

HPLC 法测定消脂胶囊中丹参酮 II A 和丹酚酸 B 的含量

杨道炬¹, 张 怀², 刘树强³, 袁冬生⁴ (1. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405; 2. 广州白云山陈李济药厂有限公司, 广东 广州 510288; 3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 4. 广州中医药大学职业技术学院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 建立高效液相法测定消脂胶囊中丹参酮 II A 和丹酚酸 B 含量的方法。**方法** 采用 Grace Smart C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 丹参酮 II A 以甲醇-水(75:25)为流动相等度洗脱, 波长为 270 nm; 丹酚酸 B 以甲醇-甲酸-水(40:1:59)为流动相等度洗脱, 波长为 286 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL。结果丹参酮 II A 浓度在 0.004~0.04 mg·L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率 98.21 % (RSD 为 2.817 %, n=6); 丹酚酸 B 在 0.03~0.3 mg·L⁻¹ 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率 98.86 % (RSD 为 2.119 %, n=6)。**结论** 该法快速, 简便易行, 结果可靠, 专属性强, 可作为消脂胶囊的质量控制指标。

关键词: 消脂胶囊; 丹参酮 II A; 丹酚酸 B; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0737-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.022

Simultaneous Determination of Tanshinone II A and Salvianolic Acid B in Xiaozhi Capsule by HPLC

YANG Daoju¹, ZHANG Huai², LIU Shuqiang³, YUAN Dongsheng⁴ (1. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangzhou Baiyun Mountain Chenliji Pharmaceutical Factory Company, Guangzhou 510288, China; 3. College of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 4. Vocational Technology School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To develop a high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of tanshinone II A and salvianolic acid B in Xiaozhi Capsule. **Methods** Samples were analyzed on Grace Smart C₁₈ (4.6 mm × 250mm, 5 μm). The detection of tanshinone II A was with a mobile phase of methanol-water (75:25) for isocratic elution and a detection wavelength of 270 nm. Salvianolic acid B was detected with a mobile phase of methanol-methanoic acid-water (40:1:59) for isocratic elution and a detection wavelength of 286 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, temperature of column was set at 30 ℃ and injection volume was 10 μL. **Results** Tanshinone II A showed good linearity in the range of 0.004~0.04 mg·L⁻¹, and the recovery was 98.21 % (RSD=2.817 %, n=6). Salvianolic acid B showed good linearity in the range of 0.03~0.3 mg·L⁻¹, and the recovery was 98.86 % (RSD=2.119 %, n=6). **Conclusion** The established method is rapid, practical and accurate, and is suitable for the quantity control of Xiaozhi Capsule.

Keywords: Xiaozhi Capsule; Tanshinone II A; Salvianolic acid B; High performance liquid chromatography

消脂胶囊(专利号: 中国, 201110416602.1)是基于传统中医理论拟定的中药复方制剂, 具有疏肝健脾, 化痰祛瘀之功效。该方由山楂、何首乌、决明

子、丹参、虎杖、白术、泽泻等药物组成, 对肥胖、非酒精性脂肪性肝病等的疗效确切。既往研究表明, 消脂方对小鼠肝损伤具有保护作用^[1]。方中丹参为君

收稿日期: 2014-07-22

作者简介: 杨道炬, 男, 硕士生研究生, 研究方向: 中医药治疗肝病的基础与临床研究。Email: daojuyang@163.com。通讯作者: 袁冬生, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中医药治疗肝病的基础与临床研究。Email: ydshy@21cn.com。

药,其主要活性成分为丹参酮ⅡA、丹酚酸B等。为有效控制产品质量,本研究采用高效液相色谱法,建立了处方中主要有效成分丹参酮ⅡA、丹酚酸B的含量测定方法,可用于消脂胶囊的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱仪(SIL-20A 自动进样器、LC-20AT 泵、CTO-10AS VP 柱温箱、SPD-M20A 检测器、LC Solution 处理软件),日本岛津公司;SB-5200-DTS 双频超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司;PL303 型电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.2 试剂 丹参酮ⅡA 对照品,中国药品生物制品检定所,批号:110766-200416;丹酚酸B,四川省维克奇生物科技有限公司,批号:201006;甲醇为色谱醇;其他试剂均为分析纯。

1.3 样品 消脂胶囊,广州白云山陈李济药厂有限公司,批号分别为20130201,20130605,20131003。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Grace Smart C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:丹参酮ⅡA 以甲醇-水(75:25)为流动相等度洗脱,丹酚酸B 以甲醇-甲酸-水(40:1:59)为流动相等度洗脱;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30℃;进样量:10 μL,检测波长:

丹参酮ⅡA 波长为270 nm,丹酚酸B 波长为286 nm。

2.2 供试品溶液的制备 取消脂胶囊约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%乙醇20 mL,称定质量,超声处理30 min(功率350 W,频率50 kHz)取出,放冷,再称定质量,用75%乙醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备 按质量标准中处方工艺制成缺丹参的阴性样品,按照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液,依法测定。结果表明,消脂胶囊中其他成分对丹参酮ⅡA 的测定无干扰,见图1。其他成分对丹酚酸B 的测定无干扰,见图2。

2.4 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮ⅡA、丹酚酸B 对照品适量,加75%甲醇分别制浓度为20, 150 μg·mL⁻¹的对照品溶液,备用。

2.5 线性关系考察 精密吸取丹参酮ⅡA、丹酚酸B 对照品溶液2, 4, 8, 12, 16, 20 μL,注入高效液相色谱仪,依法测定,以丹参酮ⅡA、丹酚酸B 峰面积积分值为纵坐标Y,进样量为横坐标X(μg),绘制标准曲线,得丹参酮ⅡA 回归方程:Y=306.2X+1124.6, r=0.9997;丹酚酸B 回归方程:Y=275.1X-188.6, r=0.9998。

结果表明丹参酮ⅡA 浓度在0.004~0.04 mg·L⁻¹范围内与其峰面积线性关系良好。丹酚酸B 在0.03~0.3 mg·L⁻¹范围内与其峰面积线性关系良好。

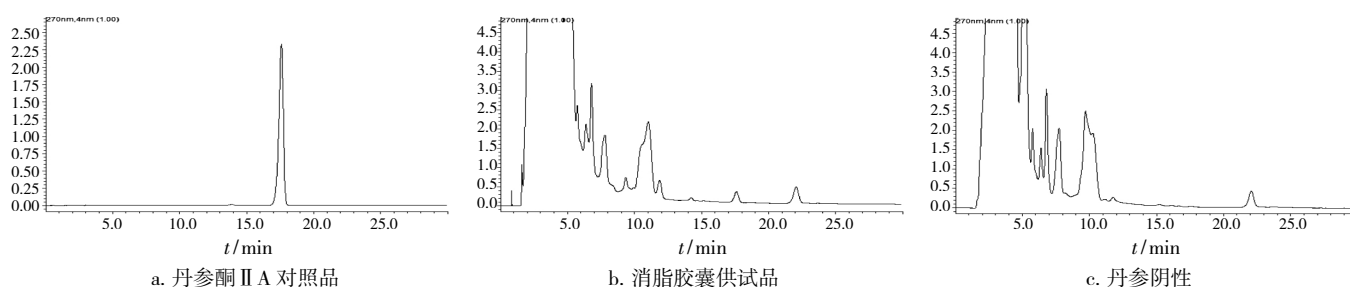


图1 丹参酮ⅡA 高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of tanshinone II A

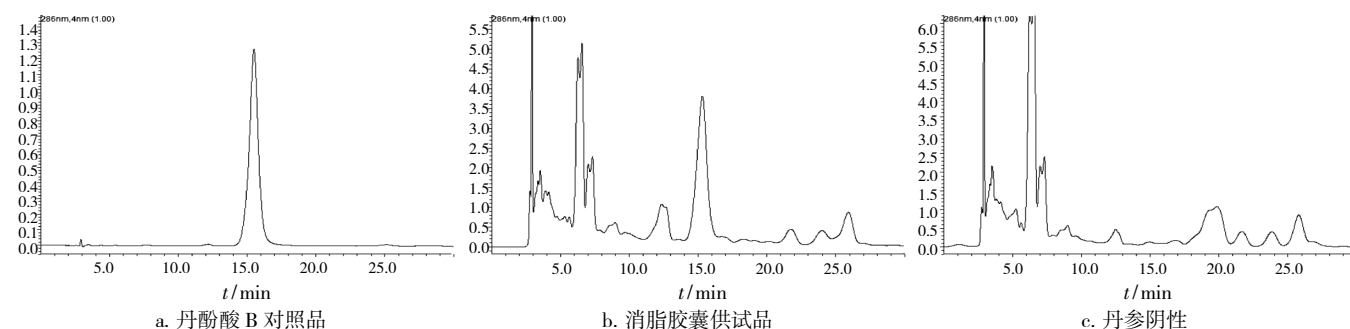


图2 丹酚酸B 高效液相色谱图

Figure 2 HPLC chromatogram of salvia acid B

2.6 精密度试验 分别精密吸取丹参酮ⅡA 和丹酚酸 B 对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 测定含量。丹参酮ⅡA 的 RSD% 为 0.1 %。丹酚酸 B 的 RSD% 为 0.2 %。结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取消脂胶囊约 2.0 g (批号: 20130201), 精密称定, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 于室温下分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后进样, 记录丹参酮ⅡA 和丹酚酸 B 的峰面积, 结果丹参酮ⅡA 含量的 RSD 为 1.8 %。丹酚酸 B 含量的 RSD 为 2.2 %。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取消脂胶囊约 2.0 g (批号: 20130201), 精确称取 6 份, 注入高效液相色谱仪, 依 2.2 项下方法制备供试品溶液及测定。丹参酮ⅡA、丹酚酸 B 的平均含量分别为 0.016, 0.173 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.4 %、1.1 %。表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 称取 6 份同一批样品 (批号: 20131003), 约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入丹参酮ⅡA、丹酚酸 B 对照品溶液, 按 2.2 项下方法制备供试液及测定, 计算回收率。测得丹参酮ⅡA、丹酚酸 B 的平均回收率分别为 98.21 %、98.86 %, RSD 分别为 2.817 %、2.119 %。结果见表 1 和表 2。

表 1 丹参酮ⅡA 的回收率测定(n=6)

Table 1 Results of recovery tests of tanshinone II A						
样品序号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.0082	0.0112	0.0193	99.11	98.21	2.817
2	0.0082	0.0112	0.0189	95.54		
3	0.0083	0.0112	0.0191	96.43		
4	0.0079	0.0112	0.0192	100.89		
5	0.0083	0.0112	0.019	95.54		
6	0.0081	0.0112	0.0195	101.79		

表 2 丹酚酸 B 的回收率测定(n=6)

Table 2 Results of recovery tests of salvia acid B						
样品序号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.081	0.102	0.185	101.96	98.86	2.119
2	0.081	0.102	0.181	98.04		
3	0.092	0.102	0.192	98.04		
4	0.085	0.102	0.184	97.06		
5	0.084	0.102	0.183	97.06		
6	0.090	0.102	0.193	100.98		

2.10 含量测定 取 3 批样品, 按 2.2 项制备供试品溶液, 在 2.1 项色谱条件下进行测定, 结果见表 3。

3 讨论

丹参酮ⅡA 和丹酚酸 B 是丹参中主要脂溶性成分和水溶性成分, 具有抗血栓、改善血液循环、减

表 3 消脂胶囊中丹参酮ⅡA 和丹酚酸 B 的含量测定(n=3)
Table 3 Results of content tests of tanshinone II A and salvia acid B in Xiaozhi Capsule

样品批号	丹参酮ⅡA /mg·g ⁻¹	RSD/%	丹酚酸 B/mg·g ⁻¹	RSD/%
20130201	0.018	1.10	0.163	2.30
20130605	0.016	1.45	0.181	1.60
20131003	0.016	1.32	0.176	1.80

轻白细胞的损伤作用、抗氧化、减少细胞凋亡等作用^[2-3]。此二种成分也为消脂胶囊中重要的活性成分, 含量比较高, 且来自于方中君药丹参, 故本方法选其为考察指标。

本研究参照了《中华人民共和国药典》(2010 年版)^[4], 分别考察甲醇、75 % 甲醇和 50 % 甲醇溶剂对消脂胶囊中丹参酮ⅡA 和丹酚酸 B 的提取率。结果表明, 75 % 甲醇提取率高, 杂质峰少, 且重现性好, 故本试验采用 75 % 甲醇为提取溶剂。

采用二极管阵列检测器, 分别选择丹参酮ⅡA 和丹酚酸 B 峰保留时间处, 在 210 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描。结果显示丹参酮ⅡA 在 270 nm 波长处有最大吸收, 丹酚酸 B 对照品在 286 nm 波长处有最大吸收, 同时参考相关文献^[5-6], 最终选择其测定波长分别为 270 nm 和 286 nm。

在测定丹酚酸 B 含量时, 曾考察甲醇 - 乙腈 - 甲酸 - 水 (30 : 10 : 1 : 59)^[4]、乙腈 - 0.1 % 磷酸 (24 : 76)^[7]、甲醇 - 乙腈 - 0.1 % 磷酸 (7 : 20 : 73)^[8] 等流动相, 但均未达到基线分离, 峰型不对称, 拖尾严重, 其他成分有干扰。本研究所建立的方法可使色谱峰的分离度大于 1.5, 且峰型良好, 无杂质干扰峰, 保留时间较短。

采用本研究所建立的 HPLC 含量测定方法, 对 3 批消脂胶囊进行含量测定。结果表明, 本方法简便可行, 重现性良好, 适用于消脂胶囊的质量控制及质量标准的制定。

参考文献:

[1] 石磊, 袁冬生, 朱彩平, 等. 消脂汤对四环素所致小鼠脂肪肝模型的保护作用研究[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(8): 769-771.
[2] 戈升荣, 俞一心, 谢更新. 丹酚酸的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2002, 9(25): 683-686.
[3] 孙瑞芳, 刘立新, 张海燕, 等. 丹参酮ⅡA 对小鼠肝纤维化的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 11(29): 1012-1017.
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70-71.
[5] 曾振兴, 杨菲, 冯伟红. HPLC 法测定市售丹参饮片中丹参酮ⅡA [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 16(17): 86-88.

- [6] 暴风伟, 刘玉强, 胡丽萍, 等. HPLC 波长切换法同时测定丹参酚酸提取物中 5 种成分[J]. 中成药, 2012, 12(34): 2368–2372.
- [7] 魏惠珍, 黄周华, 崔金国, 等. HPLC 法测定心可舒胶囊和心可舒片中丹酚酸 B[J]. 中草药, 2007, 8(38): 1196–1197.
- [8] 梅爱中, 陈柳娟, 戴德雄, 等. 高效液相色谱法测定丹七片中丹酚酸 B[J]. 中草药, 2008, 7(39): 1024–1025.
- (编辑: 邓响潮)

千斤肾安宁胶囊中 5 种化学成分含量测定方法的建立

金晓敏^{1,2}, 彭敏桦¹, 任杰麟¹, 吴依娜¹, 李 耿¹(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州王老吉大健康产业有限公司, 广东 广州 510440)

摘要: **目的** 应用核-壳色谱柱建立千斤肾安宁胶囊中淫羊藿苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rb₁ 的高效液相色谱含量测定方法。**方法** 采用 Kinetex 核壳色谱柱(0.46 cm × 10 cm, 2.6 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~6 min: 19%A; 6~13 min: 19%~29%A; 13~18 min: 29%~40%A; 18~25 min: 40%~19%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 203 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL。**结果** 淫羊藿苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rb₁ 的线性范围分别为 3.2~32 μg·mL⁻¹($r=0.99985$)、3.2~32 μg·mL⁻¹($r=0.99975$)、11.0~110.0 μg·mL⁻¹($r=0.99995$)、6.0~60.0 μg·mL⁻¹($r=0.99995$)和 11.0~110.0 μg·mL⁻¹($r=0.99985$), 平均加样回收率分别为 98.82%(RSD=0.46%)、97.08%(RSD=1.21%)、99.64%(RSD=0.13%)、98.69%(RSD=1.38%)和 98.68%(RSD=2.44%)。**结论** 该测定方法简便、准确, 重现性好, 可用于千斤肾安宁胶囊的质量控制。

关键词: 淫羊藿苷; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 核壳色谱柱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0740-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.023

Establishment of Method for Determination of Five Components in *Qianjin Shen'anning* Capsule

JIN Xiaomin^{1,2}, PENG Minhua¹, REN Jieli¹, WU Yina¹, LI Geng¹(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangzhou Wanglaoji Healthy Industry Co., Ltd., Guangzhou 510440 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC method for the content determination of icariin, notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁ in *Qianjin Shen'anning* capsule by using core-shell chromatographic column. **Methods** The chromatographic separation was performed on Kinetex C₁₈ column (0.46 cm × 10 cm, 2.6 μm) using a mobile phase of acetonitrile(A) and water (B) at a flow rate of 1.0 mL/min. The gradient elution mode was as follows: 0~6 min, 19%A; 6~13min, 19%~29%A; 13~18 min, 29%~40%A; 18~25 min, 40%~19%A. The detection wavelength and column temperature were set at 203nm and 30℃. The injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of icariin, notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁ were 3.2~32 μg·mL⁻¹ ($r=0.99985$), 3.2~32 μg·mL⁻¹($r=0.99975$), 11.0~110.0 μg·mL⁻¹($r=0.99995$), 6.0~60.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.99995$), 11.0~110.0 μg·mL⁻¹($r=0.99985$), respectively. The average recovery was 98.82%(RSD=0.46%), 97.08%(RSD=1.21%), 99.64%(RSD=0.13%), 98.69%(RSD=1.38%) and 98.68%(RSD=2.44%), respectively. **Conclusion** The established method is simple, accurate and repeatable, and can be used for the quality control of *Qianjin Shen'anning* capsule.

收稿日期: 2014-07-01

作者简介: 金晓敏, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药学。Email: 459634391@qq.com。通讯作者: 李耿, 博士, 副教授, 研究方向: 中药新药研究与开发。Email: lg@zucm.edu.cn。