

丹葛酚酮胶囊 HPLC 指纹图谱及 9 种有效成分的含量测定

刘小艳^{1,2}, 黄志芳², 罗春梅², 刘玉红², 刘云华², 陈 燕², 汤依娜², 易进海^{1,2*}

¹西南医科大学药学院, 泸州 646000;

²四川省中医药科学院 中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室, 成都 610041

摘要:建立丹葛酚酮胶囊的 HPLC 指纹图谱, 并同时测定其中 9 种有效成分的含量, 为其质量评价提供依据。采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 0.05% 甲酸-乙腈为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 建立了丹葛酚酮胶囊的 HPLC 指纹图谱。10 批丹葛酚酮胶囊指纹图谱中有 28 个共有峰, 相似度均大于 0.99, 经与对照品比对确认了 16 个成分, 对葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 9 种主要成分进行了定量分析, 线性、精密度、稳定性、重复性和加样回收率均符合定量要求, 所建立的方法简便、稳定、可靠, 指纹图谱结合多指标成分的含量可有效控制产品的质量。

关键词:丹葛酚酮胶囊; 指纹图谱; 含量测定; HPLC

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)1-0087-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.1.013

Establishment of HPLC fingerprint of Dangefentong Capsule and determination of nine components

LIU Xiao-yan^{1,2}, HUANG Zhi-fang², LUO Chun-mei²,
LIU Yu-hong², LIU Yun-hua², CHEN Yan², TANG Yi-na², YI Jin-hai^{1,2*}

¹School of Pharmacy of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

²Sichuan Provincial Key Laboratory of Quality and Innovation Research of Chinese Materia Medica, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: To provide the scientific basis for the quality evaluation of Dangefentong Capsule, its HPLC fingerprints was established, and the contents of nine components were simultaneously determined. The analyses were performed on an Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and the mobile phase comprised of 0.05% formic acid (A) and acetonitrile (B) with the gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm; the column temperature was maintained at 30 °C and the injection volume was 10 μL. Twenty-eight common peaks were selected in the fingerprints of ten batches of samples, the similarities of which were more than 0.99. Sixteen components were identified by comparison with the reference substances. Nine major components, namely, 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, puerarin celery glycoside, daidzin, salvianolic acid B, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II_A were analyzed quantitatively. The linearity, precision, stability, repeatability, and recovery were all in line with quantitative requirements. The established method is simple, stable and reliable, and can be expected for the quality control of Dangefentong Capsules.

Key words: Dangefentong Capsule; fingerprints; quantitative determination; HPLC

丹葛酚酮胶囊为重大新药创制项目研制的组分中药新药, 有效组分为丹参总酚酸、总丹参酮和葛根

总黄酮, 具有和血滋阴, 通络止痛之功效, 用于糖尿病周围神经病变属阴虚血瘀证, 已获得国家药品监督管理局临床批件(2018L02595)。本品中丹参总酚酸主要成分有迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 等, 具有抑制血小板聚集、扩张冠状动脉及抗血栓形成等作用^[1-4]; 总丹参酮主要含丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐

收稿日期: 2019-09-05 接受日期: 2019-12-03

基金项目: 重大新药创制(2018ZX09731-010, 2018ZX09201018-029); 省级科研院所科技成果转化(2019JDZH0034)

* 通信作者 Tel: 86-28-85210843; E-mail: yijinhai63@163.com

丹参酮、二氢丹参酮 I 等,具有抗氧化、消炎抑菌、心脏保护、抗动脉粥样硬化等作用^[1,2,4,5];葛根总黄酮主要成分有 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷等,具有降低血管阻力,改善心脑血管血液循环、降低心机耗氧量等作用^[6-8]。

中药指纹图谱能很好地表征中药复方的整体质量概貌,且已广泛应用于各种中药复方制剂的质量控制^[9-12]。为了更全面地建立丹葛酚酮胶囊的质量控制方法,利用指纹图谱整体性和模糊性的特点,结合多指标有效成分的定量分析进行产品一致性评价,本文建立了丹葛酚酮胶囊的 HPLC 指纹图谱,并同时测定制剂中葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 9 种主要有效成分的含量,对控制产品批次间的差异,保证其质量可控、稳定、安全有效具有重要意义。本文所建立的方法操作简便,特征性强,能够较全面地表征主要活性成分的含量差异,以为该新药的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司);SECURA225D-1CN 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-300 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Integral 3 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

3'-羟基葛根素对照品(批号:DST180912-075)、葛根素-6''-O-木糖苷对照品(批号:DST190110-054)、3'-甲氧基葛根素对照品(批号:DST190115-122)、葛根素芹菜糖苷对照品(批号:DST190116-055)、刺芒柄花苷对照品(批号:DST190114-044)、隐丹参酮对照品(批号:MUST-18041115)、丹参酮 I 对照品(批号:MUST-18032207)、二氢丹参酮 I 对照品(批号:MUST-18032705)、紫草酸对照品(批号:MUST-14052702)均购自成都曼思特生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$;葛根素对照品(批号:110752-20161,纯度:95.4%)、大豆苷对照品(批号:111738-201603,纯度:93.3%)、染料木苷对照品(批号:111709-201702,纯度:99.9%)、丹参酮 II_A 对照品(批号:110766-201520,纯度:98.9%)、丹酚酸 B 对照品(批号:111562-201716,纯度:94.1%)、迷迭香酸对照品(批号:111871-201706,纯度:90.5%),均购自中国食品药品检定研究院;亚甲基丹参酮对照

品(批号:180912A,纯度:98%),购自南京道斯夫生物科技有限公司。乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲醇(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯;水(超纯水,超纯水机制得)。10 批丹葛酚酮胶囊由四川省中医药科学院制备(每粒装 0.39 g,编号 S1~S10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 0.05% 甲酸(A)-乙腈(B);梯度洗脱(0~3 min, 3% B; 3~5 min, 3% B→11% B; 5~25 min, 11% B; 25~30 min, 11% B→20% B; 30~38 min, 20% B; 38~50 min, 20% B→32% B; 50~60 min, 32% B→52% B; 60~80 min, 52% B→68% B; 80~90 min, 68% B→70% B);流速 1 mL/min;检测波长 280 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量,加入 70% 甲醇溶解并定容至刻度,制成每 1 mL 分别含 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 1.214、2.333、0.685、0.641、1.564、2.350、0.641、0.107、0.581 mg 的储备液;分别精密量取以上对照品储备液适量,置于 5 mL 量瓶中,70% 甲醇定容,制得每 1 mL 分别含 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 73.6、440.1、97.9、130.8、117.3、499.5、13.0、6.5、23.5 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取丹葛酚酮胶囊内容物约 40 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

按照丹葛酚酮胶囊处方和制法,参照“2.3”供试品溶液的制备方法,分别制备缺丹参、葛根的阴性对照溶液。

2.5 HPLC 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验

取同一供试品(S5)溶液,依照“2.1”项下的色

谱条件,连续进样 6 次,以丹酚酸 B 为参照峰,测得各共有峰相对保留时间 $RSD < 0.5\%$,相对峰面积 $RSD < 2\%$ ($n = 6$),表明仪器精密度好。

2.5.2 稳定性试验

取同一供试品(S5)溶液,依照“2.1”项下的色谱条件,分别于制备后的 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,以丹酚酸 B 为参照峰,测得各共有峰相对保留时间 $RSD < 0.5\%$,相对峰面积 $RSD < 2\%$ ($n = 6$),表明供试品溶液于 24 h 内测定结果稳定。

2.5.3 重复性试验

取同一丹葛酚酮胶囊(S5)内容物约 40 mg,精密称定,按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,依照“2.1”项下的色谱条件依次测定,丹酚酸 B 为参照峰,测得各共有峰相对保留时间 $RSD <$

0.5% ,相对峰面积 $RSD < 2\%$ ($n = 6$),表明该方法重复性好。

2.6 指纹图谱建立、相似度分析及共有峰确认

2.6.1 相似度评价

依照“2.3”项下方法分别制备 10 批丹葛酚酮胶囊供试品溶液(编号 S1 ~ S10),按照“2.1”项下的色谱条件依次测定,记录 100 分钟的 HPLC 图。将得到的 10 批色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件,设定 S1 为参照图谱,采用平均数法生成对照指纹图谱,见图 1 和图 2。计算 S1 ~ S10 批样品与对照图谱的相似度(见表 1)。10 批丹葛酚酮胶囊指纹图谱与对照图谱之间相似度均大于 0.99,表明各批次丹葛酚酮胶囊样品之间的质量相对稳定。

表 1 10 批样品相似度评价结果
Table 1 Similarity evaluation of 10 samples

样品 Sample	相似度 Similarity										R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
S1	1.000	0.994	0.985	0.993	0.999	0.989	0.997	0.988	0.994	0.996	0.996
S2	0.994	1.000	0.994	0.992	0.998	0.999	1.000	0.995	1.000	0.998	0.999
S3	0.985	0.994	1.000	0.995	0.990	0.995	0.993	1.000	0.995	0.996	0.996
S4	0.993	0.992	0.995	1.000	0.994	0.988	0.993	0.997	0.992	0.998	0.996
S5	0.999	0.998	0.990	0.994	1.000	0.994	0.999	0.992	0.998	0.998	0.998
S6	0.989	0.999	0.995	0.988	0.994	1.000	0.997	0.994	0.999	0.996	0.997
S7	0.997	1.000	0.993	0.993	0.999	0.997	1.000	0.994	0.999	0.999	0.999
S8	0.988	0.995	1.000	0.997	0.992	0.994	0.994	1.000	0.995	0.998	0.997
S9	0.994	1.000	0.995	0.992	0.998	0.999	0.999	0.995	1.000	0.998	0.999
S10	0.996	0.998	0.996	0.998	0.998	0.996	0.999	0.998	0.998	1.000	1.000

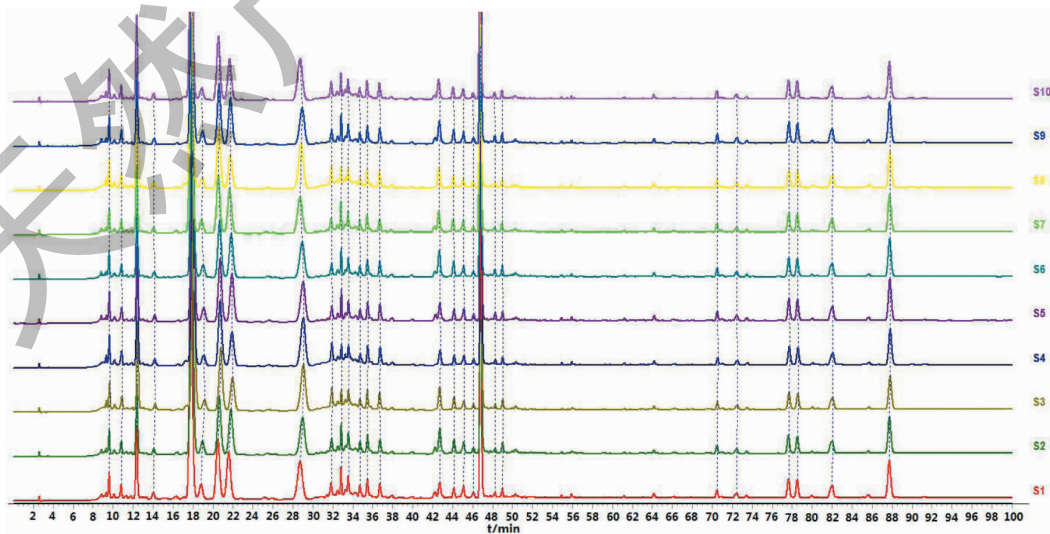


图 1 10 批丹葛酚酮胶囊 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of Dangefentong Capsules

2.6.2 共有峰指认与归属

通过建立丹葛酚酮胶囊指纹图谱的共有模式,从10批样品图谱的共有指纹区标定了28个共有峰,经过与对照品比对并结合DAD光谱,确认出其中16个色谱峰,分别为3号峰3'-羟基葛根素、5号峰葛根素、6号峰葛根素-6''-O-木糖苷、7号峰3'-甲氧基葛根素、8号峰葛根素芹菜糖苷、9号峰大豆苷、13号峰染料木苷、16号峰迷迭香酸、17号峰紫草

酸、19号峰刺芒柄花苷、20号峰丹酚酸B、23号峰二氢丹参酮I、25号峰隐丹参酮、26号峰丹参酮I、27号峰亚甲基丹参酮、28号峰丹参酮II_A。再结合阴性对照图谱、丹葛酚酮胶囊指纹图谱,28个共有峰都可以找到明确归属,其中1~15、18、19、21号峰为葛根黄酮成分,16、17、20、22号峰为丹参酚酸成分,23~28号峰为丹参酮成分(见图3)。

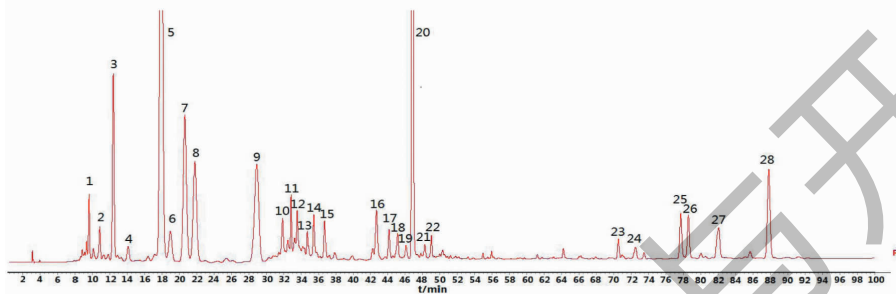


图2 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint

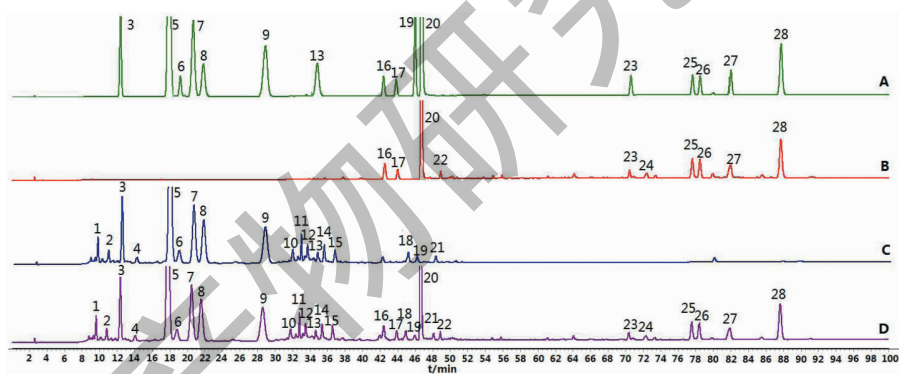


图3 对照品、阴性对照及供试品指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprints of reference substance, negative controls and test sample

注:3. 3'-羟基葛根素;5. 葛根素;6. 葛根素-6''-O-木糖苷;7. 3'-甲氧基葛根素;8. 葛根素芹菜糖苷;9. 大豆苷;13. 染料木苷;16. 迷迭香酸;17. 紫草酸;19. 刺芒柄花苷;20. 丹酚酸B;23. 二氢丹参酮I;25. 隐丹参酮;26. 丹参酮I;27. 亚甲基丹参酮;28. 丹参酮II_A;A. 对照品;B. 缺葛根阴性对照;C. 缺丹参阴性对照;D. 供试品。Note: 3. 3'-hydroxy puerarin;5. Puerarin;6. Puerarin-6''-O-xyloside;7. 3'-methoxy puerarin;8. Puerarin celery glycoside;9. Daidzin;13. Dye Lignin;16. Rosmarinic acid;17. Lithosperic acid;19. Thorn stalk;20. Salvianolic acid B;23. dihydrotanshinone I;25. Cryptotanshinone;26. Tanshinone I;27. Kedan Ginseng;28. Tanshinone IIA;A. reference substance;B. lack of Radix Puerariae Lobatae negative control;C. lack of Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae negative control;D. test sample

2.7 含量测定

2.7.1 阴性干扰试验

精密吸取丹葛酚酮胶囊(S5)供试品溶液、缺葛根阴性对照溶液、缺丹参阴性对照溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行测定。结果显示,缺丹参和缺葛根阴性样品在对照品相应保留时间处无明显色谱峰,表明阴性样品对测定无干扰,该方法专属性良好,如图3所示。

2.7.2 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液适量,以70%甲醇逐级稀释成6个系列浓度的混合对照品溶液。按照“2.1”项下色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐标(Y),进样浓度(mg/mL)为横坐标(X),进行线性回归,结果表明各化合物在相应范围内线性关系良好(见表2)。

表 2 各成分线性关系

Table 2 Linear relationships of various constituents

对照品 CRS	线性方程 Linear equation	线性范围 Linear range(mg/mL)	R
3'-羟基葛根素 3'-Hydroxy puerarin	$Y = 1\ 5284X + 4.061\ 0$	0.011 8 ~ 0.073 6	0.999 9
葛根素 Puerarin	$Y = 1\ 5142X + 31.957$	0.070 4 ~ 0.440 1	0.999 9
3'-甲氧基葛根素 3'-Methoxy puerarin	$Y = 1\ 6672X + 18.671$	0.015 7 ~ 0.097 9	0.999 9
葛根素芹菜糖苷 Puerarin celery glycoside	$Y = 1\ 0647X + 21.935$	0.020 9 ~ 0.130 8	0.999 8
大豆苷 Daidzin	$Y = 1\ 4553X + 2.646\ 4$	0.018 8 ~ 0.117 3	0.999 9
丹酚酸 B Salvianolic acid B	$Y = 1\ 0190X + 33.612$	0.079 9 ~ 0.499 5	0.999 9
隐丹参酮 Cryptotanshinone	$Y = 2\ 1560X + 1.319\ 9$	0.002 1 ~ 0.013 0	0.999 9
丹参酮 I Tanshinone I	$Y = 3\ 6577X + 3.332\ 2$	0.001 0 ~ 0.006 5	0.999 9
丹参酮 II _A Tanshinone II _A	$Y = 3\ 8595X + 9.720\ 1$	0.003 8 ~ 0.023 5	0.999 9

2.7.3 精密度试验

取同一丹葛酚酮胶囊(S5)供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A的RSD分别为0.53%、0.27%、0.82%、0.62%、0.45%、0.21%、0.20%、0.56%、0.16%(n=6)。表明仪器精密度好。

2.7.4 稳定性试验

取同一丹葛酚酮胶囊(S5)供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h进行分析测定。结果显示,3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A的RSD分别为0.64%、0.49%、0.97%、0.71%、0.89%、0.32%、0.44%、0.75%、1.11%(n=6)。表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7.5 重复性试验

取同一丹葛酚酮胶囊(S5)样品,按照“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,照“2.1”项下色

谱条件分析测定。结果显示,3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A的平均含量分别为25.65、167.78、38.20、49.48、39.04、170.93、6.68、3.68、9.69 mg/g, RSD分别为0.50%、0.56%、0.55%、0.84%、0.88%、0.53%、0.44%、0.63%、0.57%(n=6)。表明重复性良好。

2.7.6 加样回收率试验

取已知含量的丹葛酚酮胶囊(S5)样品,每份约20 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,共6份,分别精密加入对照品适量,按“2.3”项下方法制备成供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件分析测定,计算各成分的回收率及RSD值。3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A的平均加样回收率分别为97.28%、102.72%、100.44%、103.75%、98.46%、99.07%、101.60%、101.14%、101.00%,其RSD值分别为1.54%、1.22%、0.57%、1.40%、1.26%、1.43%、2.38%、1.30%、1.33%(n=6),表明样品的回收率良好(见表3)。

表 3 加样回收率试验结果(n=6)

Table 3 Results of recovery test(n=6)

成分 Component	样品量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
3'-羟基葛根素 3'-Hydroxy puerarin	19.71	0.505 5	0.607 0	1.088 5	96.03	97.28	1.54
	19.41	0.497 8	0.607 0	1.089 6	97.49		
	19.35	0.496 3	0.607 0	1.089 6	97.74		
	20.78	0.533 0	0.607 0	1.136 2	99.38		

续表 3 (Continued Tab. 3)

成分 Component	样品量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
葛根素 Puerarin	20.28	0.520 1	0.607 0	1.114 3	97.88	102.72	1.22
	19.79	0.507 6	0.607 0	1.085 0	95.13		
	19.71	3.306 9	3.732 5	7.189 2	104.01		
	19.41	3.256 5	3.732 5	7.099 9	102.97		
	19.35	3.246 5	3.732 5	7.022 8	101.17		
	20.78	3.486 4	3.732 5	7.272 7	101.44		
3'-甲氧基葛根素 3'-Methoxy puerarin	20.28	3.402 5	3.732 5	7.230 8	102.57	100.44	0.57
	19.79	3.320 3	3.732 5	7.207 3	104.14		
	19.71	0.752 9	0.822 0	1.583 4	101.03		
	19.41	0.741 5	0.822 0	1.563 7	100.03		
	19.35	0.739 2	0.822 0	1.560 6	99.93		
	20.78	0.793 8	0.822 0	1.624 3	101.04		
葛根素芹菜糖苷 Puerarin celery glycoside	20.28	0.774 7	0.822 0	1.595 1	99.80	103.75	1.40
	19.79	0.756 0	0.822 0	1.584 4	100.78		
	19.71	0.975 2	1.076 5	2.105 7	105.01		
	19.41	0.960 4	1.076 5	2.050 7	101.28		
	19.35	0.957 4	1.076 5	2.063 6	102.76		
	20.78	1.028 2	1.076 5	2.150 5	104.26		
大豆苷 Daidzin	20.28	1.003 4	1.076 5	2.125 4	104.22	98.46	1.26
	19.79	0.979 2	1.076 5	2.109 0	104.95		
	19.71	0.769 5	0.938 4	1.711 3	100.35		
	19.41	0.757 8	0.938 4	1.672 6	97.48		
	19.35	0.755 5	0.938 4	1.669 9	97.44		
	20.78	0.811 3	0.938 4	1.724 7	97.33		
丹酚酸 B Salvianolic acid B	20.28	0.791 8	0.938 4	1.720 5	98.97	99.07	1.43
	19.79	0.772 6	0.938 4	1.703 5	99.20		
	19.71	3.369 1	3.525 6	6.893 0	99.95		
	19.41	3.317 8	3.525 6	6.867 7	100.69		
	19.35	3.307 6	3.525 6	6.738 9	97.33		
	20.78	3.552 0	3.525 6	6.994 6	97.65		
隐丹参酮 Cryptotanshinone	20.28	3.466 5	3.525 6	6.943 1	98.61	101.60	2.38
	19.79	3.382 8	3.525 6	6.916 3	100.23		
	19.71	0.131 7	0.141 0	0.277 7	103.55		
	19.41	0.129 7	0.141 0	0.276 4	104.07		
	19.35	0.129 3	0.141 0	0.266 6	97.36		
	20.78	0.138 9	0.141 0	0.282 4	101.85		
丹参酮 I Tanshinone I	20.28	0.135 5	0.141 0	0.277 3	100.60	101.14	1.30
	19.79	0.132 2	0.141 0	0.276 3	102.18		
	19.71	0.072 5	0.074 9	0.148 2	101.07		
	19.41	0.072 5	0.074 9	0.148 2	101.07		

续表 3 (Continued Tab. 3)

成分 Component	样品量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
丹参酮 II _A Tanshinone II _A	19.41	0.071 4	0.074 9	0.148 1	102.45	101.00	1.33
	19.35	0.071 1	0.074 9	0.146 0	99.91		
	20.78	0.076 4	0.074 9	0.151 1	99.74		
	20.28	0.074 6	0.074 9	0.150 0	100.73		
	19.79	0.072 8	0.074 9	0.149 9	102.95		
	19.71	0.190 9	0.203 4	0.396 2	100.93		
	19.41	0.188 0	0.203 4	0.396 9	102.71		
	19.35	0.187 4	0.203 4	0.390 2	99.68		
	20.78	0.201 3	0.203 4	0.404 6	99.98		
	20.28	0.196 4	0.203 4	0.400 1	100.13		
	19.79	0.191 7	0.203 4	0.400 4	102.59		

2.8 样品含量测定

取 10 批丹葛酚酮胶囊样品 (S1 ~ S10), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件分析测定, 计算样品中 3'-羟基葛根素、葛根素、

3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的含量。结果见表 4。

表 4 各成分含量测定结果 (mg/粒, n=3)

Table 4 Results of content determination of various constituents (mg/capsule, n=3)

成分 Component	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
3'-羟基葛根素 3'-Hydroxy puerarin	9.57	9.01	12.44	12.80	9.96	9.36	9.26	12.43	9.75	11.39
葛根素 Puerarin	64.89	61.29	54.11	55.75	65.39	61.46	63.30	53.98	64.01	61.21
3'-甲氧基葛根素 3'-Methoxy puerarin	14.38	13.89	15.51	15.93	14.98	13.96	14.35	15.38	14.51	15.51
葛根素芹菜糖苷 Puerarin celery glycoside	18.75	17.82	13.24	13.48	19.43	17.96	18.46	13.01	18.60	16.61
大豆苷 Daidzin	14.91	14.15	17.84	18.44	15.08	14.16	14.70	17.88	14.75	16.91
丹酚酸 B Salvianolic acid B	59.66	72.27	67.20	58.24	66.54	75.68	64.79	63.52	70.60	65.18
隐丹参酮 Cryptotanshinone	2.34	2.21	2.03	2.27	2.63	2.31	2.24	2.17	2.43	2.26
丹参酮 I Tanshinone I	1.29	1.19	1.09	1.26	1.45	1.25	1.21	1.18	1.32	1.24
丹参酮 II _A Tanshinone II _A	3.30	3.16	2.93	3.21	3.72	3.36	3.21	3.11	3.49	3.23

3 讨论

3.1 流动相选择

本实验比较了甲醇-0.4% 乙酸、乙腈-0.4% 乙酸、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.05% 甲酸等流动相系统, 结果显示, 乙腈-0.05% 甲酸系统的分离效果最

好, 各色谱峰峰形较好, 基本达到基线分离。

3.2 检测波长选择

为了使各特征峰均具有较好的响应, 比较了不同检测波长 (250、270、275、280 nm) 下各色谱峰的峰形和分离度, 结果显示, 280 nm 处各指标性成分

峰形较好,响应值较高,分离度理想。

3.3 提取条件选择

比较了不同提取溶剂(80% 甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、甲醇、30% 乙醇)对提取效果的影响,结果表明,70% 甲醇的提取效果优于其他提取溶剂,此时丹葛酚酮胶囊中各待测成分含量最高。

3.4 丹葛酚酮胶囊的质量评价

指纹图谱能够全面地反映丹葛酚酮胶囊中多种成分的有无及成分间比例的相似程度^[13],相对于指纹图谱反映的“宏观”特征,对有效成分的含量控制即属于“细化”指标,反映了发挥药效作用的化学成分的直观含量^[14]。10 批样品的指纹图谱相似度均大于 0.99,表明本品固定了药材基源和产地,原料质量和成品生产工艺稳定,因此,样品间质量有较好的一致性;含量测定结果显示,成品中有效成分的种类相对稳定,但其含量受不同批次间药材及成品收率差异的影响,从而存在一定的差异,这也提示了“指纹图谱联合多成分含量测定”对其质量控制的必要性和全面性^[14]。本实验建立的指纹图谱标定了 28 个共有峰,可对样品中的丹参和葛根进行整体特征识别,定量方法可对 9 种主要有效成分含量进行分析,能分别从定性与定量两个方面对丹葛酚酮胶囊的质量进行控制。

参考文献

- 1 Li X, Wu LH, Fan XH, et al. Network pharmacology study on major active compounds of Fufang Danshen formula[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36: 2911-2915.
- 2 Zeng HT, Xu SL, Zhu Y, et al. Research process in biosynthesis pathway and regulation mechanism of phenolic acids in roots and rhizomes of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47: 3324-3331.
- 3 Yang XJ, Wang DG, Liu M, et al. Analysis on geographical distribution of hydrophilic components in Radix *Salviae miltiorrhizae* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23: 684-688.

- 4 Jiang X, Shi L. Research progress on active constituents and pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Pharm Res(药学研究), 2017, 36: 166-169.
- 5 Gao B. Analysis of pharmacological effects and clinical application of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin J Mod Drug Appl(中国现代药物应用), 2018, 12: 196-197.
- 6 Li X, Pan JX, Chen SG, et al. Research progress of chemical components and pharmacological action of *Pueraria lobata* [J]. J Chin Inst Food Sci Tech(中国食品学报), 2017, 17: 189-195.
- 7 Huang XW, Zhang DD, Wang JJ, et al. Chemical composition and pharmacological action of *Pueraria lobata* [J]. Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药), 2018, 38: 87-89.
- 8 Zhong QQ, Cao GQ, Lu BL, et al. Inhibitory effect of active constituents from Radix *Puerariae* on tyrosinase [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2008, 20: 681-684.
- 9 Liu W, Jiang SY. Progress in research and application of fingerprints of traditional Chinese medicine [J]. Chin Pharm(中国药房), 2011, 22: 1819-1822.
- 10 Shao JQ. Advances in studies on fingerprints of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40: 994-998.
- 11 Li Q, Du SM, Zhang ZL, et al. Progress in fingerprint technology on Chinese materia medica and prospect of its future development [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44: 3095-3104.
- 12 Liu DF, Zhao LN, Li YF, et al. Research progress and application in fingerprint technology on Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47: 4085-4094.
- 13 You LH, Yang BH, Ye M, et al. Fingerprint chromatograms of Qingre Jiedu Koufuye by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(14): 84-87.
- 14 Gong XB, Zeng QH, Zhang F, et al. Fingerprint analysis of Xiaoaiping Injection and simultaneous determination of its seven active steroidal components in Xiaoaiping Injection by HPLC-ELSD [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(15): 68-72.