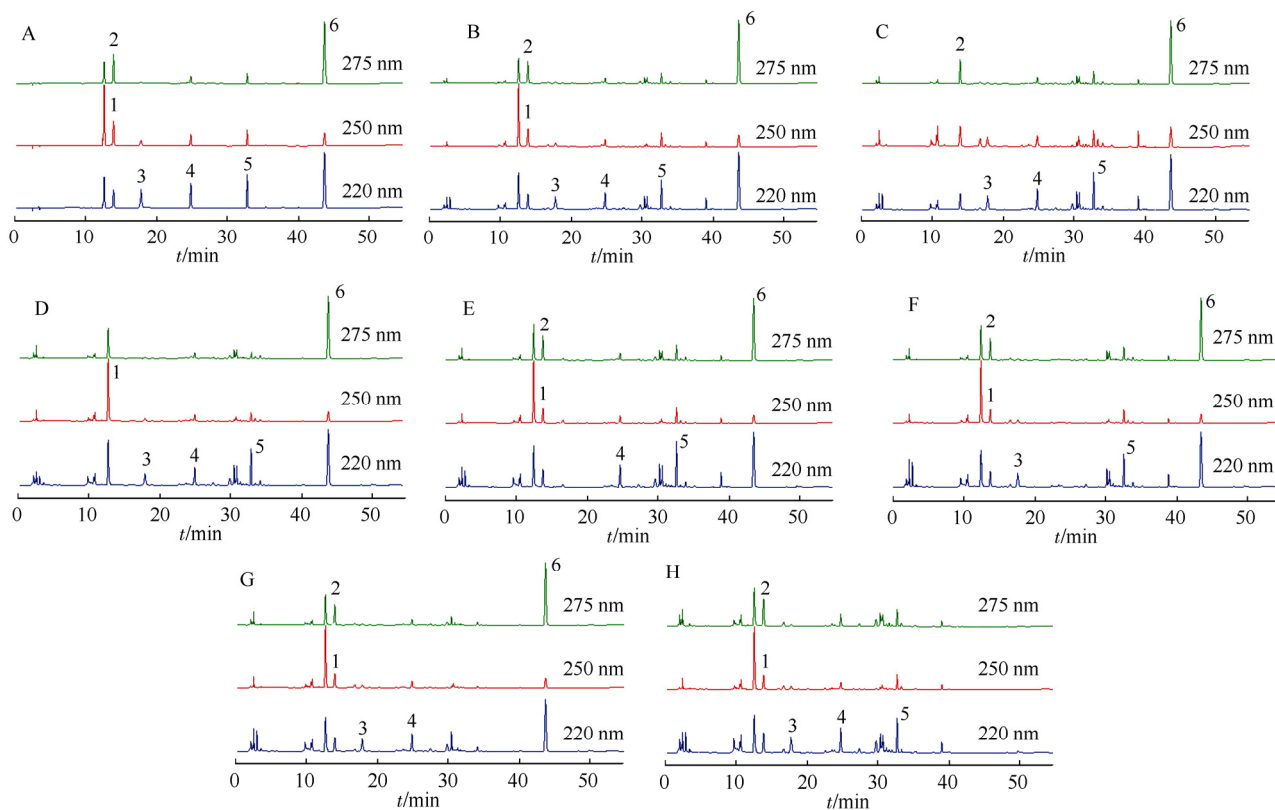


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品; C-缺葛根的阴性样品; D-缺龙胆的阴性样品; E-缺当归的阴性样品; F-缺熟地黄的阴性样品; G-缺丹参的阴性样品; H-缺牡丹皮的阴性样品; 1-葛根素; 2-龙胆苦苷; 3-阿魏酸; 4-毛蕊花糖苷; 5-丹酚酸 B; 6-丹皮酚。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixture reference substance; B-sample; C-negative sample without Puerariae Lobatae Radix; D-negative sample without Gentianae Radix et Rhizoma; E-negative sample without Angelicae Sinensis Radix; F-negative sample without Rehmanniae Radix Praeparata; G-negative sample without Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; H-negative sample without Moutan Cortex; 1-puerarin; 2-gentiopicroside; 3-ferulic acid; 4-acteoside; 5-salvianolic acid B; 6-paeonol.

2.5 仪器精密性试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,进样6次,测定峰面积,以峰面积考察各成分精密性,葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.4%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.3%, 结果表明仪器精密性良好。

2.6 重复性试验

取益心通胶囊(批号: 180601),按“2.2.2”项下平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的平均含量分别为 1.82, 1.03, 0.35, 0.42, 1.01, 2.74 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.8%, 0.9%, 1.0%, 0.9%, 0.6%, 0.9%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

取益心通胶囊(批号: 180601),按“2.2.2”项

下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进行测定,葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.6%, 0.8%, 0.8%, 0.5%, 0.6%, 表明供试品溶液各成分在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的益心通胶囊(批号: 180601)内容物适量,研细,称取约 0.5 g,共6份,精密称定,分别加入“2.2.2”项下的葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚峰对照品储备液 1.25 mL,照“2.2.2”项下方法制备加样回收供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别计算加样回收率,结果见表1,表明该方法的准确度良好。

表 1 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery test(n=6)

组分	称样量/ g	样品含 量/mg	加入量/ mg	测得总 量/mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
葛根素	0.510 2	0.918	0.945	1.845	99.03	98.7	1.0
	0.506 8	0.912	0.945	1.866	100.48		
	0.504 5	0.908	0.945	1.830	98.76		
	0.513 6	0.925	0.945	1.835	98.13		
	0.502 6	0.905	0.945	1.808	97.73		
	0.510 9	0.920	0.945	1.827	97.96		
龙胆苦 苷	0.510 2	0.520	0.545	1.040	97.65	97.8	1.3
	0.506 8	0.517	0.545	1.061	99.91		
	0.504 5	0.515	0.545	1.044	98.49		
	0.513 6	0.524	0.545	1.039	97.19		
	0.502 6	0.513	0.545	1.022	96.60		
	0.510 9	0.521	0.545	1.031	96.72		
阿魏酸	0.510 2	0.174	0.148	0.317	98.44	97.6	1.4
	0.506 8	0.172	0.148	0.319	99.69		
	0.504 5	0.172	0.148	0.310	96.88		
	0.513 6	0.175	0.148	0.317	98.14		
	0.502 6	0.171	0.148	0.308	96.55		
	0.510 9	0.174	0.148	0.309	96.00		
毛蕊花 糖苷	0.510 2	0.214	0.238	0.447	98.89	98.6	1.1
	0.506 8	0.213	0.238	0.450	99.78		
	0.504 5	0.212	0.238	0.440	97.78		
	0.513 6	0.216	0.238	0.443	99.77		
	0.502 6	0.211	0.238	0.438	97.55		
	0.510 9	0.215	0.238	0.442	97.57		
丹酚酸 B	0.510 2	0.510	0.560	1.063	99.34	99.0	1.2
	0.506 8	0.507	0.560	1.047	98.13		
	0.504 5	0.504	0.560	1.046	98.31		
	0.513 6	0.514	0.560	1.085	101.02		
	0.502 6	0.503	0.560	1.058	99.53		
	0.510 9	0.511	0.560	1.049	97.95		
丹皮酚	0.510 2	1.403	1.462	2.787	97.28	98.7	1.3
	0.506 8	1.394	1.462	2.829	99.05		
	0.504 5	1.387	1.462	2.814	98.77		
	0.513 6	1.412	1.462	2.826	98.33		
	0.502 6	1.382	1.462	2.869	100.88		
	0.510 9	1.405	1.462	2.801	97.70		

2.9 样品测定

取本品 3 批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,用外标法分别计算样品中葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚峰的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n=3)

Tab. 2 Determination results of samples(n=3)

批号	mg·g ⁻¹					
	葛根素	龙胆苦苷	阿魏酸	毛蕊花糖 苷	丹酚酸 B	丹皮酚
180601	1.80	1.02	0.34	0.42	1.00	2.75
180602	1.86	0.99	0.36	0.43	0.98	2.81
180603	1.78	1.00	0.34	0.44	1.03	2.77

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的考察

本研究分别测定了益心通胶囊中葛根素、龙胆苦苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、丹酚酸 B 和丹皮酚的含量。因为本品均为原粉入药,有效成分保留较好,6 种待测成分的含量值均在常量分析范围内。本研究分别以甲醇、70%甲醇溶液、50%甲醇溶液为溶媒,并分别采取超声 15, 30, 60 min 以及加热回流 60 min 制备供试品溶液。比较发现 6 种待测成分采用甲醇超声提取 30 min 效果较好,且操作简便,节约时间。

3.2 检测波长的选择

由于 6 种成分的紫外光谱差异较大,为了能同时检测 6 种活性成分,故采用 HPLC-DAD 多波长同时检测各成分的含量。阿魏酸在 230, 321 nm 波长处有较强特征吸收,毛蕊花糖苷在 218, 334 nm 波长处有较强特征吸收,丹酚酸 B 在 220, 288 nm 波长处有特征吸收,但 3 种成分均在 220 nm 波长处有较大吸收,且吸收值高,分离度好,故选择 220 nm 作为它们共同的测定波长;葛根素在 250 nm 波长处有最大吸收,且灵敏度高,无干扰峰,故选择此波长检测;龙胆苦苷在 244, 275 nm 波长处有较强特征吸收,丹皮酚在 214, 274 nm 波长处有较强特征吸收,但均在 275 nm 波长处有较大吸收,且吸收值高,灵敏度高,因此选择 275 nm 作为它们共同的测定波长。

3.3 流动相的选择

参照相关文献^[13-20],分别比较了甲醇-水、甲醇-0.2%磷酸溶液、乙腈-水和乙腈-0.2%磷酸溶液 4 种不同的流动相组成,结果发现以乙腈-0.2%磷酸为流动相,采用梯度洗脱的方法,6 种待测活性成分的保留时间适宜,峰型良好,分离度高。使用本法测定的专属性强,结果准确,重现性好,可用于益心通胶囊中 6 种成分的质量评价,综合控制益心通胶囊的药品质量。

REFERENCES

- [1] YIN L H, LI Y F, MENG F L. Puerarin's chemical composition pharmacological effects and clinical application [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2010, 23(3): 371-373.
- [2] 高风英. 葛根素药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(12): 附 7-附 8.
- [3] 刘涛, 才谦, 付玉芹, 等. 中药龙胆的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(1): 85-86.
- [4] GUO Q F, WANG W, HAN W Q. Progress on pharmacological action of gentiopicroside [J]. Guangdong Chem(广东化工), 2014, 41(17): 121, 128.
- [5] 李曦, 张丽宏, 王晓晓. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(5): 1023-1028.
- [6] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255.
- [7] ZHU Y, XU C. Pharmacological actions of radix rehmann praeparata and its active components: research advances [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2011, 7(11): 173-175.
- [8] 夏庆华, 路千里. 熟地黄药理研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(6): 96-97.
- [9] 马丙祥, 董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 663-665.
- [10] 王蓉, 原永芳. 丹酚酸 B 药理作用的研究概况[J]. 中医药导报, 2011, 17(4): 130-132.
- [11] 张健萍, 李连珍, 赵红江, 等. 牡丹皮的化学成分、药理作用及临床应用研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(5): 295-297.
- [12] HU Y F, XU G B. Pharmacological activities of cortex moutan radices and its main components of paeonol [J]. Anhui Med J(安徽医药), 2014, 18(4): 589-592.
- [13] LU X G, CHEN X, LI J, et al. Simultaneous determination of tanshinol protocatechualdehyde, salvianolic acid B, ferulic acid and puerarin in Tongmai particles by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(10): 1373-1376.
- [14] GAO S, BAI X, WEN L J, et al. Determination of six components in Shensu xuanfei wan by HPLC with wavelength switching combined gradient elution method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(10): 1300-1304.
- [15] WANG Z Y, LI C Q, MU M J, et al. Simultaneous determination of the content of Danshensu, puerarin, dadzin and salvianolic acid B in Bushen Huoxue prescription by HPLC wavelength switching technology [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(6): 1020-1026.
- [16] YU L R, HE X Y, HUANG Y R. Simultaneous determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and hydroxysafflor yellow A in Guanxinkang granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(5): 561-564.
- [17] WU W, ZHANG P Y, CHEN Y G, et al. Quality standard of Huangqi Baoxin mixture [J]. Her Med(医药导报), 2018, 37(3): 341-344.
- [18] CAO Z Q, XU J W, LU L, et al. Study on quality standard of Fuzhengtongluo granules [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(11): 1372-1377.
- [19] WANG D P, YAN X J. Simultaneous determination of loganin acid and gentiopicroside in Tongfengding tablets by HPLC [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2014, 16(12): 1024-1026.
- [20] WU X D, SU C, GUAN X Y, et al. HPLC simultaneous determination of gallic acid, tanshinol, protocatechuic aldehyde and paeoniflorin in Xinning Tablets [J]. Pharm Today(今日药学), 2018, 28(9): 595-598.

收稿日期: 2018-08-24

(本文责编: 蔡珊珊)