

HPLC法同时测定活血促愈胶囊中2种黄酮类和4种菲醌类成分的含量[△]

陈丹^{1*}, 李柯^{2#}, 卢茂芳³, 侯茜², 李若存²(1.湘潭医卫职业技术学院, 湖南湘潭 411102; 2.湖南省中医药研究院, 长沙 410013; 3.湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1931-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.12

摘要 目的:建立同时测定活血促愈胶囊中2种黄酮类(芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷)和4种菲醌类成分(二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Welch Ultimate XB-C₁₈, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 20 ℃, 检测波长为 270 nm, 进样量为 10 μL。结果:芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的检测质量浓度线性范围分别为 172.13~860.66 μg/mL($r=0.9997$)、15.33~76.66 μg/mL($r=0.9998$)、12.81~64.06 μg/mL($r=0.9993$)、5.90~29.52 μg/mL($r=0.9993$)、5.12~25.60 μg/mL($r=0.9992$)、6.71~33.57 μg/mL($r=0.9997$), 检测限分别为 0.08、0.01、0.01、0.01、0.01、0.01 μg/mL, 定量限分别为 0.27、0.02、0.03、0.03、0.03、0.03 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$); 加样回收率分别为 97.54%~100.25% (RSD=1.07%, $n=6$)、96.90%~101.91% (RSD=1.73%, $n=6$)、96.24%~102.89% (RSD=2.32%, $n=6$)、97.04%~102.18% (RSD=1.82%, $n=6$)、95.06%~97.73% (RSD=1.18%, $n=6$)、95.59%~101.40% (RSD=2.29%, $n=6$)。结论:该方法灵敏、快速、操作简便、重复性好, 可用于活血促愈胶囊中芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 含量的同时测定。

关键词 活血促愈胶囊; 芦丁; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 二氢丹参酮 I; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A; 高效液相色谱法

Quantitative Determination of Two Flavonoids and Four Phenoquinones of Huoxue Cuyu Capsules by HPLC

CHEN Dan¹, LI Ke², LU Maofang³, HOU Xi², LI Ruocun² (1. Xiangtan Medical and Health Vocational and Technical College, Hunan Xiangtan 411102, China; 2. Hunan Academy of TCM, Changsha 410013, China; 3. School of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of two flavonoids (rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside) and four phenoquinones (dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II_A) in Huoxue cuyu capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Welch Ultimate XB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 20 ℃, and detection wavelength was set at 270 nm. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of rutin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II_A were 172.13-860.66 μg/mL ($r=0.9997$), 15.33-76.66 μg/mL ($r=0.9998$), 12.81-64.06 μg/mL ($r=0.9993$), 5.90-29.52 μg/mL ($r=0.9993$), 5.12-25.60 μg/mL ($r=0.9992$), 6.71-33.57 μg/mL ($r=0.9997$), respectively. The limits of detection were 0.08, 0.01, 0.01, 0.01, 0.01, 0.01 μg/mL. The limits of quantitation were 0.27, 0.02, 0.03, 0.03, 0.03, 0.03 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability test and repetition tests were all lower than 2.0% ($n=6$). The recoveries were 97.54%-100.25% (RSD=1.07%, $n=6$), 96.90%-101.91% (RSD=1.73%, $n=6$), 96.24%-102.89% (RSD=2.32%, $n=6$), 97.04%-102.18% (RSD=1.82%, $n=6$), 95.06%-97.73% (RSD=1.18%, $n=6$), 95.59%-101.40% (RSD=2.29%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is sensitive, rapid, simple and has good reproducibility. It can be used for simultaneous determination of rutin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A in Huoxue cuyu capsules.

KEYWORDS Huoxue cuyu capsules; Rutin; Kaempferol-3-*O*-rutinoside; Dihydrotanshinone I; Cryptotanshinone; Tanshinone I; Tanshinone II_A; HPLC

[△] 基金项目:湖南省科学技术厅科技计划一般项目(No.湘科技字[2006]106号);湖南省中医药管理局中医药科研计划项目(No.2008093)

* 副教授, 硕士。研究方向:中药制剂开发及中药质量标准研究。电话:0731-55573978。E-mail:252916321@qq.com

通信作者:副研究员, 硕士。研究方向:中药制剂工艺与质量控制研究。电话:0731-88807491。E-mail:17848689@qq.com

活血促愈胶囊是由三七、积雪草、丹参、槐米等药材组成的中药6类新药,具有活血化瘀、消肿止痛的功效,临床用于急性软组织损伤及骨折^[1-2]。其中,三七为方中君药,积雪草为臣药,丹参、槐米分别为佐药、使药。本课题组前期研究已建立了同时测定活血促愈胶囊中三

七、积雪草中5种皂苷类成分含量的高效液相色谱法(HPLC)^[3]。该方中丹参主要含有菲醌类成分(如丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 等),为活血化瘀的活性成分;槐米中的黄酮类成分(如芦丁、槲皮素、山柰酚-3-O-芸香糖苷等)具有良好的消肿止痛作用,均为该方的主要活性成分^[4]。为了进一步提高质量控制水平,本试验建立了同时测定该方中芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A等6种成分的HPLC法,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 型 HPLC 仪(包括 LC-20AT 型二元泵、SPD-20A 型紫外检测器、7725i-049 型手动进样器)、Lab-Solutions 6.50 SP1 系列工作站(日本 Shimadzu 公司);XPE105 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);HX-06 型超声波清洗器(武汉恒信世纪科技有限公司)。

1.2 药品、药材与试剂

活血促愈胶囊(湖南省中医药研究院制剂室自制,批号:20161210、20170305、20170312、20170319,规格:0.56 g/粒,人参皂苷 Rg₁ 含量:≥4.0mg/粒,丹参酮 II_A 含量:≥0.4 mg/粒);三七药材(批号:20160501、20160820、20161001、20161212)、积雪草药材(批号:20160612、20160911、20161105、20170110)、丹参药材(批号:20160515、20160725、20170118、20170126)、槐米药材(批号:20160501、20160911、20161212、20170104)均购自湖南上药九旺医药有限公司,经湖南省中医药研究院李若存研究员鉴定,三七为五加科植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥根和根茎、积雪草为伞形科植物积雪草 [*Centella asiatica* (L.) Urb.] 的干燥全草、丹参为唇形科植物丹参 [*Salvia miltiorrhiza* Bge.] 的干燥根和根茎、槐米为豆科植物槐 [*Sophora japonica* L.] 的干燥花蕾及花;芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:90.5%)购自中国食品药品检定研究院,山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品(批号: MUST-17040507,纯度:98.16%)、二氢丹参酮 I 对照品(批号: MUST-17032705,纯度:98.40%)、隐丹参酮对照品(批号: MUST-17030403,纯度:99.34%)、丹参酮 I 对照品(批号: MUST-17030210,纯度:99.09%)、丹参酮 II_A 对照品(批号: MUST-17101811,纯度:99.33%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;聚酰胺(30~60 目,柱层析用,国药集团化学试剂有限公司,批号:20160118);乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱

(0~10 min, 15% A; 10~30 min, 15% A→21% A; 30~60 min, 21% A→75% A; 60~75 min, 75% A→15% A);流速:1.0 mL/min;柱温:20 °C;检测波长:270 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

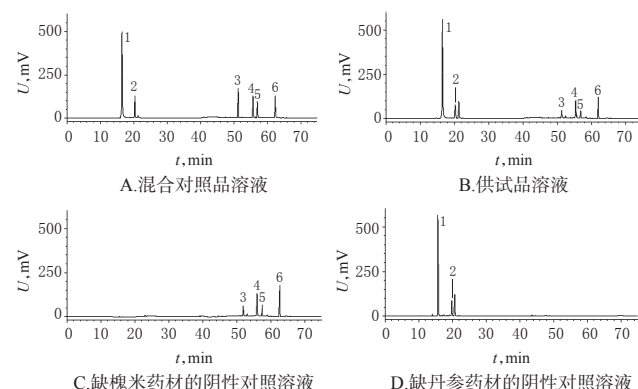
2.2.1 混合对照品溶液 取芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 对照品适量,分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 质量浓度分别为 8 606.6、766.6、640.6、295.2、256.0、335.7 μg/mL 的单一对照品贮备液。分别精密吸取上述各单一对照品贮备液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 质量浓度分别为 860.66、76.66、64.06、29.52、25.60、33.57 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取活血促愈胶囊内容物,研细(过三号筛),精密称取 0.7 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,加甲醇 50 mL,加热回流 1 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加适量水溶解,上样于已处理好的聚酰胺柱(3 g, 30~60 目,内径 1.2 cm),水洗脱至无色后,加乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液 30 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和配方比例,分别制备缺丹参药材、缺槐米药材的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法分别制成缺丹参药材和缺槐米药材的阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在该色谱条件下,各待测成分之间、待测成分与杂质峰之间得到分离,6 种成分的分离度 > 1.5,理论板数以芦丁计均大于 5 000,详见图 1。



注:1.芦丁;2.山柰酚-3-O-芸香糖苷;3.二氢丹参酮 I;4.隐丹参酮;5.丹参酮 I;6.丹参酮 II_A

Note: 1. rutin; 2. kaempferol-3-O-rutinoside; 3. dihydrotanshinone I; 4. cryptotanshinone; 5. tanshinone I; 6. tanshinone II_A

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于1 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。精密量取上述混合对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,线性关系考察结果见表1。

表1 线性关系考察结果

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL
芦丁	$y=15.495x+24.060$	0.999 7	172.13~860.66
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	$y=10.015x+5.228.8$	0.999 8	15.33~76.66
二氢丹参酮 I	$y=15.687x-22.953$	0.999 3	12.81~64.06
隐丹参酮	$y=24.770x-11.013$	0.999 3	5.90~29.52
丹参酮 I	$y=23.286x-7.950.6$	0.999 2	5.12~25.60
丹参酮 II _A	$y=30.109x-6.191.8$	0.999 7	6.71~33.57

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限。结果,芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A的检测限分别为0.08、0.01、0.01、0.01、0.01、0.01 μg/mL,定量限分别为0.27、0.02、0.03、0.03、0.03、0.03 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A峰面积的RSD分别为0.78%、1.22%、1.67%、1.87%、1.92%、1.16% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20161210)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A峰面积的RSD分别为1.32%、1.25%、1.64%、1.98%、1.51%、1.49% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20161210)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量。结果,芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A的平均含量分别为37.82、1.93、1.03、1.18、0.50、1.07 mg/g, RSD分别为1.57%、1.92%、1.20%、1.41%、1.64%、1.09% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20161210)适量,共6份,分

别加入芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A对照品溶液[此溶液的浓度是根据取样量中该成分的含量,按质量比1:1配制],按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芦丁	0.353 1	13.354 2	14.265 0	27.626 1	100.05	98.98	1.07
	0.354 4	13.403 4	14.265 0	27.703 7	100.25		
	0.355 9	13.460 1	14.265 0	27.581 5	98.99		
	0.358 1	13.543 3	14.265 0	27.535 2	98.08		
	0.352 7	13.339 1	14.265 0	27.458 4	98.98		
	0.351 5	13.293 7	14.265 0	27.207 4	97.54		
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	0.353 1	0.681 5	0.781 0	1.438 3	96.90	99.22	1.73
	0.354 4	0.684 0	0.781 0	1.453 5	98.53		
	0.355 9	0.686 9	0.781 0	1.461 0	99.12		
	0.358 1	0.691 1	0.781 0	1.460 7	98.54		
	0.352 7	0.680 7	0.781 0	1.476 6	101.91		
	0.351 5	0.678 4	0.781 0	1.462 0	100.33		
二氢丹参酮 I	0.353 1	0.363 7	0.390 6	0.765 6	102.89	99.25	2.32
	0.354 4	0.365 0	0.390 6	0.763 7	100.68		
	0.355 9	0.366 6	0.390 6	0.742 5	96.24		
	0.358 1	0.368 8	0.390 6	0.751 2	97.90		
	0.352 7	0.363 3	0.390 6	0.750 4	99.10		
	0.351 5	0.362 0	0.390 6	0.747 4	98.67		
隐丹参酮	0.353 1	0.416 6	0.445 8	0.865 6	100.72	100.10	1.82
	0.354 4	0.418 2	0.445 8	0.863 7	99.93		
	0.355 9	0.420 0	0.445 8	0.875 5	102.18		
	0.358 1	0.422 6	0.445 8	0.865 2	99.28		
	0.352 7	0.416 2	0.445 8	0.868 4	101.44		
	0.351 5	0.414 8	0.445 8	0.847 4	97.04		
丹参酮 I	0.353 1	0.176 6	0.206 7	0.375 6	96.27	96.26	1.18
	0.354 4	0.177 2	0.206 7	0.373 7	95.06		
	0.355 9	0.178 0	0.206 7	0.375 5	95.55		
	0.358 1	0.179 0	0.206 7	0.376 2	95.40		
	0.352 7	0.176 4	0.206 7	0.378 4	97.73		
	0.351 5	0.175 8	0.206 7	0.377 4	97.53		
丹参酮 II _A	0.353 1	0.377 8	0.405 6	0.775 6	98.08	98.30	2.29
	0.354 4	0.379 2	0.405 6	0.783 7	99.73		
	0.355 9	0.380 8	0.405 6	0.768 5	95.59		
	0.358 1	0.383 2	0.405 6	0.785 2	99.11		
	0.352 7	0.377 4	0.405 6	0.766 4	95.91		
	0.351 5	0.376 1	0.405 6	0.787 4	101.40		

2.10 耐用性试验

2.10.1 色谱柱考察 取样品(批号:20161210)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件[色谱柱分别为Welch Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、TE-CHI C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量,结果见表3。结果表明,当色谱柱发生一定程度波动时,本法能满足试验要求,提示其耐用性良好。

2.10.2 柱温考察 取样品(批号:20161210)适量,按

表3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of durability tests

试验条件		芦丁			山柰酚-3-O-芸香糖苷			二氢丹参酮 I			隐丹参酮			丹参酮 I			丹参酮 II _A		
		含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	平均值, mg/g	RSD, %
色谱柱	Welch Ultimate XB-C ₁₈	37.72	37.67	0.63	1.98	1.92	3.13	1.01	1.05	4.36	1.20	1.16	2.76	0.57	0.55	3.81	1.08	1.06	1.44
	Kromasil100-5-C ₁₈	37.41			1.86			1.10			1.15			0.53			1.06		
	TECHI C ₁₈	37.88			1.92			1.04			1.14			0.54			1.05		
柱温	18 °C	37.68	37.69	0.03	1.91	1.91	0.80	1.03	1.04	1.11	1.16	1.15	1.33	0.56	0.57	1.75	1.07	1.05	1.45
	20 °C	37.70			1.93			1.05			1.13			0.57			1.05		
	22 °C	37.70			1.90			1.05			1.15			0.58			1.04		

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件(柱温分别为18、20、22 °C)进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量,结果见表3。结果表明,当柱温发生一定程度波动时,本法能满足试验要求,提示其耐用性良好。

2.11 样品含量测定

取4批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并按外标法计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 4 Results of content determination of samples (n=3, mg/g)

批号	芦丁	山柰酚-3-O-芸香糖苷	二氢丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A
20161210	37.87	1.95	1.04	1.16	0.55	1.05
20170305	37.51	1.89	0.98	1.20	0.53	1.11
20170312	36.96	1.81	0.92	1.21	0.59	1.16
20170319	37.27	1.84	0.94	1.14	0.47	1.09
平均值	37.39	1.87	0.97	1.18	0.52	1.11
RSD, %	0.97	2.85	5.02	2.62	9.81	3.49

3 讨论

以2015年版《中国药典》(一部)丹参、槐米含量测定项下方法^[5]为基础,结合文献方法^[6-12]同时测定了芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A等6种成分的含量。

3.1 测定成分的选择

本方中丹参为佐药、槐米为使药。研究表明,丹参所含的二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A均为非醌类成分,均能明显提高骨折愈合区和成骨细胞数目,能阻止白细胞过度的游出和聚集,防止溶酶体酶、氧化代谢产物等过多的释放,减轻组织损伤,可控制炎症的发生;对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和β-内酰胺酶阳性的金黄色葡萄球菌有较强抑菌作用,其中隐丹参酮作用最强^[13-15]。槐米所含的芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷均为黄酮类成分,其中芦丁能降低毛细血管的异常通透性、脆性,能维持血管抵抗力,可用于出血症的治疗和预防;山柰酚-3-O-芸香糖苷能抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移,为活血化瘀的有效成分^[16]。

本处方中4味药材所含主要活性成分是皂苷类、菲醌类及黄酮类。本课题组前期已对三七、积雪草中皂苷类成分的定量测定进行研究;二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A是丹参中的主要成分,2015年版《中国药典》(一部)丹参含量测定的指标就是丹参酮类^[5];芦丁是槐米的含量测定指标^[5],山柰酚-3-O-芸香糖苷为槐米中的另一主要黄酮类成分^[17]。因此,最终选择芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A等6种成分进行含量测定。

3.2 检测波长的选择

本研究前期分别对芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A等6种成分进行紫外扫描。结果,芦丁的最大吸收波长为257 nm,山柰酚-3-O-芸香糖苷的最大吸收波长为344 nm,丹参酮 II_A与隐丹参酮的最大吸收波长为270 nm,二氢丹参酮 I的最大吸收波长为240 nm,丹参酮 I的最大吸收波长为245 nm,各成分最大吸收波长各不相同,故选择相差较大的3个波长(245、270、344 nm),对同一供试品进行测定,对基线、分离度、理论板数和各成分含量进行综合评价。结果,在上述波长下检测,各色谱峰均能达到基线分离,分离度均大于1.5,柱效好;在270 nm波长下检测时,各成分含量均较高,故最终选择270 nm作为检测波长。

3.3 流动相的筛选

本研究前期参照2015年版《中国药典》(一部)丹参含量测定项下的流动相^[5],比较了乙腈-水、乙腈-0.02%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液的分离效果。结果,以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相的色谱峰分离度及峰形最好。经反复摸索,本研究最终选定了上述流动相梯度,结果6种成分均能得到较好的分离。

3.4 供试品溶液制备方法的选择

丹参中脂溶性成分主要为菲醌类化合物,槐米中则主要含黄酮类化合物。本研究前期参照2015年版《中国药典》(一部)丹参与槐米药材含量测定项下的方法^[5],采用甲醇超声处理,超声提取液直接进样分析。结果,提

取液中成分复杂,呈现出多个色谱峰,且待测成分与相邻色谱峰无法实现基线分离。因此,依据黄酮类、菲醌类化合物与聚酰胺形成氢键缔合而产生吸附的特性,采用聚酰胺柱对供试品进行分离、纯化^[18-19]。本研究前期对聚酰胺的用量、色谱柱内径及长度、洗脱剂的种类及用量等进行了筛选。结果发现,选用聚酰胺柱(3 g,30~60目,内径1.2 cm)、以乙醇30 mL进行洗脱时,供试品溶液色谱图中的杂质峰较少,各色谱峰分离度均大于1.5,因此最终选择此法作为本品供试液的制备方法。

3.5 含量测定结果分析

由表4可知,每批成品中黄酮类成分的含量均高于菲醌类成分,均以芦丁含量最高,且芦丁批间差异最小,RSD为0.97%,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷含量的RSD为2.85%,说明黄酮类化合物较稳定。丹参中4种菲醌类成分含量批间差异较大,尤其是二氢丹参酮I和丹参酮I(RSD分别为5.02%和9.81%),且丹参酮I含量最低。由于不同来源的丹参药材及饮片中丹参酮类成分含量差异明显,因此有必要对丹参的来源进行严格控制。

综上所述,本研究所建立的HPLC法灵敏、快速、操作简便、重复性好,可用于活血促愈胶囊中芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A含量的同时测定。

参考文献

[1] 徐琳本,陈丽萍,肖梅英.活血促愈胶囊对外伤血瘀证大鼠模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):270-273.

[2] 邹旦,彭六明,肖放军,等.活血促愈胶囊治疗骨折早期软组织损伤30例[J].湖南中医杂志,2012,28(2):32-33.

[3] 陈丹,李柯,卢茂芳,等.HPLC法同时测定活血促愈胶囊中5个主要活性成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(12):2185-2190.

[4] 王笑,王雨,张冰,等.槐不同药用部位本草学、化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2018,49(18):4461-4467.

[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:76、354.

[6] 程沛,韩东岐,胡伟慧,等.高效液相色谱法同时测定丹参

中10种水溶性和4种脂溶性成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(6):991-996.

[7] 张慧娴,杜守颖,陆洋,等.HPLC同时测定丹参水溶性及脂溶性5种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):34-38.

[8] 舒文将,刘金磊,邹蓉,等.高效液相色谱法测定不同产地和采收期对槐米中芦丁含量的影响[J].时珍国医国药,2017,28(3):709-711.

[9] 李俊,王冬,张丽梅,等.复方黄槐片质量标准的提高[J].中国药师,2017,20(12):2251-2254.

[10] 程中琴,刘小妹,施崇精,等.HPLC法同时测定平脏调神颗粒中8种成分的含量[J].中国药房,2018,29(1):33-37.

[11] 付娟,张海弢,杨素德,等.HPLC法同时测定芪白平肺颗粒中4种皂苷类成分的含量[J].中国药房,2015,26(33):4698-4700.

[12] 王姗,张毅,张建华,等.HPLC法同时测定金钱草药材中芦丁和烟花苷的含量[J].沈阳药科大学学报,2017,34(12):1067-1071.

[13] 符诗聪,史炜镔,张昊,等.丹参有效部位(丹参-9403)对骨折愈合的骨计量学研究[J].中国中西医结合杂志,2000(S1):116-117.

[14] 赵仁霞.丹参的现代药理研究及临床应用[J].中国医药指南,2011,9(12):291-292.

[15] 戴新新,宿树兰,郭盛,等.丹参酮类成分的生物活性与应用开发研究进展[J].中草药,2017,48(7):1442-1448.

[16] 张文通,李俊,吴玉婷,等.山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖、迁移及TGFBR1信号通路活化的影响[J].中国病理生理杂志,2018,34(5):832-838.

[17] 李秋红,栾仲秋,王继坤.中药槐米的化学成分、炮制研究及药理作用研究进展[J].中医药学报,2017,45(3):112-116.

[18] 方小燕.聚酰胺树脂在分离纯化黄酮中的应用研究[J].海峡药学,2013,25(5):41-42.

[19] 李梓盟,张柯达,吴金虎.聚酰胺树脂纯化复方“前愈”总黄酮的工艺研究[J].中国新药杂志,2016,25(8):913-916.

(收稿日期:2018-11-06 修回日期:2019-06-05)

(编辑:余庆华)