

# HPLC法同时测定情之怡片中4种成分

张海弢，付娟，李曼曼，柏伟荣，王振中，萧伟\*

(江苏康缘药业股份有限公司，中药制药过程新技术国家重点实验室，江苏连云港 222047)

**摘要：**目的 建立HPLC法同时测定情之怡片(葛根、余甘子、丹参等)中4种成分的含有量。**方法** 该药物50%甲醇提取液的分析采用Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以0.1%甲酸-甲醇-乙腈为流动相,梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温30 ℃;检测波长270 nm。**结果** 没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>分别在11.95~382.48、14.23~455.28、10.77~344.68、3.89~124.32 μg/mL范围内呈良好的线性关系,平均加样回收率分别为99.96%、100.92%、98.87%、97.67%, RSD分别为1.09%、1.30%、1.11%、1.22%。**结论** 该方法灵敏、简便、准确,可用于情之怡片的质量控制。

**关键词：**情之怡片；没食子酸；葛根素；丹酚酸B；丹参酮A；HPLC

中图分类号：R927.2

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2017)05-0968-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.017

## Simultaneous determination of four constituents in Qingzhiyi Tablets by HPLC

ZHANG Hai-tao, FU Juan, LI Man-man, BAI Wei-rong, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei\*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222047, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Qingzhiyi Tablets (*Puerariae lobatae Radix*, *Phyllanthi Fructus*, *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, etc.).

**METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of 0.1% formic acid-methanol-acetonitrile flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 270 nm.

**RESULTS** Gallic acid, puerarin, salvianolic acid B and tanshinone II<sub>A</sub> showed good linear relationships within the ranges of 11.95~382.48, 14.23~455.28, 10.77~344.68 and 3.89~124.32 μg/mL, whose average recoveries were 99.96%, 100.92%, 98.87% and 97.67% with the RSDs of 1.09%, 1.30%, 1.11% and 1.22%, respectively. **CONCLUSION** This sensitive, simple and accurate method can be used for the quality control of Qingzhiyi Tablets.

**KEY WORDS:** Qingzhiyi Tablets; gallic acid; puerarin; salvianolic acid B; tanshinone II<sub>A</sub>; HPLC

情之怡片是由葛根、余甘子、丹参、破壁灵芝孢子粉和姜黄提取物制成的具有对化学性肝损伤有辅助保护功能的保健食品。文献[1-5]报道,葛根素、没食子酸、丹参酮等成分对肝损伤有防护作用。在评价复方中药质量时,多指标成分同时测定比单一指标成分测定更科学,能更好地表征药品质

量,而且方法快速可靠<sup>[6-12]</sup>,故本实验采用HPLC法同时测定情之怡片中没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮II<sub>A</sub>的含有量,以期为其质量标准的建立提供科学依据。

### 1 仪器与试药

Ultimate 3000 HPLC 色谱仪,配置DAD 紫外检

收稿日期：2016-08-11

作者简介：张海弢（1987—），男，硕士，助理研究员，从事中药新药与功能性保健食品研究与开发。Tel: (0518) 81152330, E-mail: zht716@126.com

\*通信作者：萧伟（1959—），男，博士，高级工程师，从事中药新药研究与开发。Tel: (0518) 81152337, E-mail: kanionlunwen@163.com

测器(美国Thermo Fisher公司)。葛根素(含有量95.5%, 批号110752-201514)、没食子酸(含有量89.9%, 批号110831-201204)、丹酚酸B(含有量93.7%, 批号111562-201514)、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>(含有量98.9%, 批号110766-201520)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯(美国天瑞公司);其他试剂均为分析纯;水为超纯水。情之怡片(批号20150301、20150302、20150303、20150401、20150402、20150403、20150501、20150601、20150701、20151001)由江苏康缘药业股份有限公司现代中药研究院研制。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm);流动相A为0.1%甲酸,B为甲醇-乙腈(50:50),梯度洗脱(0~20 min, 98%~70% A; 20~30 min, 70%~10% A; 30~45 min, 10% A);柱温30 °C;检测波长270 nm;体积流量1.0 mL/min;进样量10 μL。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取各对照品适量,加50%甲醇制成分别含没食子酸95.62 μg/mL、葛根素113.82 μg/mL、丹酚酸B86.17 μg/mL、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>31.08 μg/mL的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取本品包衣片10片,研钵研细,精密称取1 g,置于磨口具塞三角瓶中,精密加入50%甲醇20 mL,称定质量,超声提取30 min(200 W、40 kHz),放冷,50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

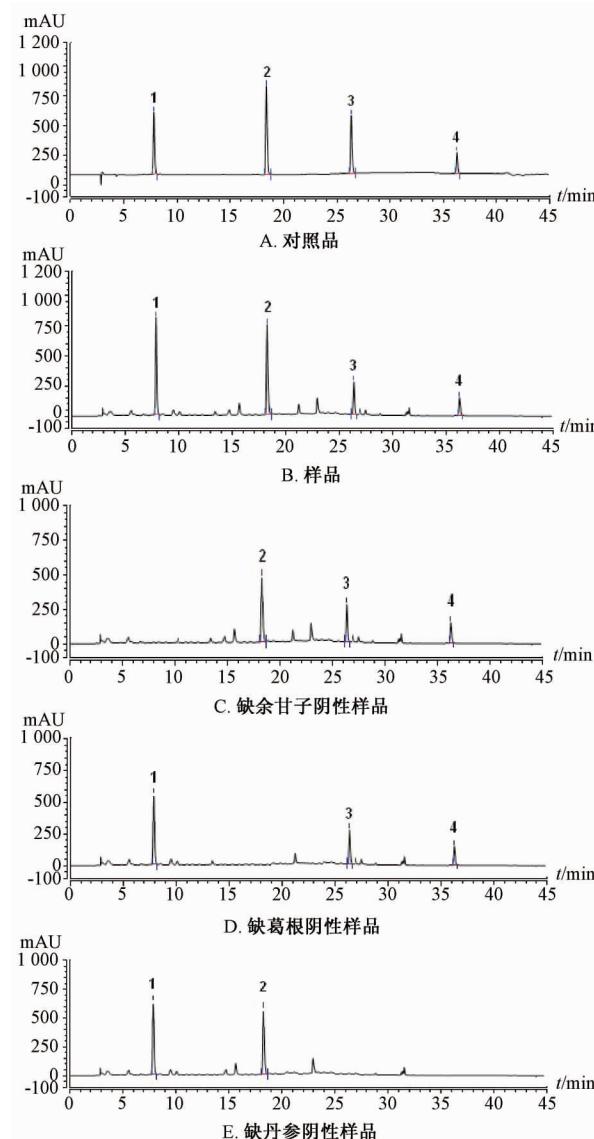
**2.2.3 阴性对照溶液** 取缺丹参、葛根、余甘子阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备相应的阴性对照溶液。

**2.3 系统适用性试验** 取对照品、供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进行系统适用性试验。结果,没食子酸理论塔板数为7 000,葛根素为8 500,丹酚酸B为11 000,丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>为9 080,分离度均大于1.5。

**2.4 检测波长选择** 在210~400 nm波长处对各对照品溶液进行光谱扫描,发现没食子酸最大吸收波长为250 nm,葛根素为270 nm,丹酚酸B为273 nm,丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>为286 nm。为了方便操作,最终选择检测波长为270 nm。

**2.5 阴性对照试验** 按照情之怡片制备工艺制备缺丹参、葛根、余甘子的阴性样品,在“2.1”项色谱条件下进样分析,结果见图1。由图可知,没

食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>色谱峰未在色谱图中出现,表明阴性无干扰。



1. 没食子酸 2. 葛根素 3. 丹酚酸B 4. 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>  
1. gallic acid 2. puerarin 3. salvianolic acid B 4. tanshinone II<sub>A</sub>

图1 4种成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of four constituents

**2.6 线性关系考察** 精密称取各对照品适量,加50%甲醇制成分别含没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>382.48、455.28、344.68、124.32 μg/mL的对照品溶液,等比稀释,在“2.1”项色谱条件下精密吸取10 μL注入色谱仪进样测定。以对照品浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>回归方程分别为Y=1.005 9X+3.478 6, r=0.999 7; Y=1.037 4X+3.196 5, r=0.999 8; Y=

$1.0005X + 0.3507$ ,  $r = 0.9999$ ;  $Y = 1.0468X - 0.3246$ ,  $r = 0.9999$ , 分别在  $11.95 \sim 382.48$ 、 $14.23 \sim 455.28$ 、 $10.77 \sim 344.68$ 、 $3.89 \sim 124.32 \mu\text{g}/\text{mL}$  范围内呈良好的线性关系。

**2.7 定量限考察** 将4个对照品溶液逐步稀释后进样, 以信噪比(S/N)为10时考察没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>定量限, 结果分别为0.09、0.05、0.06、0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**2.8 精密度试验** 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10  $\mu\text{L}$ , 在“2.1”项色谱条件下连续进样6次, 测得没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>峰面积RSD分别为0.83%、0.57%、1.02%、1.87%, 表明仪器精密度良好。

**2.9 稳定性试验** 在“2.1”项色谱条件下取同一供试品溶液(批号20150301), 于0、1、2、4、6、12、24 h注入色谱仪进样, 测得没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>峰面积RSD分别为1.02%、0.96%、1.14%、0.51%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.10 重复性试验** 取样品(批号20150301)适量, 按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含有量RSD分别为0.86%、0.34%、0.57%、1.01%, 表明该方法重复性良好。

**2.11 回收率试验** 精密称取含有量已知的样品(批号20150301)约0.5 g, 共9份, 置于磨口具塞锥形瓶中, 每3份1组, 精密加入对照品溶液(含没食子酸0.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、葛根素1.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丹酚酸B0.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>0.30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )0.5、1.0、1.5 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 摆匀, 滤过, 在“2.1”项色谱条件下计算回收率, 结果见表1。

**2.12 样品含有量测定** 精密称取10批样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 结果见表2。

### 3 讨论与结论

本实验考察了甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-乙腈-0.1%磷酸、甲醇-乙腈-水、0.1%甲酸-甲醇-乙腈体系, 发现0.1%甲酸-甲醇-乙腈系统下基线平稳, 峰形较尖锐, 分离度好, 故选择其作为流动相。然后考察了超声提取和回流提取方式, 发现两者无明显差异, 由于前者操作简单, 可操作性强, 故选择超声提取。再考察了不同提取时

表1 4种成分加样回收率试验结果( $n=9$ )Tab. 1 Results of recovery tests for four constituents( $n=9$ )

成分	称样量/原有量/加入量/测得量/回收率/率/(RSD/%)				
	g	mg	mg	mg	%
没食子酸	0.500 1	0.930	0.480	1.410	100.00
	0.500 4	0.931	0.480	1.400	97.71
	0.501 2	0.932	0.480	1.410	99.58
	0.506 4	0.942	0.950	1.900	100.84
	0.500 7	0.931	0.950	1.890	100.95
	0.510 3	0.949	0.950	1.910	101.16
	0.501 7	0.933	1.430	2.360	100.14
	0.503 3	0.936	1.430	2.370	100.28
	0.502 9	0.935	1.430	2.350	98.95
葛根素	0.500 1	0.980	0.510	1.500	101.96
	0.500 4	0.981	0.510	1.500	101.76
	0.501 2	0.982	0.510	1.490	99.61
	0.506 4	0.983	1.010	2.020	102.67
	0.500 7	0.981	1.010	2.010	101.88
	0.510 3	1.000	1.010	2.005	99.50
	0.501 7	0.983	1.520	2.489	99.08
	0.503 3	0.986	1.520	2.530	101.58
	0.502 9	0.986	1.520	2.510	100.26
丹酚酸B	0.500 1	0.405	0.230	0.633	99.13
	0.500 4	0.405	0.230	0.629	97.39
	0.501 2	0.406	0.230	0.635	99.57
	0.506 4	0.410	0.450	0.850	97.78
	0.500 7	0.406	0.450	0.855	99.78
	0.510 3	0.413	0.450	0.851	97.33
	0.501 7	0.406	0.680	1.085	99.85
	0.503 3	0.408	0.680	1.080	98.82
	0.502 9	0.407	0.680	1.088	100.15
丹参酮Ⅱ <sub>A</sub>	0.500 1	0.265	0.150	0.411	97.33
	0.500 4	0.265	0.150	0.412	98.00
	0.501 2	0.266	0.150	0.409	95.33
	0.506 4	0.268	0.300	0.559	97.00
	0.500 7	0.265	0.300	0.561	98.67
	0.510 3	0.270	0.300	0.560	96.67
	0.501 7	0.266	0.450	0.711	98.89
	0.503 3	0.267	0.450	0.709	98.22
	0.502 9	0.267	0.450	0.712	98.89

表2 4种成分含有量测定结果( $mg/g$ ,  $n=2$ )Tab. 2 Results of content determination of four constituents ( $mg/g$ ,  $n=2$ )

批号	没食子酸	葛根素	丹酚酸B	丹参酮Ⅱ <sub>A</sub>
20150301	1.841 3	1.961 3	0.811 7	0.531 6
20150302	1.810 5	1.941 7	0.820 5	0.530 5
20150303	1.851 1	1.942 9	0.811 6	0.541 8
20150401	1.831 4	1.930 6	0.803 8	0.530 6
20150402	1.860 9	1.951 8	0.810 7	0.522 9
20150403	1.820 1	1.921 1	0.821 8	0.531 7
20150501	1.851 3	1.950 9	0.812 7	0.520 6
20150601	1.830 6	1.960 7	0.802 6	0.512 7
20150701	1.821 1	1.942 8	0.801 5	0.541 6
20151001	1.830 9	1.943 6	0.810 3	0.522 9
平均值	1.834 9	1.944 7	0.810 7	0.528 7

间、提取溶剂及其用量，最终确定超声提取时间为30 min，提取溶剂为50% 甲醇，用量为20 mL。

综上所述，本实验采用HPLC法同时测定情之怡片中没食子酸、葛根素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含有量，该方法专属性强，操作简便，结果可靠，对于控制情之怡片的类似处方制剂的质量有一定借鉴作用。

#### 参考文献：

- [1] 李国辉, 张庆文, 王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3156-3159.
- [2] 赵敏, 杜艳秋, 李长喻. 葛根素对急性酒精中毒大鼠保护作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 16(17): 2610-2615.
- [3] 李萍, 谢金鲜, 林启云, 等. 余甘子抗慢性肝损伤性肝纤维化的实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12(6): 355-357.
- [4] 尹明福, 吴文帆, 姜英子, 等. 丹参脂溶性提取物护肝作用的实验研究[J]. 延边大学医学学报, 2003, 26(4): 261-263.
- [5] 刘永刚, 陈厚昌, 蒋毅萍, 等. 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>对小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2001, 24(8): 588-589.
- [6] 崔晓红, 奇海涛, 生宁, 等. HPLC法同时测定益肝康颗粒中没食子酸、丹参素、芍药苷、丹酚酸B和丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 432-436.
- [7] 陆艳芹, 王婧, 徐振秋, 等. HPLC法同时测定清葛片中葛根素、没食子酸及姜黄素的含量[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17(1): 230-233.
- [8] 姜晖, 王绍志, 张熙洁, 等. HPLC法同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 374-376.
- [9] 李妍, 杨燕云, 张振秋, 等. HPLC法同时测定白芍、甘草药对提取物中9种有效成分[J]. 中成药, 2013, 35(1): 100-104.
- [10] 陈晓鹏, 鄂秀辉, 夏忠庭, 等. HPLC法同时定量测定养血清脑颗粒中7个主要成分[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1921-1924.
- [11] 饶毅, 魏惠珍, 崔金国, 等. HPLC法同时测定心可舒制剂中葛根素和丹酚酸B的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1431-1433.
- [12] 刘冰, 徐永波, 王蓉华. HPLC同时测定心可舒胶囊中葛根素、丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含量[J]. 中成药, 2006, 28(5): 669-671.

## 小儿化毒胶囊中雄黄药效和毒性成分的测定

王曦, 夏晶, 曹帅, 李丽敏, 季申\*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:** 目的 测定小儿化毒胶囊(牛黄、珍珠、雄黄等)中雄黄药效(可溶性砷)和毒性成分(价态砷)的含有量。

**方法** 分别采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)法和HPLC-ICP-MS法, 测定样品中可溶性砷和价态砷的含有量。

**结果** 6种价态砷在样品中只检出了三价砷As(Ⅲ)和五价砷As(Ⅴ), 前者含有量更高。可溶性砷、As(Ⅲ)、As(Ⅴ)的平均加样回收率分别为106.2% (RSD=8.3%)、108.0% (RSD=6.8%)、89.8% (RSD=5.1%), 7批样品中可溶性砷含有量为0.31~0.90 mg/粒, 价态砷含有量为0.12~0.52 mg/粒。**结论** 该方法准确、重复性好, 可为控制小儿化毒胶囊中雄黄的疗效和安全性提供依据。

**关键词:** 小儿化毒胶囊; 雄黄; 可溶性砷; 价态砷; ICP-MS; HPLC-ICP-MS

**中图分类号:** R927.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2017)05-0971-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.018

## Determination of effective and toxic compositions of Realgar in Xiao'er Huadu Capsules

收稿日期: 2017-02-16

**基金项目:** 国家自然科学基金(81473347); 上海市科学技术委员会项目(15DZ0502700, 14DZ2294000); 中药质量安全检测和风险控制技术平台项目(2014ZX09304307-002)

**作者简介:** 王曦(1960—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为天然药物质量控制和标准制订。E-mail: wangxi3000@126.com

\*通信作者: 季申(1963—), 女, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向为天然药物质量控制和标准制订。Tel: (021) 50798195