

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01125

• 研究快报 •

## RP-HPLC 法测定活血化瘀方中 7 种有效成分

陈琳<sup>1</sup>, 张新新<sup>1</sup>, 党璇<sup>1</sup>, 张天龙<sup>2</sup>, 李振志<sup>1</sup>, 赵晔<sup>1\*</sup>

1. 西北大学陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069

2. 西北大学生命科学学院中药学系, 西安 710069

**[摘要]** **目的** 建立 RP-HPLC 法测定活血化瘀方(blood-invigorating and stasis-removing prescription, BSP)中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 及黄芪甲苷含量的方法。**方法** 采用 Waters Symmetry Shield™ RP C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.25% (体积比) 冰醋酸水溶液为流动相, 流速为 0.8 mL/min, 柱温 30℃。丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸和丹参酮 II A 采用紫外检测器, 检测波长为 280 nm; 黄芪甲苷采用蒸发光散射检测器, 漂移管温度 90℃, 气流量 2.8 L/min (压缩空气)。**结果** 丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 和黄芪甲苷的线性范围分别为 0.01~0.80 μg ( $r=0.999\ 8$ ), 0.005~0.4 μg ( $r=0.999\ 7$ ), 0.05~4 μg ( $r=0.999\ 8$ ), 0.005~0.4 μg ( $r=0.999\ 7$ ), 0.006~0.5 μg ( $r=1$ ), 0.005~0.4 μg ( $r=1$ ), 0.031~2.46 μg ( $r=0.999\ 3$ ); 加样回收率均在 97.0%~101.0% 之间, 且 RSD 均小于 2%。测定了 3 批样品中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 和黄芪甲苷的含量(平均值)分别为 1.15、0.13、4.48、0.80、0.72、0.31、3.12 mg/g。**结论** 该方法简便、准确、灵敏, 为测定 BSP 中的有效成分的含量提供参考。

**[关键词]** 活血化瘀方; 丹参素; 原儿茶醛; 芍药苷; 葛根素; 阿魏酸; 丹参酮 II A; 黄芪甲苷; 高压液相色谱法

**[中图分类号]** R 284.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)10-1125-05

## RP-HPLC in determination of seven active ingredients in blood-invigorating and stasis-removing prescription

CHEN Lin<sup>1</sup>, ZHANG Xin-xin<sup>1</sup>, DANG Xuan<sup>1</sup>, ZHANG Tian-long<sup>2</sup>, LI Zhen-zhi<sup>1</sup>, ZHAO Ye<sup>1\*</sup>

1. Biomedicine Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To develop an RP-HPLC method for determination of tanshinol, protocatechualdehyde, paeoniflorin, puerarin, ferulic acid, tanshinone II A and astragaloside in blood-invigorating and stasis-removing prescription (BSP). **Methods** The analysis was performed with a column of Waters Symmetry Shield™ RP C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), and the mobile phase consisted of methanol-0.25% acetic acid. The flow rate was 0.8 mL/min and the column temperature was 30℃. UV was employed to determine the contents of tanshinol, protocatechualdehyde, paeoniflorin, puerarin, ferulic acid and tanshinone II A, and the detection wavelength was set at 280 nm. Evaporative light scattering detection (ELSD) was employed to determine the contents of astragaloside. The temperature of drift tube was 90℃ and the gas flow was 2.8 L/min (compressed air). **Results** The linearity was obtained over 0.01-0.80 μg ( $r=0.999\ 8$ ) for tanshinol, 0.005-0.4 μg ( $r=0.999\ 7$ ) for protocatechualdehyde, 0.05-4 μg ( $r=0.999\ 8$ ) for paeoniflorin, 0.005-0.4 μg ( $r=0.999\ 7$ ) for puerarin, 0.006-0.5 μg ( $r=1$ ) for ferulic acid, 0.005-0.4 μg ( $r=1$ ) for tanshinone II A, and 0.031-2.46 μg ( $r=0.999\ 3$ ) for astragaloside. The recoveries were all between 97.0%-101.0%, and RSDs were all less than 2%. The contents (mean) of tanshinol, protocatechualdehyde, paeoniflorin, puerarin, ferulic acid, tanshinone II A and astragaloside in three batches of samples were 1.15, 0.13, 4.48, 0.80, 0.72, 0.31 and 3.12 mg/g, respectively. **Conclusion** The method in our study is convenient, accurate and sensitive, and it provides a reference for the determination of active ingredients in BSP.

**[收稿日期]** 2013-05-28

**[接受日期]** 2013-08-08

**[基金项目]** 西北大学“十二五”“211工程”研究生创新人才培养项目(YZZ12059). Supported by Graduate Innovation and Creativity Funds of Northwest University (YZZ12059).

**[作者简介]** 陈琳, 硕士. E-mail: chenlin0924@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-88302032, E-mail: zhaoye@nwu.edu.cn

[Key words] blood-invigorating and stasis-removing prescription; tanshinol; protocatechualdehyde; paeoniflorin; puerarin; ferulic acid; tanshinone II A; astragaloside; high pressure liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10): 1125-1129]

脑血管疾病是世界上最主要的致死、致残疾病之一,严重危害人类的生命健康,通过溶栓等现代治疗方法,虽然能快速恢复患者的血液供应,但是脑缺血再灌注后往往伴随着更严重的脑损伤,导致脑水肿、线粒体功能障碍、脑出血、细胞凋亡等<sup>[1-2]</sup>。活血化瘀方(blood-invigorating and stasis-removing prescription, BSP)是由治疗脑血管病的临床应用药物圣脑康丸<sup>[3]</sup>拆方而得,因圣脑康丸中成分复杂,不利于其质量控制,我们在大量实验的基础上进行了拆方研究,最终确定的 BSP 主要由丹参、川芎、黄芪、葛根、赤芍等中药组成。丹参、川芎、葛根等中药材及其有效成分均具有保护脑缺血损伤的作用<sup>[4-6]</sup>,是 BSP 对脑缺血损伤的保护作用的理论基础。根据我们初期的实验研究, BSP 对脑血管疾病尤其是脑缺血再灌注损伤有很好的疗效,并且疗效优于圣脑康丸。本实验首次采用高效液相色谱-紫外吸收检测器(RP-HPLC-UV)同时测定了 BSP 中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸和丹参酮 II A 的含量,并通过高效液相色谱-蒸发光散射检测器(RP-HPLC-ELSD)测定了 BSP 中黄芪甲苷的含量,为全面检测 BSP 中的有效成分提供参考方法,并为下一步的实验研究如药效学和药代动力学提供实验基础。

## 1 仪器和试剂

美国 Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪(HPLC),包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱; Waters 2487 紫外检测器, Empower 2 色谱工作站; Alltech ELSD 2000ES 蒸发光散射检测器; GCK3308 全自动空气源(北京中惠普分析技术研究所);精密交流净化稳压电源(鸿宝电器股份有限公司);赛多利斯 BT25S(max=21 g, d=0.01 mg)电子天平;昆山 KQ-500 DE 型数控超声波清洗机; SZ-96 自动纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);美国 Millipore 公司超纯水发生器。

丹参、川芎、葛根、黄芪、赤芍等药材,购自西安万寿路药材市场,经陕西省生物医药重点实验室孙文基教授鉴定,符合《中国药典》2010 年版相关项下

标准。丹参素(110855-200506)、原儿茶醛(110810-200205)、芍药苷(0736-9608)、葛根素(1111-081021)、阿魏酸(110773-200611)、丹参酮 II A(0766-200213)、黄芪甲苷(0781-200510)购自中国食品药品检定研究院。色谱甲醇(美国 Fisher 公司);冰醋酸为分析纯(西安化学试剂厂),水为超纯水(自制,并经 0.22 μm 水系滤膜过滤)。

## 2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Waters Symmetry Shield<sup>TM</sup> RP C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.25%(体积比)冰醋酸水溶液(B); 程序 I: 梯度洗脱(0~5 min, 10%→20% A; 5~10 min, 20%→25% A; 10~20 min, 25%→30% A; 20~30 min, 30%→80% A; 30~35 min, 80% A; 35~40 min, 80%→100% A), 程序 II: 等度洗脱 80% A-20% B; 流速: 0.8 mL/min; 紫外检测波长: 280 nm; ELSD 漂移管温度 90℃, 气流量 2.8 L/min(压缩空气); 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL。丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 采用程序 I 梯度洗脱, 紫外检测器检测; 黄芪甲苷采用程序 II 等度洗脱, 蒸发光散射检测器检测。

2.2 对照品储备液的配制 精密称取丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸及丹参酮 II A 对照品适量, 70% 甲醇溶解, 配成混合对照品溶液(丹参素为 80 μg/mL、原儿茶醛为 40 μg/mL、芍药苷为 400 μg/mL、葛根素为 40 μg/mL、阿魏酸为 50 μg/mL、丹参酮 II A 为 40 μg/mL); 另精密称取黄芪甲苷对照品适量, 70% 甲醇溶解, 配成浓度为 492 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取 BSP 药材粉末 3.80 g, 五味药材丹参、川芎、黄芪、葛根、赤芍的质量比为 4:4:4:4:3。丹参、川芎两味药加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 2 h, 合并煎液, 滤过, 备用; 药渣与葛根、黄芪和赤芍三味药材加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并煎液, 滤过, 备用; 2 次滤液合并, 蒸干, 加 70% 甲醇适量, 超声, 待样品溶解后转移至 100 mL 量瓶, 补充 70% 甲醇至刻度, 摇匀并经 0.45 μm

有机微孔滤膜滤过,即得。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性实验 分别取对照品储备液、供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图(见图 1、图 2),丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 和黄芪甲苷的理论塔板数分别为 6 839、12 023、22 691、23 672、48 395、435 801、1 483 073;相邻色谱峰的分离度均大于 1.5;对称因子均在 0.95~1.05 之间,均符合定量分析要求。

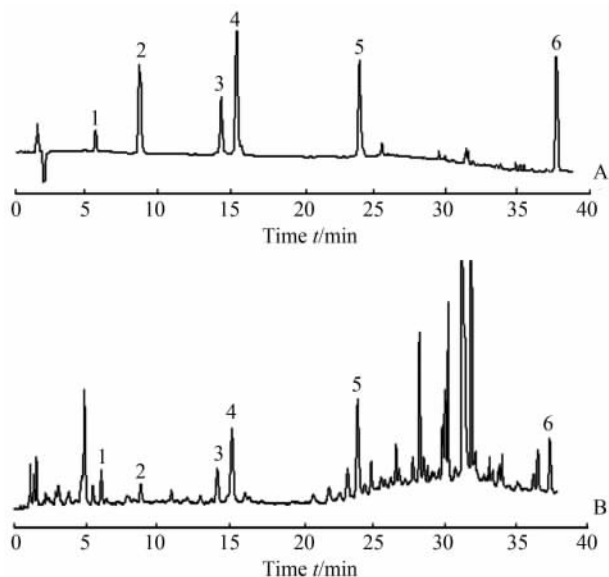


图 1 混合对照品(A)和样品(B)的 HPLC-UV 图谱

Fig 1 HPLC-UV chromatograms of mixed standard (A) and sample (B) solutions

1: Tanshinol; 2: Protocatechualdehyde; 3: Paeoniflorin; 4: Puerarin; 5: Ferulic acid; 6: Tanshinone II A

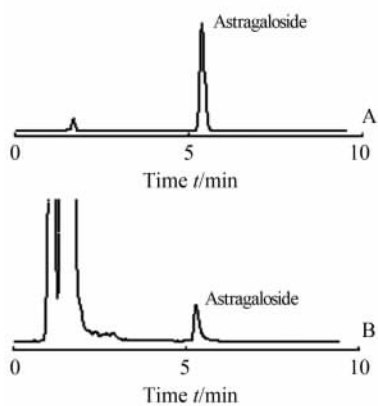


图 2 黄芪甲苷对照品(A)和样品(B)的 HPLC-ELSD 图谱

Fig 2 HPLC-ELSD chromatograms of astragaloside standard (A) and sample (B) solutions

2.4.2 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下的混合对照品储备液,用 70% 甲醇配制成系列的混合标准品溶液(丹参素依次为 1、2、4、8、16、32、64、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;原儿茶醛依次为 0.5、1、2、4、8、16、32、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;芍药苷依次为 5、10、20、40、80、160、320、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;葛根素依次为 0.5、1、2、4、8、16、32、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;阿魏酸依次为 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;丹参酮 II A 依次为 0.5、1、2、4、8、16、32、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),进样体积 10  $\mu\text{L}$ ,以峰面积积分值  $Y$  为纵坐标,以进样量  $X(\mu\text{g})$  为横坐标制定标准曲线,计算回归方程和线性范围。另精密吸取 2.2 项下的黄芪甲苷对照品储备液,用 70% 甲醇配制成系列标准品溶液(依次为 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、246  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),进样体积 10  $\mu\text{L}$ ,以对照品峰面积的常用对数值  $Y$  为纵坐标,以进样量  $X(\mu\text{g})$  的常用对数值为横坐标进行线性回归,计算回归方程和相关系数。以最低检测限信噪比  $S/N=3$  和最低定量限信噪比  $S/N=10$  为原则,分别计算丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 和黄芪甲苷的最低检测限和最低定量限,见表 1,均符合定量分析要求。

2.4.3 稳定性实验 取同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。计算样品中各成分含量的 RSD,结果丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 及黄芪甲苷的 RSD 分别为 0.85%、0.58%、0.62%、0.97%、0.93%、0.87%、0.79%,均符合定量分析要求。

2.4.4 加样回收实验和精密度实验 精密称取一定量的 BSP 药材约 1.9 g,共 9 份,分别精密加入高、中、低 3 个浓度的 7 种对照品。按 2.3 项下制备方法制备样品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,计算加样回收率。同一浓度 1 d 内测定 5 次,计算日内精密度;同一浓度每日测定 1 次连续测定 5 d,计算日间精密度,结果见表 2,均符合定量分析要求。

2.5 样品的测定 按 2.3 项下的方法制备 3 批供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,每批分别平行测定 3 次,记录峰面积,代入标准曲线,计算丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮 II A 及黄芪甲苷的含量,结果见表 3。

表 1 BSP 中 7 种有效成分的线性关系

Tab 1 Linear relation of seven active ingredients of BSP

Component	Regression equation	<i>r</i>	Linear range <i>m</i> /μg	LOD <i>m</i> /ng	LOQ <i>m</i> /ng
Tanshinol	$Y=324\ 330X-1\ 871.9$	0.999 8	0.01-0.8	5	10
Protocatechualdehyde	$Y=3\ 246\ 900X-8\ 178.3$	0.999 7	0.005-0.4	1.25	2.5
Paeoniflorin	$Y=5\ 016X-283.45$	0.999 8	0.05-4	25	50
Puerarin	$Y=57\ 993X-503.69$	0.999 7	0.005-0.4	2.5	5
Ferulic acid	$Y=1\ 895\ 400X-2\ 050.8$	1.000 0	0.006-0.5	1.06	3.13
Tanshinone II A	$Y=2\ 160\ 500X+377.59$	1.000 0	0.005-0.4	1.25	2.5
Astragaloside	$Y=1.755\ 6X+6.053$	0.999 3	0.031-2.46	15.63	31.25

BSP: Blood-invigorating and stasis-removing prescription; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantity

表 2 回收率和精密度实验结果

Tab 2 Recovery and precision of the assay

Component	Known amount <i>m</i> /mg	Added amount <i>m</i> /mg	Recovery (%)		Precision (%)	
			Mean	RSD	Intra-day	Inter-day
Tanshinol	2.18	1.68	100.1	0.84	0.36	1.14
	2.19	2.10	99.03	1.13	0.56	1.23
	2.19	2.52	98.40	0.98	0.53	0.98
Protocatechualdehyde	0.24	0.18	98.47	0.73	0.57	0.78
	0.25	0.23	99.58	0.92	0.73	0.87
	0.25	0.28	99.05	1.08	0.58	0.95
Paeoniflorin	8.51	6.78	97.56	1.41	0.77	0.88
	8.50	8.47	98.22	1.02	0.84	0.94
	8.52	10.16	99.64	1.21	0.68	1.23
Puerarin	1.52	1.20	99.35	0.89	0.37	0.78
	1.51	1.50	98.13	0.94	0.47	0.83
	1.53	1.80	101.0	0.93	0.45	0.86
Ferulic acid	1.40	1.10	98.73	0.53	0.53	0.68
	1.41	1.38	99.04	0.63	0.37	0.85
	1.40	1.66	99.46	0.36	0.57	0.79
Tanshinone II A	0.58	0.48	99.24	0.45	0.41	0.56
	0.59	0.60	100.2	0.47	0.54	0.72
	0.59	0.72	99.79	0.76	0.43	0.85
Astragaloside	5.94	4.74	97.14	1.57	0.98	1.22
	5.95	5.92	98.57	1.26	1.15	1.35
	5.96	7.10	98.84	1.66	1.02	1.19

表 3 BSP 中各成分的含量

Tab 3 The contents of seven active ingredients of BSP

$w_B/(mg \cdot g^{-1}); n=3, \bar{x} \pm s$

Batch	Tanshinol	Protocatechualdehyde	Paeoniflorin	Puerarin	Ferulic acid	Tanshinone II A	Astragaloside
1	1.15±0.01	0.13±0.01	4.48±0.01	0.80±0.01	0.74±0.01	0.31±0.01	3.13±0.02
2	1.16±0.01	0.13±0.01	4.47±0.02	0.80±0.01	0.70±0.01	0.30±0.01	3.11±0.02
3	1.15±0.02	0.12±0.01	4.48±0.01	0.79±0.01	0.72±0.02	0.31±0.01	3.13±0.01

BSP: Blood-invigorating and stasis-removing prescription

### 3 讨论

3.1 BSP供试品制备条件的考察 丹参、川芎两味药材用70%乙醇加热回流提取2次,葛根、黄芪和赤芍三味药材采用水煎煮法提取2次,得到的滤液合并,蒸干,分别用50%、70%、85%甲醇溶解,结果显示用70%甲醇溶解检测出的有效成分含量最高,药材中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、葛根素、阿魏酸、丹参酮ⅡA和黄芪甲苷的含量(平均值)分别为1.15、0.13、4.48、0.80、0.72、0.31、3.12 mg/g。

3.2 流动相选择 采用甲醇-0.5%(体积比)冰醋酸溶液<sup>[7]</sup>为流动相测定BSP中有效成分的含量,结果芍药苷和葛根素分离度不理想。实验又考察了甲醇-0.75%(体积比)冰醋酸溶液、甲醇-0.25%(体积比)冰醋酸溶液、甲醇-水为流动相以及流速和柱温(20℃、25℃、30℃)等条件对分离效果的影响,结果只有甲醇-0.25%(体积比)冰醋酸溶液为流动相能使有效成分达到基线分离,且在流速0.8 mL/min和柱温30℃的条件下峰形最好。得到的最佳色谱条件为:甲醇-0.25%(体积比)冰醋酸溶液,流速0.8 mL/min,柱温30℃。

3.3 检测波长选择 丹参素、原儿茶醛、葛根素、阿魏酸和丹参酮ⅡA的最大吸收波长分别为280、280、254、320、270 nm,实验证明这些成分在280 nm处均有较大吸收值。芍药苷的最大吸收波长为230 nm,在280 nm波长检测所得的最低检测限较高<sup>[8]</sup>,但由于BSP中芍药苷的含量较高,不影响最终的测定结果,因此,最终选择280 nm单波长检测,便于方法的推广。

3.4 黄芪甲苷检测条件选择 黄芪甲苷仅在200 nm左右有弱的末端吸收,因而操作条件须十分严格,噪音对结果影响较大,灵敏度也较低,目前多采用HPLC-ELSD和HPLC-UV两种方法检测黄芪甲苷<sup>[9-10]</sup>,采用HPLC-ELSD法更能准确、灵敏地测定黄芪甲苷的含量。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Uzar E, Acar A, Evliyaoluğ O, Frat U, Kamasak K, Göçmez C, et al. The anti-oxidant and anti-apoptotic effects of nebivolol and zofenopril in a model of cerebral ischemia/reperfusion in rats[J]. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012, 36: 22-28.
- [2] Cai M, Shin B Y, Kim D H, Kim J M, Park S J, Park C S, et al. Neuroprotective effects of a traditional herbal prescription on transient cerebral global ischemia in gerbils[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138: 723-730.
- [3] 宋红儒, 汤迎爽, 杨丽甲. HPLC法测定圣脑康丸中阿魏酸的含量[J]. *解放军药理学学报*, 2004, 20: 375-376.
- [4] Sun K, Hu Q, Zhou C M, Xu X S, Wang F, Hu B H, et al. Cerebralcare Granule<sup>®</sup>, a Chinese herb compound preparation, improves cerebral microcirculatory disorder and hippocampal CA1 neuron injury in gerbils after ischemia-reperfusion[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130: 398-406.
- [5] Zeng M F, Pan L M, Qi S M, Cao Y T, Zhu H X, Guo L W, et al. Systematic review of recent advances in pharmacokinetics of four classical Chinese medicines used for the treatment of cerebrovascular disease[J]. *Fitoterapia*, 2013, 88: 50-75.
- [6] Wu L, Qiao H, Li Y, Li L. Protective roles of puerarin and danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14: 652-658.
- [7] 李晓莉, 李晓蓉, 王丽娟, 李宇航, 薛明. RP-HPLC测定丹芎方中丹参素、阿魏酸、隐丹参酮和丹参酮ⅡA的含量[J]. *中成药*, 2008, 30: 77-80.
- [8] 陈斌, 叶隽, 纪峰, 肖农. 高效液相色谱法同时测定脑血栓片中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸和丹酚酸B的含量[J]. *药物分析杂志*, 2007, 27: 1891-1894.
- [9] 田丰, 邓英杰. HPLC法测定黄芪中的黄芪甲苷含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2000, 17: 43-45.
- [10] 赵灵芝, 朱丹妮, 严永清. HPLC-ELSD法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 1999, 19: 403-405.

[本文编辑] 尹茶