

# HPLC法同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量<sup>Δ</sup>

姜 晖\*,王绍志,张熙洁,刘晓红<sup>#</sup>(唐山市工人医院,河北唐山 063000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0374-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.27

**摘要** 目的:建立同时测定利脑心胶囊中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸和葛根素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-甲醇-0.5%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm、230 nm、250 nm、320 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素的质量浓度分别在16.54~264.58、1.44~22.46、187.20~1 497.60、23.71~379.39、0.20~1.56、2.72~42.43 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 7$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 5$ 、 $0.999\ 9$ );精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.99%;平均回收率分别为98.37%、98.28%、98.74%、98.15%、98.38%、98.29%,RSD分别为0.63%、0.88%、0.40%、1.31%、2.55%、0.94%( $n=6$ )。结论:该方法操作简单、准确、重复性好、灵敏度高,可用于同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量。  
**关键词** 高效液相色谱法;丹参素;原儿茶醛;丹酚酸B;芍药苷;阿魏酸;葛根素

## Simultaneous Determination of the Six Components in Linaoxin Capsules by HPLC

JIANG Hui, WANG Shao-zhi, ZHANG Xi-jie, LIU Xiao-hong (Tangshan Worker's Hospital, Hebei Tangshan 063000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B, paeoniflorin, ferulic acid and puerarin in Linaoxin capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column with mobile phase composed of acetonitrile-methanol and 0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm, 230 nm, 250 nm and 320 nm. The column temperature was set at 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range were 16.54-264.58 μg/ml for danshensu( $r=0.999\ 9$ ), 1.44-22.46 μg/ml for protocatechuic aldehyde( $r=0.999\ 9$ ), 187.20-1 497.60 μg/ml for salvianolic acid B( $r=0.999\ 7$ ), 23.71-379.39 μg/ml for paeoniflorin( $r=0.999\ 9$ ), 0.20-1.56 μg/ml for ferulic acid ( $r=0.999\ 5$ ), 2.72-42.43 μg/ml for puerarin ( $r=0.999\ 9$ ), respectively. RSDs of precision, stability and repetition tests were ≤1.99%. The average recoveries were 98.37% (RSD=0.63%,  $n=6$ ), 98.28% (RSD=0.88%,  $n=6$ ), 98.74% (RSD=0.40%,  $n=6$ ), 98.15% (RSD=1.31%,  $n=6$ ), 98.38% (RSD=2.55%,  $n=6$ ) and 98.29% (RSD=0.94%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and sensitive, and can be used for simultaneous determination of 6 components in Linaoxin capsules.

**KEYWORDS** HPLC; Danshensu; Protocatechuic aldehyde; Salvianolic acid B; Paeoniflorin; Ferulic acid; Puerarin

利脑心胶囊收载于2010版《中国药典》(一部)<sup>[1]</sup>,由丹参、川芎、葛根、地龙、赤芍、红花、郁金、制何首乌、泽泻、枸杞、酸枣仁(炒)、远志、九节菖蒲、牛膝、甘草15味中药组成,该药具有活血祛瘀、行气化痰、通络止痛等作用。其中,丹参具有治疗胸肋刺痛、风湿痹痛、疝瘕结块、疮疡肿痛、跌仆伤痛、月经不调、经闭痛经、产后瘀痛等作用;赤芍中含的芍药苷可用于治疗冠心病、增强体质与免疫功能、抗炎止咳、祛痰平喘等,尤其是在老年慢性呼吸道疾病的治疗中可作为辅助药物<sup>[2]</sup>;川芎中含有的阿魏酸(阿魏酸钠)具有抗血小板聚集、增强前列腺素活性、镇痛、缓解血管痉挛等作用;葛根中的葛根素具有提高免疫、增强心肌收缩力、保护心肌细胞、降低血压、抗血小板聚集等作用。为有效控制利脑心胶囊的质量,笔者参考相关文献<sup>[3]</sup>,采用了高效液相色谱(HPLC)法同时测定利脑心胶囊

中6种成分的含量<sup>[4]</sup>,以为更好地控制产品质量提供科学依据。

### 1 材料

1200型HPLC仪,包括G1311A-四元泵、G1322A-脱气机、G1316A-柱温箱、G1329A-自动进样器、G1315D-DAD检测器、HPLC Rev.B.0302化学工作站(美国安捷伦公司);摩尔纯水机细胞型1810D(上海摩勒科学仪器有限公司);真空抽滤泵(大连依利特分析仪器有限公司);Sartorius CP225D分析天平(德国Sartorius公司);80-2离心沉淀机[上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂];数控系列超声处理器FS-150N(上海生析超声仪器有限公司);索氏提取装置YMST-250Q(上海豫明仪器有限公司)。

丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110855-200507、110810-200205、111562-201212、110736-200423、0773-9910、110752-200511);利脑心胶囊(吉林敖东延边药业股份有限公司,批号:1306005、1308003、1310001);乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸、冰乙酸、甲酸、无水乙醇均为分析纯,水为超纯水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

Δ 基金项目:河北省自然科学基金资助项目(No.C2011105042)  
\* 主管药师,硕士研究生。研究方向:药理学、药物分析学。电话:0315-3722840。E-mail:jianghui910@163.com  
# 通信作者:主任药师,教授,硕士生导师,博士。研究方向:药理学、临床药学、药物分析学。电话:0315-3722435。E-mail:13930520000@163.com

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(流动相A)-甲醇(流动相B)-0.5% 磷酸水溶液(流动相C)<sup>[6]</sup>, 梯度洗脱程序见表1; 洗脱时间: 47 min; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 280 nm、230 nm、250 nm、320 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %	流动相C, %
0	4	1	95
7	4	2	94
10	10	5	85
35	20	10	70
45	35	10	55

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称定丹参素<sup>[6]</sup>、原儿茶醛、丹酚酸B<sup>[7]</sup>、芍药苷<sup>[8]</sup>、阿魏酸<sup>[9]</sup>和葛根素<sup>[10]</sup>对照品适量, 加入甲醇溶解并稀释, 制成1 587.48、134.76、17 971.20、2 276.34、18.72、254.58 μg/ml的对照品贮备液。分别精密量取上述对照品贮备液1 ml, 置于同一5 ml量瓶中, 制得丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素质量浓度分别为264.58、22.46、2 995.20、379.39、3.12、42.43 μg/ml的混合对照品贮备液I。精密量取上述混合对照品贮备液I 1 ml, 置于5 ml量瓶中, 加入甲醇3 ml, 即得含丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素分别为66.14、5.62、748.80、94.85、0.80、10.88 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品约0.5 g, 精密称定, 置于10 ml量瓶中, 加超纯水溶解, 超声处理(功率: 80 W, 频率: 20 kHz) 30 min, 冷却至室温, 加入超纯水补足容量, 以离心半径5 cm、1 500 r/min离心30 min, 用0.45 μm微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 用免煎颗粒按处方工艺制备不含丹参、赤芍、川芎及葛根药材的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得阴性对照溶液。

## 2.3 系统适用性试验

分别精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 详见图1。由图1可见, 丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素均可达到基线分离, 分离度均大于1.5, 理论板数以丹参素峰计算均大于5 000。

## 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液I 适量, 采用倍比稀释法, 加入甲醇溶液, 置于5 ml量瓶中, 摇匀。分别精密量取上述溶液10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程及线性范围见表2。

## 2.5 检测限和定量限

采用倍比稀释法, 以信噪比>3测得丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素检测限分别为1.06、0.10、45.00、1.52、0.03、0.08 ng; 以信噪比>10测得丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸、葛根素定量限分别为2.12、0.36、150.00、2.74、0.10、0.27 ng。

## 2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液I 10 μl, 按“2.1”项下

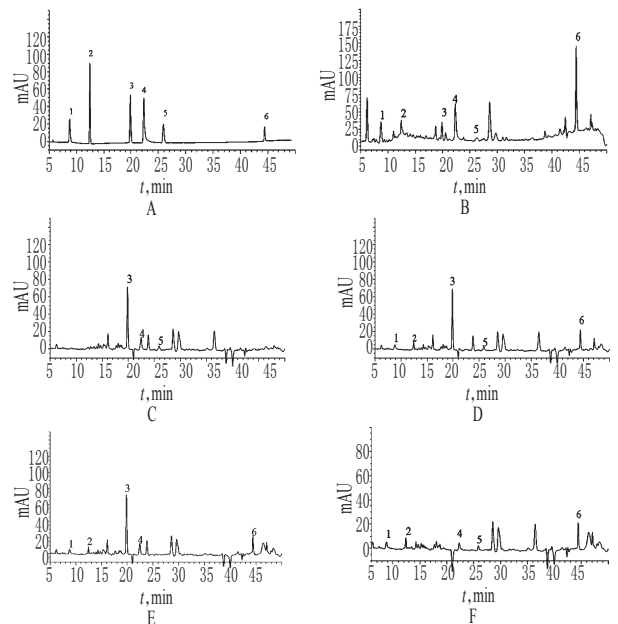


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺丹参阴性对照品(280 nm); D. 缺赤芍阴性对照品(230 nm); E. 缺川芎阴性对照品(320 nm); F. 缺葛根阴性对照品(250 nm); 1. 丹参素; 2. 原儿茶醛; 3. 葛根素; 4. 芍药苷; 5. 阿魏酸; 6. 丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; C. negative control without *Salvia miltiorrhiza* (280 nm); D. negative control without *Cynanchum officinale* (230 nm); E. negative control without *Ligusticum chuanxiong* (320 nm); F. negative control without *Lobed Kudzuvine* (250 nm). 1. danshensu; 2. protocatechuic aldehyde; 3. puerarin; 4. peoniflorin; 5. ferulic acid; 6. salvianolic acid B

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equations and linear range

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
丹参素	$y=5.2823x-2.2333$	16.54~264.58	0.9999
原儿茶醛	$y=31.63x+5.8806$	1.44~22.46	0.9999
丹酚酸B	$y=1.0641x+35.321$	187.20~2 995.20	0.9997
芍药苷	$y=13.168x-35.629$	23.71~379.39	0.9999
阿魏酸	$y=37.581x+6.544$	0.20~3.12	0.9995
葛根素	$y=35.866x+54.115$	2.72~42.43	0.9999

色谱条件连续进样6次。结果, 丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸和葛根素峰面积的RSD分别为1.74%、1.65%、0.78%、0.98%、1.24%、1.29%, 表明仪器精密性良好。

## 2.7 稳定性试验

取样品(批号: 1306005)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 常温下放置, 分别在0、2、4、6、8、12、24 h时进样测定。结果, 丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸和葛根素峰面积的RSD分别为1.21%、1.76%、1.28%、0.99%、1.33%、1.51%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.8 重复性试验

取样品(批号: 1306005)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液6份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸和葛根素峰面积的RSD分别为1.54%、1.74%、0.55%、0.95%、1.99%、1.59%, 表明本方法重复性良好。

## 2.9 回收率试验

取已知含量的样品(批号:1306005)共6份,每份约0.5 g,分别精密加入一定量的丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、芍药苷、阿魏酸和葛根素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率,结果见表3。

表3 回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests (n=6)

待测成分	称样量,g	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
丹参素	0.250 5	0.362 6	0.330 7	0.686 5	99.02	99.14	0.22
	0.250 4	0.362 5	0.330 7	0.686 1	98.83		
	0.250 7	0.362 9	0.330 7	0.688 2	99.22		
	0.250 6	0.362 7	0.330 7	0.686 8	99.05		
	0.250 8	0.363 0	0.330 7	0.688 9	99.45		
	0.250 7	0.362 6	0.330 7	0.688 4	99.29		
原儿茶醛	0.250 5	0.027 4	0.028 1	0.054 1	97.48	98.98	1.61
	0.250 4	0.027 3	0.028 1	0.053 8	97.11		
	0.250 7	0.027 4	0.028 1	0.055 2	99.46		
	0.250 6	0.027 4	0.028 1	0.054 6	98.38		
	0.250 8	0.027 5	0.028 1	0.056 2	101.08		
	0.250 7	0.027 3	0.028 1	0.055 6	100.36		
丹酚酸B	0.250 5	9.771 5	7.488 0	17.173 6	99.57	99.48	0.13
	0.250 4	9.768 8	7.488 0	17.167 8	99.33		
	0.250 7	9.778 6	7.488 0	17.180 6	99.50		
	0.250 6	9.774 7	7.488 0	17.177 5	99.51		
	0.250 8	9.792 5	7.488 0	17.189 7	99.65		
	0.250 7	9.776 9	7.488 0	17.177 9	99.31		
芍药苷	0.250 5	0.480 7	0.474 3	0.952 1	99.70	99.47	0.36
	0.250 4	0.479 2	0.474 3	0.948 4	99.47		
	0.250 7	0.490 2	0.474 3	0.960 1	99.54		
	0.250 6	0.490 0	0.474 3	0.952 4	98.77		
	0.250 8	0.490 4	0.474 3	0.962 5	99.77		
	0.250 7	0.489 1	0.474 3	0.959 4	99.58		
阿魏酸	0.250 5	3.852 4×10 <sup>-3</sup>	0.003 9	0.007 5	98.03	98.66	2.42
	0.250 4	3.851 3×10 <sup>-3</sup>	0.003 9	0.007 1	94.18		
	0.250 7	3.855 4×10 <sup>-3</sup>	0.003 9	0.007 8	100.58		
	0.250 6	3.853 8×10 <sup>-3</sup>	0.003 9	0.007 7	99.31		
	0.250 8	3.856 9×10 <sup>-3</sup>	0.003 9	0.007 9	100.56		
	0.250 7	3.854 8×10 <sup>-3</sup>	0.003 9	0.007 7	99.29		
葛根素	0.250 5	0.067 6	0.053 1	0.118 8	98.43	99.24	1.45
	0.250 4	0.067 5	0.053 1	0.116 9	96.93		
	0.250 7	0.067 8	0.053 1	0.120 5	99.67		
	0.250 6	0.067 8	0.053 1	0.119 9	99.17		
	0.250 8	0.067 9	0.053 1	0.122 3	101.07		
	0.250 7	0.067 8	0.053 1	0.121 1	100.17		

## 2.10 样品含量测定

取3批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法计算6种成分的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=3,mg/粒)

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

批号	丹参素	原儿茶醛	丹酚酸B	芍药苷	阿魏酸	葛根素
1306005	0.371 5	0.027 6	10.016 0	0.499 2	0.003 9	0.069 3
1308003	0.372 1	0.027 9	10.032 3	0.501 7	0.003 9	0.069 7
1310001	0.372 2	0.027 8	10.008 1	0.499 6	0.003 8	0.069 3

## 3 讨论

### 3.1 提取方式与溶剂的选择

笔者比较了索氏提取和超声提取方法在相同提取时间下的提取率,发现索氏提取与超声提取无明显区别,但索氏提取不如超声提取简单、方便,安全性也不如超声提取好,故在本研究中选择超声提取。笔者将超声提取时间分别设置为10、20、30、40、50、60 min,结果丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、葛根素在30 min提取含量均相对较大,丹酚酸B在40 min提取含量相对较大,故选择超声提取30 min。笔者又分别考察了50%甲醇、75%甲醇、甲醇、50%甲醇加0.5%冰乙酸、75%甲醇加0.5%冰乙酸、50%甲醇加0.5%的甲酸、75%甲醇加0.5%甲酸、甲醇加0.5%磷酸为提取溶剂时的色谱图。结果75%甲醇提取的干扰较小,峰形较好,冰乙酸、甲酸及磷酸的加入对色谱图没有明显的影响,故选择75%甲醇为本研究的提取溶剂。

### 3.2 流动相的选择

在本研究中笔者考察了不同体积比的甲醇-水、甲醇-醋酸溶液、甲醇-甲酸溶液、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液及甲醇-乙腈-磷酸溶液,采用梯度洗脱和等度洗脱的分离度。结果发现,乙腈-磷酸溶液和甲醇-乙腈-磷酸溶液为流动相对6种成分均有较好的分离。但考虑到乙腈毒性和成本较高,选择故甲醇-乙腈-磷酸溶液为本研究的流动相。

### 3.3 检测波长的选择

由色谱图可见,丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B在280 nm波长处有最大吸收;阿魏酸在320 nm波长处有最大吸收;芍药苷在230 nm波长处有最大吸收;葛根素在250 nm波长处有最大吸收。而DAD检测器可以同时不同波长下检测多组分的含量,比单一成分更能客观地反映中药的内在质量。

综上所述,该方法操作简单、准确、重复性好、灵敏度高,可用于同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 766.
- [2] 郭淑芹. 利脑心胶囊临床应用与药理研究[J]. 吉林中医药, 2005, 25(1): 62.
- [3] 胡辉, 彭燕, 张倩. HPLC法同时测定利脑心胶囊中丹参素和原儿茶醛的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1 841.
- [4] 袁红英, 杨雪萍, 张志国, 等. 利脑心胶囊质量标准的方法学研究[J]. 实用医药杂志, 2010, 27(6): 519.
- [5] 王玉, 侯林中, 张熙洁, 等. HPLC测定参芍口服液阿魏酸含量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(21): 1 674.
- [6] Liu JH, Wang SF. Determination of paeoniflorin content in Wujibaifeng tables by HPLC EJ3[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2002, 33(4): 325.
- [7] 王娟, 沈孝丽, 陈同强, 等. HPLC同时测定扶正解毒颗粒中5种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 74.
- [8] 康珊芬. 高效液相色谱法测定利脑心胶囊中芍药苷含量[J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15(8): 522.
- [9] 黄文君, 龙凤荣, 伍庆, 等. RP-HPLC法同时测定痛经宁胶囊中4种有效成分[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2 133.
- [10] 吴峰, 鲁建丽, 豆久锋, 等. HPLC法同时测定心可舒丸中丹参素、原儿茶醛及葛根素[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1 770.

(收稿日期:2014-09-01 修回日期:2014-11-28)

(编辑:陈 宏)