

HPLC 法测定祛瘀活络搽剂中羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 的含量

杨程宇 刘春梅 赵丽丽 刘 军

宜宾市食品药品检验检测中心 四川宜宾 644000

〔摘要〕目的 建立 HPLC 法测定祛瘀活络搽剂中羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 的含量。方法 采用 Agilent XDB-C18 柱 (5 μ m $\times$ 4.6mm $\times$ 250mm), 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.5% 甲酸溶液, 进行梯度洗脱, 流速 1.0mL $\cdot$ min⁻¹, 羟基红花黄色素 A 检测波长 403nm, 丹酚酸 B 检测波长 286nm, 丹参酮 II A 检测波长 270nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果 三组分的分离度、线性、精密度、稳定性、重复性、回收率试验均符合要求。结论 该方法可用于祛瘀活络搽剂的质量控制。

〔关键词〕高效液相色谱法; 祛瘀活络搽剂; 羟基红花黄色素 A; 丹酚酸 B; 丹参酮 II A; 含量测定

〔中图分类号〕R917 〔文献标识码〕A 〔文章编号〕2095-7165 (2023) 03-001-03

〔基金项目〕四川省药品监督管理局科技计划项目 (2021013)

Determination of hydroxysafflower yellow A, salvianolic acid B and tanshinone II A in Quyu Huoluo liniment by HPLC

〔Abstract〕OBJECTIVE To determine the content of hydroxysafflower yellow A, salvianolic acid B and tanshinone II A in Quyu Huoluo liniment by HPLC (DAD detector). METHODS Agilent XDB-C18 column (5 μ m $\times$ 4.6mm $\times$ 250mm), mobile phase A is acetonitrile, mobile phase B is 0.5% formic acid solution, gradient elution is carried out, flow rate is 1.0mL $\cdot$ min⁻¹, detection wavelength of hydroxysafflower yellow A is 403nm, detection wavelength of salvianolic acid B is 286nm, detection wavelength of tanshinone II A is 270nm, and column temperature is 30 $^{\circ}$ C. RESULTS The separation, linearity, precision, stability, repeatability and recovery of the three components met the requirements. CONCLUSION This method can be used for the quality control of Quyu Huoluo liniment.

〔Key words〕HPLC; Quyu Huoluo liniment; Hydroxy safflower yellow pigment A; Salvianolic acid B; Tanshinone IIA; Content determination

祛瘀活络搽剂系四川省宜宾市骨科医院根据传统验方研制的中药搽剂, 由丹参、红花、牛膝、威灵仙、络石藤、当归、没药等二十六味中药材按处方量取净药材粉碎成细粉, 过筛, 混匀, 粉末用 60 $^{\circ}$ 白酒 1000ml 浸泡 90 天, 分装制成, 具有活血化瘀的功效。发挥功效的主要化学成分有羟基红花黄色素 A^[1]、丹酚酸 B^[2]、丹参酮 II A^[3] 等, 现基于中华人民共和国药典 2020 年版方法^[4-5] 和相关的研究, 建立基于高效液相色谱的 DAD 多波长检测方法, 用于同时测定祛瘀活络搽剂中羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 三种成分含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (赛默飞 U3000、Waters E2695); 超纯水; 色谱纯的乙腈、甲醇、甲酸; 羟基红花黄色素 A 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111637-201810); 丹酚酸 B 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111562-201917); 丹参酮 II A 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 110766-202022)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent XDB-C18 (5 μ m $\times$ 4.6mm $\times$ 250mm); 流速: 1.0ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 和丹参酮 II A 检测波长分别为 403nm、286nm 和 270nm; 进样体积: 5 μ l; 以乙腈为流动相 A, 0.5% 甲酸水溶液为流动相 B^[6],

梯度洗脱, 条件为: 0 $\sim$ 20min, 5% $\sim$ 17%A; 20 $\sim$ 52min, 17% $\sim$ 35%A; 52 $\sim$ 63min, 35% $\sim$ 30%A; 63 $\sim$ 70min, 30% $\sim$ 80%A; 70 $\sim$ 78min, 80%A; 78 $\sim$ 80min, 80% $\sim$ 5%A; 80 $\sim$ 90min, 5%A。

1.3 溶液的制备

1.3.1 对照品溶液的制备

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品和丹酚酸 B 对照品约 12.5mg, 分别置 25ml 容量瓶中, 加 80% 甲醇适量, 超声使溶解, 放冷, 再用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别作为羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 对照品母液; 精密称取丹参酮 II A 对照品约 12.5mg, 置 100ml 容量瓶中, 加 80% 甲醇适量, 超声使溶解, 放冷, 再用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为丹参酮 II A 母液。精密吸取羟基红花黄色素 A 母液 10ml、丹酚酸 B 母液 10ml 和丹参酮 II A 母液 1ml 置 25ml 容量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到混合标准工作液。分别取混合标准工作液 0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml, 用 80% 甲醇定容至 1ml, 得到 ST1 $\sim$ ST5 混合系列标准溶液。

1.3.2 供试品溶液的制备

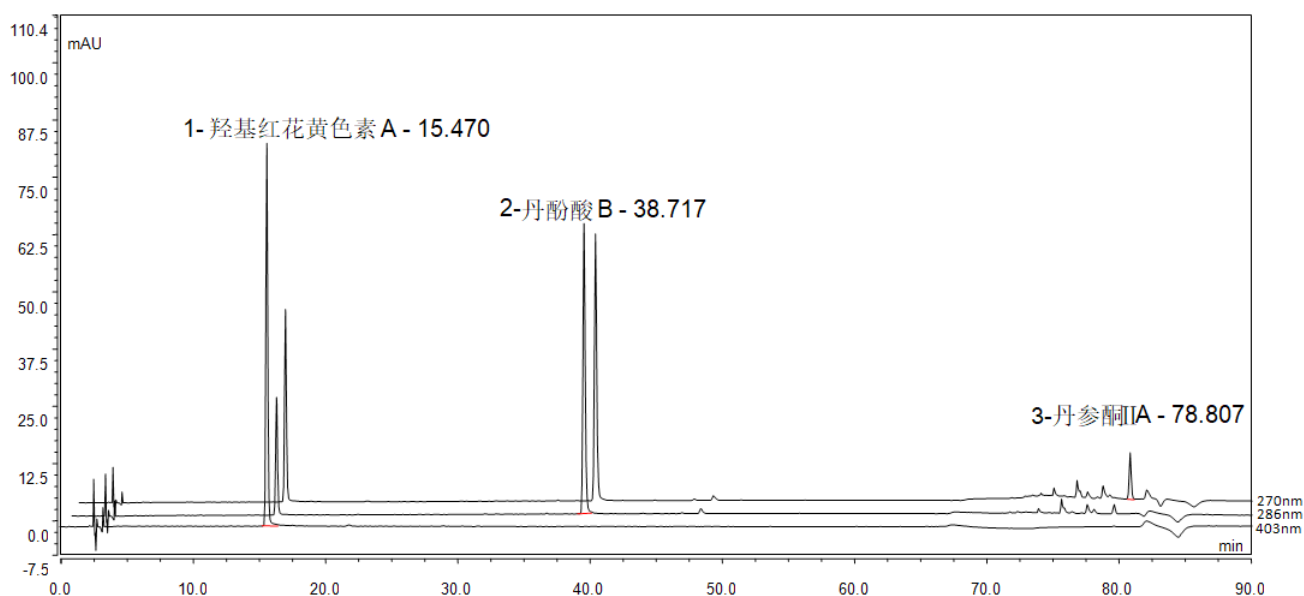
取本品, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 即得。

1.4 方法学验证

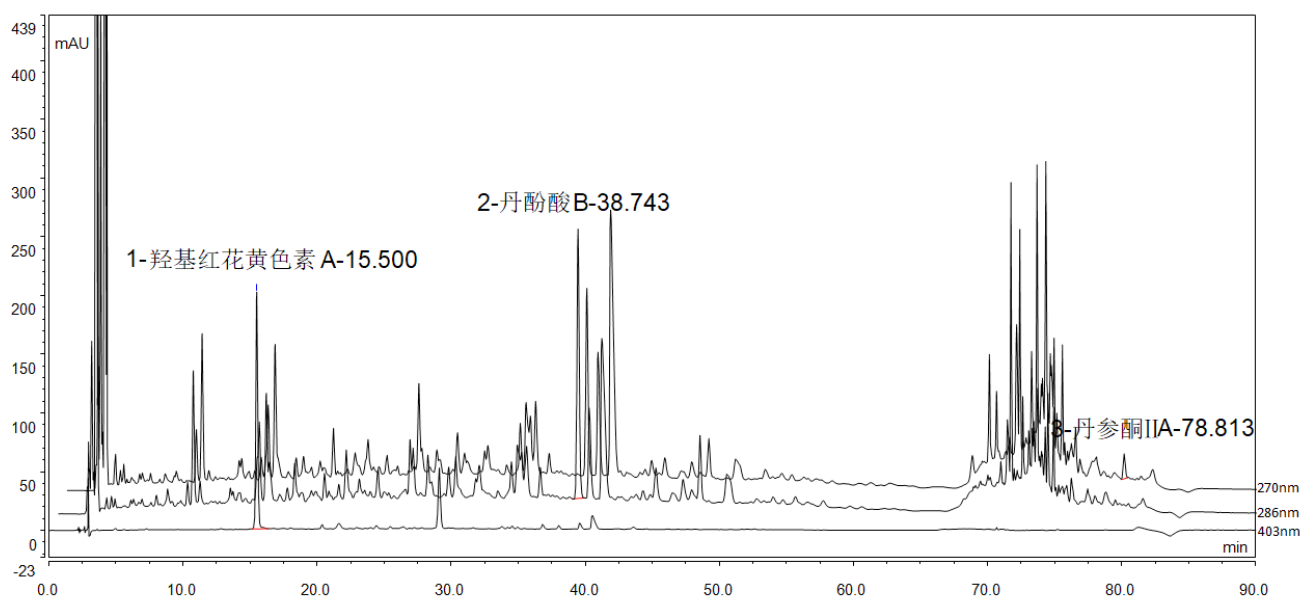
1.4.1 系统适用性试验

取供试品溶液注入色谱仪, 理论板数按羟基红花黄色素 A 峰、丹酚酸 B 峰、丹参酮 II A 峰计均不低于 5000, 各峰与相邻峰的分度度均不低于 1.5, 表明系统适用性良好, 能满足试验要求。

通讯作者: 彭章明 (1969-), 男, 副主任药师, 宜宾市食品药品检验检测中心, 主要从事中药及中成药质量控制研究。



图一 不同波长下混合对照品溶液中羟基红花黄色素 A 峰、丹酚酸 B 峰、丹参酮 II A 峰色谱图



图二 不同波长下样品溶液中羟基红花黄色素 A 峰、丹酚酸 B 峰、丹参酮 II A 峰色谱图

1.4.2 耐用性试验

按照“1.2”中的方法，在改变仪器和色谱柱的情况下再次进行测试，使用 Waters E2695 液相色谱仪，色谱柱 Kromasil 100-5-C18 (5 μ m $\times$ 4.6mm $\times$ 250mm)，其余条件不变，吸取相同的混合对照品溶液和供试品溶液进行测定，理论板数按羟基红花黄色素 A 峰、丹酚酸 B 峰、丹参酮 II A 峰计均不低于 5000，各峰与相邻峰的分度度均不低于 1.5，表明该方法耐用性较好。

1.4.3 精密度试验

取 ST3 混合系列标准溶液，重复进样 6 次，测得峰面积，计算羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 的峰面积 RSD 分别为 0.72%、0.34%、1.57%，表明仪器精密度良好。

1.4.4 线性试验

精密量取上述混合系列标准溶液 ST1 ~ ST5 各 5 μ l，分别注入色谱仪，按“1.2”所述色谱条件测定，以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标进行线性回归，得到羟基红花黄色素 A

的回归方程 $y=0.2554x+0.2490$ ，相关系数 $R^2=0.9994$ ；丹酚酸 B 的回归方程 $y=0.1066x+0.0171$ ，相关系数 $R^2=0.9996$ ；丹参酮 II A 的回归方程 $y=0.4516x+0.026$ ，相关系数 $R^2=0.9986$ 。表明该方法分别在相应浓度范围内线性较好。

1.4.5 回收率试验

取 ST3 混合系列标准溶液与供试品溶液各 0.5ml 等体积混匀，制备 6 份平行样，按“1.2”中的方法注入色谱仪，测定羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 和丹参酮 II A 的峰面积。将三者的峰面积分别代入各自的标准曲线，计算得到相应的浓度和回收率。对羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 的回收率分别为 97.41%、89.62%、103.87%，表明该方法准确度良好。

1.4.6 稳定性试验

取供试品溶液，分别在放置 0h、4h、8h、12h 及 24h 后，按“1.2”中色谱条件测定。结果供试品溶液中羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 峰、丹参酮 II A 峰面积的 RSD 分别为 0.51%、

(下转第 5 页)

拉酮等，会产生较多的副作用如呕吐、腹泻等。

中医在肥胖症的治疗上具有独特优势，副作用少，痛苦小，疗效明显，近年来在临床治疗肥胖症中获得一定发展。中医认为，痰瘀互结的现象在肥胖发生过程中比较常见，因痰湿内停，阻滞气机，久之则会使血流速度减缓，最终产生痰湿和气滞血瘀并存的证候。本研究结果得出，相较于对照组，治疗组总有效率更高，疗后体重和腰围更低（ $P<0.05$ ），提示健脾化湿法+穴位埋线应用于痰湿血瘀型肥胖症可取得更理想的治疗效果，患者疗后体重与腰围均显著减少，具有确切的减重效果。荷叶具有祛瘀止血的功效；山楂可消食化积、活血化瘀；柠檬存在促进胃部消化的作用；玫瑰花能发挥益肺宁心、健脾开胃之效；金银花可解毒、清热^[3]。诸药联用可达到健脾、祛瘀等功效，用在痰湿血瘀型肥胖症中可较好地改善中医症候，达到减重目的。穴位埋线疗法主要是通过异体蛋白羊肠线对穴位的长时间刺激，增强机体免疫力，加速血液循环，抑制植物神经系统，减慢胃肠运动，以及减少胃酸分泌，增强机体对葡萄糖的利用，加速组织代谢，进而

得到减少脂肪和体重之效^[4-5]。

综上所述，健脾化湿法+穴位埋线治疗痰湿血瘀型肥胖症疗效理想，值得推广。

[参考文献]

- [1] 吴佳文. 黄琦运用“木郁达之，土郁夺之”论治腹型肥胖[J]. 江苏中医药, 2022, 54(4):37-39.
- [2] 刘艳红, 于身存, 王春燕. 基于“脾常不足”探讨中医食疗对儿童肥胖调护作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(12):134-138.
- [3] 孟元, 高彦彬, 王雨, 等. 高彦彬从络病论治肥胖相关性肾小球病经验撷英[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(11):19-25.
- [4] 唐霖, 谢汉兴, 莫灿婷, 等. 穴位埋线及其联合疗法治疗单纯性肥胖研究概况[J]. 中医药学报, 2021, 49(4):117-120.
- [5] 吉玲玲, 欧阳八四, 沈洁, et al. 穴位埋线治疗肥胖合并食物成瘾患者的临床疗效观察[J]. 针灸推拿医学(英文版), 2021, 19(3):193-199.

表 2 体重与腰围相比

组别	例数	体重 (kg)		腰围 (cm)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	45	80.23±9.77	67.78±6.19	29.75±4.16	23.35±1.58
对照组	45	80.16±9.42	72.25±9.72	29.69±5.11	25.55±4.12
t 值	-	0.035	2.602	0.061	3.345
P 值	-	0.972	0.011	0.951	0.001

(上接第 2 页)

0.43%、3.34%。表明供试品溶液在 24 小时内稳定性良好。

1.4.7 重复性试验

取样品 6 份，用 0.45 μm 滤膜滤过，分别注入液相色谱仪，按“1.2”所述色谱条件测定。6 份样品的羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 峰、丹参酮 II A 峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.75%、1.69%，表明该方法重复性良好。

1.5 样品测定

取供试品溶液两份，分别注入色谱图，记录峰面积，将供试品峰面积平均值带入相应标准曲线得到供试品中羟基红花黄色素 A 浓度为 133.62 μg/ml，丹酚酸 B 浓度为 129.21 μg/ml，丹参酮 II A 浓度为 2.61 μg/ml。

2 讨论

基于三类化学物质都具有较好的紫外相应强度，我们选择 DAD 检测器，根据光谱结果，在 230 ~ 500nm 检测范围内，羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 依次在 403、286、270nm 处分别有较好的相应强度，再结合药典中红花和丹参的相关规定，最终选择 403、286、270nm 依次做为三类物质的检测波长。由于制剂中成分多且复杂，通过调整流动相比比例

和延长梯度洗脱时间，使得待测组分与干扰组分达到有效分离。目前祛瘀活血络搽剂尚无有效性控制指标，本方法所研究的红花黄色素 A、丹酚酸 B、丹参酮 II A 含量测定可以为该药提供质量控制参考。

[参考文献]

- [1] 常海涛, 韩宏星, 屠鹏飞, 赵玉英. 中药红花化学成分及药理作用[J]. 国外医药. 植物药分册, 1999, (05).
- [2] 杨富国, 张安勇, 陈作元, 等. 丹酚酸 B 对兔缺血再灌注心脏内皮细胞功能和血小板活化的影响[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(12): 1250
- [3] 李晓静, 周敏, 李晓辉, 等. 丹参酮 II A 对免疫性血管炎细胞因子和血小板的影响及其作用机制[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(1):188.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版一部[S]. 北京: 中国中医药科技出版社. 2020.5; 77
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版一部[S]. 北京: 中国中医药科技出版社. 2020.5; 157
- [6] 瞿城. 丹参-红花药对配伍效应与物质基础研究[D]. 南京中医药大学. 2018.

(上接第 3 页)

于患者的治疗中能够提高疗效，控制患者的病情缓解痤疮所导致的面部症状，进而改善患者的临床治疗总有效率。

清上防风汤对面部寻常型痤疮的治疗效果显著，将其应用于患者的病情控制中，安全有效，能够改善患者的临床治疗效果，本次研究可证明这一点具有良好的可推广价值，值得进行应用。

[参考文献]

- [1] 邵丰德. 清上防风汤加减治疗面部寻常型痤疮的临床

效果[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(28):128-130.

[2] 陈婷婷, 赖应庭, 张林香, 谢四荣, 丘毅龙. LED 红蓝光照射联合异维 A 酸胶囊、夫西地酸乳膏治疗面部寻常型痤疮的疗效评价[J]. 中国医疗美容, 2020, 10(01):28-31.

[3] 谢圣影, 梁兴伦. 消痤汤治疗面部寻常型痤疮的临床疗效[J]. 中成药, 2018, 40(09):2112-2114.

[4] 张洁珍, 梁少飞, 陈向红. 护理干预对面部中重度寻常型痤疮的临床疗效影响分析[J]. 当代护士(下旬刊), 2017, (06):112-114.