

调经益母片的高效液相色谱指纹图谱及成分定量研究

赵荣¹, 肖会敏², 何悦², 刘洋³, 杨旭², 王四旺²

(1. 陕西海天制药有限公司, 陕西 咸阳 712000; 2. 空军军医大学药学院药物研究所, 陕西 西安 710032; 3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 研究调经益母片的高效液相色谱(HPLC)法指纹图谱,并测定丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 的含量。**方法** 采用 HPLC 法,色谱条件:阿克苏诺贝尔 Kromasil C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相为乙腈-5.0 g·L⁻¹磷酸水溶液,梯度洗脱;流速为 0.8 mL·min⁻¹;柱温为 30℃;检测波长为 270 nm。**结果** 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A),确定了调经益母片的 HPLC 指纹图谱共有模式,标定了 43 个共有峰,相似度为 0.938~0.985;并测定了 10 批制剂中丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 的平均含量分别为 2.39、3.61、5.98、60.11 mg·g⁻¹,RSD(%)分别为 1.30、0.91、1.46、0.92%。**结论** HPLC 指纹图谱测定方法及其丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 的定量方法简便易行、稳定可靠,可作为调经益母片制剂的质量控制方法。

关键词: 色谱法, 高压液相;丹参素;益母草碱;迷迭香酸;丹酚酸 B

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.07.011

Study on fingerprint of Tiaojingyimu tablet and quantitative analysis of components by HPLC

ZHAO Rong¹, XIAO Huimin², HE Yue², LIU Yang³, YANG Xu², WANG Siwang²

(1. Shaanxi Haitian Pharmaceutical Limited Company, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2. Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, The Air Force Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China; 3. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China)

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint method for quality control of Tiaojingyimu Tablet, and determine the content of tanshinol, leonurine, rosmarinic acid, salviolic acid B. **Methods** The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis was performed on a Kromasil C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid solution in gradient elution. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the column temperature was set at 30℃, and the detection wavelength was set at 270 nm. **Results** Under the above chromatographic conditions, the characteristic fingerprint peak of Tiaojingyimu Tablet was composed of 43 chromatographic peaks through the chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2004A) analysis. And the acquaintance degree was 0.938~0.985. And the average content of tanshinol, leonurine, rosmarinic acid, salviolic acid B were respectively, 2.39, 3.61, 5.98, 60.11 mg·g⁻¹ and their RSDs(%) were, respectively, 1.30, 0.91, 1.46, 0.92% in 10 batches of Tiaojingyimu Tablet. **Conclusion** The method is simple, accurate and has a good repeatability. The study provides scientific foundation for quality evaluation and quality control standards of Tiaojingyimu Tablet.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Danshensu; Leonurine; Rosmarinic acid; Salviolic acid B

调经益母片由益母草、冰糖草、丹参共 3 味中药组成,具有调经活血功能和治疗月经后错、量少、经期腹痛等症。现代医学表明,益母草中的益母草碱,具有抗炎镇痛、兴奋子宫等功效^[1-3]。丹参主要水溶性成分含丹参素、迷迭香酸、丹酚酸 B 等^[4],其中丹酚酸 B 可抑制血小板粘附、活化、聚集,丹参素能

抑制血小板聚集、提高血小板膜的流动性^[5-7],迷迭香酸具有解热、镇痛、抗炎药等作用^[8]。冰糖草具有抗炎、镇痛作用等^[9]。有文献^[10]对制剂中原儿茶醛、迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量进行了报道,而现行质量标准中仅对原儿茶醛进行了定量。但是由于中药成分复杂,难以使用传统的单一成分或单指标评价表达中药的质量^[11]。因此,笔者参照文献^[12]采用高效液相色谱法建立指纹图谱并同时制剂中丹参素、益母草碱、迷迭香酸和丹酚酸 B 的进行定量分析。

1 仪器与试药

KQ5200DE 型数控超声波发生器, 昆山超声仪器有限公司; 岛津高效液相色谱仪 (LC-2010CHT), LCsolution 色谱工作站, 日本岛津公司; 色谱柱为阿克苏诺贝尔 kromasil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 购自西安武本生物科技有限公司; 甲醇, HPLC 级, 美国 Honeywell 公司; 乙腈, HPLC 级, 美国 Honeywell 公司; ME235S 型电子分析天平, 德国赛多利斯公司; 超纯水自制; 丹参素、益母草碱、迷迭香酸、丹酚酸 B 标准品, 均购自宝鸡市晨光生物科技有限公司; 调经益母片 10 批, 批号分别为 20160506 ~ 20160515, 由陕西海天制药有限公司提供。

2 方法与结果

本研究起止时间为 2016 年 6 ~ 10 月。

2.1 指纹图谱测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 C18 (ODS) 250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm; 流动相: 流动相为 5.0 g · L⁻¹ 磷酸水溶液 (B) - 乙腈 (A), 梯度洗脱: 0 ~ 30 min, A 3% → 10%; 30 ~ 60 min, A 10% → 20%; 60 ~ 75 min, A 20% → 30%; 75 ~ 90 min, A 30% → 55%; HPLC 记录时间为 90 min; 流速为 0.8 mL · min⁻¹; 柱温为 30 °C; 检测波长为 270 nm; 进样量为 10.0 μL。

2.1.2 参照物溶液的制备 称取丹酚酸 B 标准品 5.00 mg, 于 50 mL 容量瓶中, 加 70% 色谱甲醇至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.1 mol · mL⁻¹。

2.1.3 供试品溶液的制备 取在重量差异范围内调经益母片 20 片, 除去糖衣, 研细, 称取 1.0 g, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加 25 mL 水, 密塞, 称重, 经 30 min 超声处理, 放凉, 再称重, 用水补足减少的重, 震荡, 滤过, 即得。

2.1.4 方法学考察

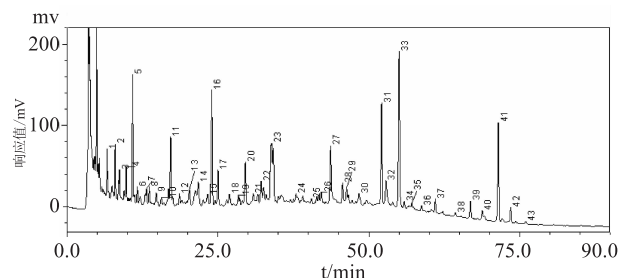
2.1.4.1 精密度试验 取一批调经益母片样品 (批号 20160506), 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件, 平行进样 6 次, 分别对 43 个共有峰的相对峰面积和相对保留时间进行分析考察。结果 43 个共有峰: 相对峰面积的 RSD 值均 < 2.0%、相对保留时间的 RSD 值 < 1.0%。表明该方法的精密度良好即符合要求。

2.1.4.2 稳定性试验 取一批调经益母片样品 (批号 20160506), 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件, 分别在第 0, 2, 4, 8, 12, 24 时间点进样考察 43 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果 43 个共有峰: 相对峰面积的 RSD 值均小于 2.0%、相对保留时间的 RSD 值均 < 1.0%。表明该样品溶液在分析时间 24 h 内稳定性良好即符

合要求。

2.1.4.3 重复性试验 取一批调经益母片样品 (批号 20160506), 按“2.1.3”项方法制备平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 分别对 43 个共有峰的相对峰面积和相对保留时间进行分析考察。结果 43 个共有峰: 相对峰面积的 RSD 值均 < 2.0%、相对保留时间的 RSD 值均 < 1.0%。表明该方法重复性良好即符合要求。

2.1.4.4 指纹图谱建立及相似度分析 取 10 批不同批号调经益母片样品, 分别按上述供试品溶液的制备方法制备样品溶液与上述色谱条件项进样分析, 记录指纹图谱 (见图 1), 参比峰为峰 31 丹酚酸 B, 建立指纹图谱。结果 10 批样品共有的 43 个峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 1.0%, 共有的 43 个峰的相对峰面积的 RSD 值均 < 2.0%, 符合指纹图谱研究技术的要求 (见图 1, 2)。运用《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》^[8] 对 10 批调经益母片的指纹图谱进行相似度分析, 将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件, 进行多点校正, 进行色谱峰匹配, 得 43 个共有色谱峰, 并以此共有模式为标准, 进行整体相似度评价, 结果相似度在 0.938 ~ 0.985 范围内。表明这 10 批不同批次调经益母片化学成分具有良好的一致性。



注: 1 ~ 43 为特征指纹峰 (characteristic fingerprint peak); 5 为丹参素 (tanshinol); 17 为益母草碱 (leonurine); 28 为迷迭香酸 (rosmarinic acid); 31 为丹酚酸 B (作为参照物的色谱峰) [salvianolic acid B (reference peak)]

图 1 调经益母片 HPLC 指纹图谱

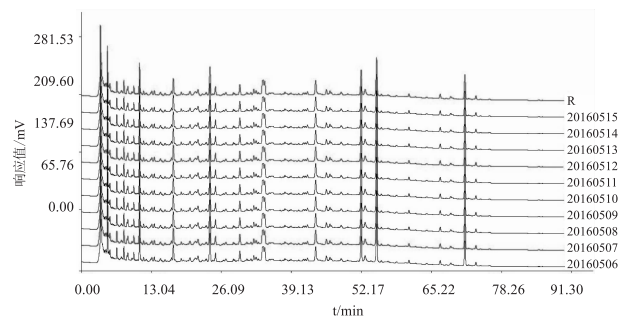


图 2 10 批调经益母片的 HPLC 指纹图谱

表 1 对照品的线性方程及其浓度范围

对照品名称	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	线性方程	相关系数(r)
丹参素	32.50 ~ 1 300.00	$y_1 = 1\,007.9\,x_1 + 13.571$	0.999 5
益母草碱	47.00 ~ 1 880.00	$y_2 = 10\,207\,x_2 + 27\,642$	0.999 6
迷迭香酸	60.00 ~ 2 400.00	$y_3 = 6\,103.3\,x_3 + 25\,304$	0.999 4
丹酚酸 B	50.00 ~ 2 000.00	$y_4 = 12\,340\,x_3 + 49\,537$	0.999 5

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 同 2.1.1 项。

2.2.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称取丹参素 6.50 mg、益母草碱 9.40 mg、迷迭香酸 12.00 mg、丹酚酸 B 10.00 mg，置 5 mL 量瓶中，加 70% 甲醇至刻度，摇匀，即得丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 对照品混合溶液，浓度分别为 1.30、1.88、2.40、2.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 同 2.1.3 项。

2.2.4 各种阴性对照溶液的制备 依据调经益母片千粒处方，制备缺益母草药材的阴性制剂，再依据“2.1.3”项制备益母草阴性对照溶液；同法，制备缺丹参材的阴性对照溶液。

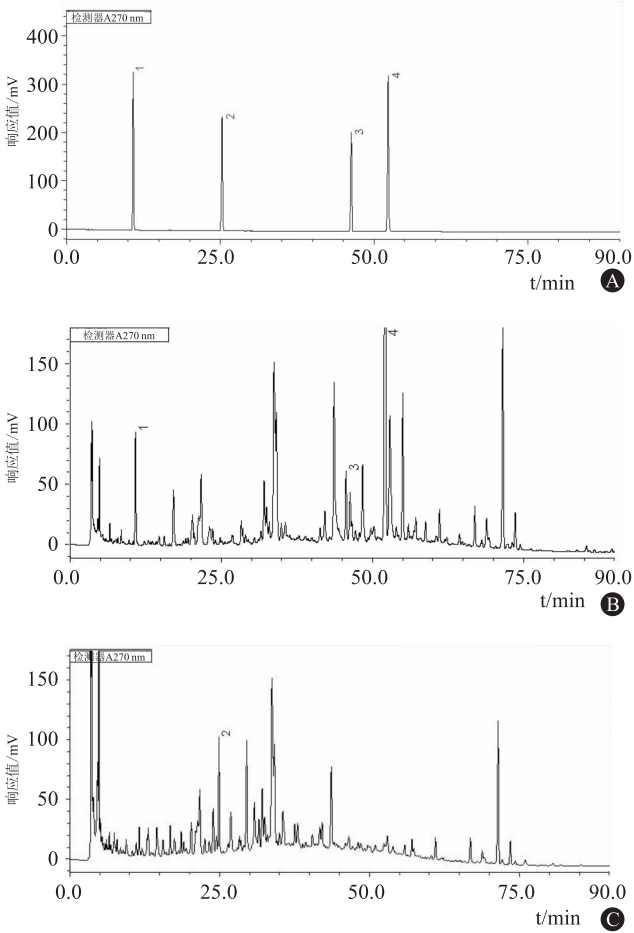
2.2.5 专属性试验 分别吸取制备的标准品溶液、调经益母样品溶液和阴性对照溶液各 10 μL ，按上述“2.1.1”项色谱条件，注入液相色谱仪测定分析，结果表明阴性样品在与供试品中丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 相同的保留时间处无干扰峰。结果，阴性对照溶液均无干扰，见图 1、图 3。

2.2.6 线性关系 分别精密量取储备液 25, 50, 100, 250, 500 和 1 000 μL 放置于各个 1 mL 棕色容量瓶中，并加 70% 甲醇稀释至刻度，用 0.22 μm 有机微孔滤膜滤过 1 次，注入液相色谱仪测定。以峰面积值(Y)作为纵坐标，各对照品的质量浓度(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为横坐标，通过 Ecel 计算，得线性方程及相关系数(r)，结果见表 1 和图 3 说明各对照品在对应浓度范围内线性关系良好的。

2.2.7 精密度试验 吸取调经益母片样品溶液(批号 20160506) 10 μL ，连续进样 5 次，测得丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 的相对标准差(RSD)分别为 0.98%、1.12%、0.97%、1.05%。表明该仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 分别在第 0, 2, 4, 8, 12 和 24 点精密吸调经益母片样品溶液(批号 20160506)进样。结果，丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 的峰面积的 RSD 值分别为 1.02%、0.93%、1.23%、1.16%，表明该溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取同一批调经益母片样品



注:1 丹参素;2 益母草碱;3 迷迭香酸;4 丹酚酸 B
图 3 HPLC 色谱图谱:A 为混合对照品 HPLC 图谱;
B 为调经益母片 HPLC 阴性对照图谱(缺益母草药材);
C 为调经益母片 HPLC 阴性对照图谱(缺丹参药材)

(批号 20160506)按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份溶液，按“2.1.1”项下色谱条件注入液相色谱测定分析。结果，4 成分即丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 平均含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)分别为 2.40、3.60、6.00 和 60.00 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，RSD 值分别为 1.07%、0.93%、1.01%、0.99%，表明该方法具有良好重复性。

2.2.10 加样回收率试验 取本品(批号 20160506，其中丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 含量分别为 2.40、3.60、6.00、60.00 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)粉末 0.5 g，

表 2 加样回收率测定结果

化合物名称	取样量/g	样品中含量/mg	加对照品入量/mg	测定总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
丹参素						98.36	1.08
	0.511 1	1.226 6	0.96	2.162 2	97.458 3		
	0.522 3	1.253 5	0.96	2.182 9	96.812 5		
	0.514 1	1.233 8	1.20	2.430 0	99.683 3		
	0.506 2	1.214 9	1.20	2.397 6	98.558 3		
	0.513 1	1.231 4	1.44	2.650 6	98.555 6		
	0.504 1	1.209 8	1.44	2.636 6	99.083 3		
益母草碱						98.56	0.88
	0.511 1	1.840 0	1.44	3.261 4	98.708 3		
	0.522 3	1.880 3	1.44	3.283 0	97.409 7		
	0.514 1	1.850 8	1.80	3.626 1	98.627 8		
	0.506 2	1.822 3	1.80	3.622 1	99.988 9		
	0.513 1	1.847 2	2.16	3.963 5	97.976 9		
	0.504 1	1.814 8	2.16	3.945 6	98.648 1		
迷迭香酸						98.09	0.88
	0.511 1	3.066 6	2.40	5.441 9	98.970 8		
	0.522 3	3.133 8	2.40	5.487 0	98.050 0		
	0.514 1	3.084 6	3.00	6.051 3	98.890 0		
	0.506 2	3.037 2	3.00	5.982 3	98.170 0		
	0.513 1	3.078 6	3.60	6.602 3	97.880 6		
	0.504 1	3.024 6	3.60	6.502 2	96.600 0		
丹酚酸 B						98.14	0.78
	0.511 1	30.666 0	24.00	54.418 8	98.970 0		
	0.522 3	31.338 0	24.00	54.870 0	98.050 0		
	0.514 1	30.846 0	30.00	60.513 0	98.890 0		
	0.506 2	30.372 0	30.00	59.823 0	98.170 0		
	0.513 1	30.786 0	36.00	66.022 8	97.880 0		
	0.504 1	30.246 0	36.00	65.122 4	96.878 9		

精密称定,分别添加混合对照品溶液(精密称取丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 对照品适量,制成每 1 mL 体积分数为 70% 甲醇中含量分别为 0.30,0.45,0.75,7.50 mg)3.20 mL 或 4.00 mL 或 4.80 mL,再分别加蒸馏水至 25 mL,按照“2.1.3”供试品溶液的制备项下方法制备样品溶液,共制备 6 份样品(低、中、高浓度各 2 份),按照“2.1.1”色谱条件项下色谱条件注入液相色谱仪测定。结果见表 2,表明该方法加样回收率良好。

2.2.11 含量测定 精密量取 10 批样品,分别按照“2.1.3”项下方法制备供试品,按照“2.1.1”项下色谱条件测定。各批样品中丹参素、益母草碱、迷迭香酸与丹酚酸 B 的平均含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、RSD 见表 3。

3 讨论

3.1 检测波长的确定 采用二极管陈列全波长(200.0~800.0 nm)对调经益母片样品进行扫描检测,根据三维色谱图与对应波长下峰的信息量。结

果显示,270 nm 时信息量最多,同时 4 个成分与相邻各峰分离度较好,所以将 270 nm 作为 HPLC 指纹

表 3 调经益母片 4 种成分含量测定结果

批号	含量测定结果/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			
	丹参素	益母草碱	迷迭香酸	丹酚酸 B
20160506	2.40	3.60	6.00	60.00
20160507	2.34	3.56	5.98	59.54
20160508	2.41	3.58	5.88	60.01
20160509	2.43	3.66	6.02	59.98
20160510	2.34	3.62	5.97	60.10
20160511	2.39	3.57	5.99	58.62
20160512	2.38	3.63	5.81	60.00
20160513	2.40	3.61	6.10	60.03
20160514	2.42	3.58	6.08	58.89
20160515	2.37	3.64	6.05	59.16
平均含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	2.39	3.61	5.98	60.11
RSD/%	1.30	0.91	1.46	0.92

图谱定性与4个成分定量的波长。

3.2 洗脱方法的选择 中药复方制剂成分较多,各成分在水与醇中溶解度不一样,等度洗脱难以充分洗脱各种成分,所以采用梯度洗脱的方法。

3.3 色谱柱的选择 笔者曾选用色谱柱:阿克苏诺贝尔 Kromasil C18, Lubex Kromasil C18, Phenomenex Luna C18(2), Dikma Platisil ODS(均为4.60 mm × 250.0 mm, 5.0 μm)。结果表明阿克苏诺贝尔 Kromasil C18 柱效高,分离度较理想。

3.4 流动相的选择 笔者曾选择不同流动相系统即甲醇-水、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-醋酸水溶液等进行了比较。也选择了磷酸水溶液不同浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)即1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液等进行了比较。结果显示,各种流动相系统中以5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸水溶液-乙腈系统为最佳,在其图谱上各个色谱峰的分离度与保留时间均较符合要求,所以选5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸水溶液-乙腈流动相系统作为本制剂指纹图谱与4成分测定的流动相系统。

3.5 柱温与流速的选择 笔者曾选择了不同柱温(20、25、30、35、40 ℃等)与流速(0.5、0.8、1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 等)进行比较,柱温超过或低于30 ℃时,多数色谱峰分离度小或者不能分开;流速低于或高于0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,多数色谱峰分离度差。因此,选择便于控制的柱温30 ℃,流速0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

3.6 色谱记录时间的选择 色谱记录时间,在90 min之后,无色谱峰出现。因此,选择记录时间为90 min。

3.7 制样方法的选择 笔者曾对制样方法进行了比较,由于制剂为水煎,所以采用水作为溶剂;处理方法:超声(5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min)或加热回流

(20, 30, 40, 60 min)。比较结果表明,加水超声30.0 min较理想。

综上所述,笔者建立的调经益母片的HPLC指纹图谱定性方法与4种成分定量方法,具有操作简便、准确可靠、回收率与稳定性及重复性好等明显优势。因此,该方法可作为本品质量控制与评价的一种有效方法。

参考文献

- [1] 张雪,宋玉琴,杨雨婷,等.益母草活血化痰化学成分与药理作用研究进展[J].药物评价研究,2015,38(2):214-217.
- [2] 苗明三,张玉林,史晶晶,等.复方益母草口服液对大鼠痛经模型的影响[J].中药药理与临床,2008,24(5):56-57.
- [3] 孙亚楠,张祥,刘子荣,等.益母草碱口服油包油微乳在大鼠体内的药动学研究[J].中国药房,2015,26(1):30-33.
- [4] 王微,周国军,李焱,等.土壤水分对新鲜和采后干燥丹参根中活性成分含量的影响[J].安徽医药,2015,19(2):248-251.
- [5] 林超,刘兆国,钱星,等.丹酚酸B在心血管疾病中药理作用研究进展[J].中国药理学通报,2015,31(4):449-452.
- [6] 肖玲芳,张卫芳,龚志成.丹酚酸B的心血管药理研究进展[J].中南医学科学杂志,2015,43(1):90-94.
- [7] 杨吕洪,刘强.丹参化学成分在心血管疾病中的研究进展[J].黑龙江中医药,2015,44(6):64-66.
- [8] 屠鹏飞,郑家通,李干孙.新型资源植物迷迭香的化学成分及其应用[J].天然产物研究与开发,1998,10(3):62-68.
- [9] 郭力城,杨东爱,余胜民,等.土甘草药理作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(1):154-155.
- [10] 黄婉锋,余彦海,申放,等.HPLC法测定调经益母片中3种水溶性成分的含量[J].西北药学杂志,2012,27(5):405-407.
- [11] 肖小河,金城,赵中振.论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J].中国中药杂志,2007,31(14):1377-1381.
- [12] 国家药品监督管理局.关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知[J].中成药,2000,22(10):671.

(收稿日期:2016-11-07,修回日期:2018-04-25)

◇ 编读往来 ◇

校对诀要

为保证作者文稿刊出准确无误,责编会将编辑的文稿发回作者,要做好这份刊前稿样的校对,作者的操作诀要是:(1)必须回答编者提出的问题(将有批注或文字提问)。详核文题、作者姓名和单位名称(邮编)、科室。(2)对正文(包括外文拼写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对。无原则问题,尽量不改动。(3)务请核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应。参考文献缺项的内容,按本刊规定格式补充(如前3位作者全部著录,卷、期要同时写明,作者名刊名宜缩写)。(4)认真核查法定计量单位及药物剂量;认真核校文内、表和图中的数字有无计算错误;认真复核统计学处理,写出统计量的具体值(如 χ^2 值、 t 值、 P 值的大小)。(5)若改动,必须将编辑编审的电子稿(编辑发回的刊前稿样)下载后用“修订格式”直接修改发回即可——切勿删去修改痕迹。切勿另行启用其它稿样修改。(6)校毕应于3 d内发回修改稿,可附以修改说明。

(郝希春)