

HPLC法同时测定复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B的含量

彭官良^{1*},梅昭¹,孔令提^{1,2}(1.三峡大学人民医院/宜昌市第一人民医院药学部,湖北宜昌 443000;2.蚌埠医学院第一附属医院药剂科,安徽蚌埠 233004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4726-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.42

摘要 目的:建立同时测定复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为SHIMADZU ODS-C₁₈,流动相为甲醇-0.5%磷酸(35:65, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为403 nm(羟基红花黄色素A)、286 nm(丹酚酸B),柱温为35℃,进样量为20 μl。结果:羟基红花黄色素A、丹酚酸B检测质量浓度线性范围分别为2.01~20.10、39.80~398.00 μg/ml(r 均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.26%~101.25%、98.70%~101.35%,RSD分别为0.94%、0.71%($n=9$)。结论:该方法简便可行、重复性好,可用于复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B的含量测定。

关键词 复方丹参口服液;羟基红花黄色素A;丹酚酸B;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Hydroxysafflor Yellow A and Salvianolic Acid B in Compound Danshen Oral Solution by HPLC

PENG Guan-liang¹, MEI Zhao¹, KONG Ling-ti^{1,2}(1.Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Three Gorges University / the First People's Hospital of Yichang, Hubei Yichang 443000, China; 2.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination the contents determination of hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in Compound danshen oral solution. METHODS: HPLC was performed on the column of SHIMADZU ODS-C₁₈ with mobile phase of methanol -0.5% phosphoric acid (35:65, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 403 nm for hydroxysafflor yellow A and 286 nm for salvianolic acid B and column temperature was 35℃, the volume injection was 20 μl. RESULTS: The linear range was 2.01-20.10 μg/ml for hydroxysafflor yellow A ($r=0.999\ 9$) and 39.80-398.00 μg/ml ($r=0.999\ 9$) for salvianolic acid B. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.26%-101.25% (RSD=0.94%, $n=9$) and 98.70%-101.35% (RSD=0.71%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is feasible and reproducible, and can be used for the contents determination of hydroxysafflor yellow A and salvianolic acid B in Compound danshen oral solution.

KEYWORDS Compound danshen oral solution; Hydroxysafflor yellow A; Salvianolic acid B; HPLC

次从冬凌草中分离。对映-贝壳杉烯二萜是一类有显著抗癌活性的天然化合物,具有很好的开发应用前景。本研究为冬凌草质量评价奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 刘军楼,金妙文.冬凌草甲素抗消化系肿瘤的研究进展[J].中国民族民间医药,2015,24(6):26.
- [2] 郭萍,李玉山,郭远强.冬凌草化学成分和药理活性研究进展[J].药物评价研究,2010,33(2):144.
- [3] 朱楠.冬凌草甲素抗肿瘤机制的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2012,33(13):1785.
- [4] 刘晓丹,刘文达,徐妍,等.冬凌草乙素对白血病K562细胞的诱导凋亡作用及机制研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2161.

- [5] 赵湘湘,郑承剑,秦路平.黄荆子的化学成分研究[J].中草药,2012(12):2346.
- [6] Zhang JX, Han QB, Zhao AH. Diterpenoids from *Isodon japonica*[J]. *Fitoterapia*, 2003, 74(5):435.
- [7] 李广义,王玉兰.瘦花香茶菜二萜成分的研究[J].药学学报,1984,19(8):590.
- [8] 申向荣,张德志.枳椇子石油醚部位的化学成分研究[J].广东药学院学报,2006,22(6):594.
- [9] Zhang XP, Pei YH, Liu MS. Chemical constituents from the leaves of *Cerbera manghas*[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2010, 3(2):109.
- [10] 张晓琦,戚进,叶文才,等.苍耳茎化学成分的化学研究[J].中国药科大学学报,2004, 35(5):404.

(收稿日期:2014-12-05 修回日期:2015-06-24)

(编辑:张静)

* 副主任药师。研究方向:临床药学及不良反应监测。电话:0717-6238336。E-mail:ycadrzx@126.com

复方丹参口服液是由丹参、红花和山楂三味中药加工制成的复方口服溶液,为宜昌市第一人民医院自制的医院制剂(批准文号:鄂药制字Z20082594),具有活血化瘀、宽胸止痛等功效,临床上用于冠心病、心绞痛、高脂血症等。丹参和红花的主要活性成分分别为丹酚酸B和羟基红花黄色素A^[1-2],因此测定这两种成分的含量可作为评价该制剂质量的客观指标之一。为有效控制本品质量,保证临床疗效,本试验建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定复方丹参口服液中羟基红花黄色素A和丹酚酸B含量,以为有效控制复方丹参口服液的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AB型HPLC仪,配有LC-20AB二元泵、SIL-20A自动进样器、SPD-20A紫外光检测器、CTO-20A柱温箱和LC solution色谱工作站(日本SHIMADZU公司);AB135-S型十分之一天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

复方丹参口服液(宜昌市第一人民医院自制剂,批号:20130208、20130210、20130301、20130418、20130425,规格:20 mg/支);羟基红花黄色素A、丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111637-201106、111562-201110,纯度均为100%);甲醇、磷酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SHIMADZU ODS-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.5%磷酸(35:65, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:286 nm(丹酚酸B)、403 nm(羟基红花黄色素A);柱温:35℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取羟基红花黄色素A对照品10.05 mg、丹酚酸B对照品19.90 mg,分别置于2 ml量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,即得羟基红花黄色素A和丹酚酸B质量浓度分别为5.025 0、9.950 0 mg/ml的对照品贮备液。分别量取上述对照品贮备液各2.0 ml,置于同一5 ml量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,即得每1.0 ml含羟基红花黄色素A 0.201 0 mg、丹酚酸B 3.980 0 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取复方丹参口服液2 ml,置于100 ml量瓶中,加入50%甲醇稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例和制备工艺分别制备不含丹参、红花药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。结果表明,羟基红花黄色素A、丹酚酸B与相邻色谱峰的分度均>1.5,理论板数按羟基红花黄色素A峰和丹酚酸

B峰计算均不低于5 000,详见图1(部分色谱图中前4 min的峰主要为溶剂峰及部分极性较大的化合物,保留时间与对照品相差较大,不影响测定)。

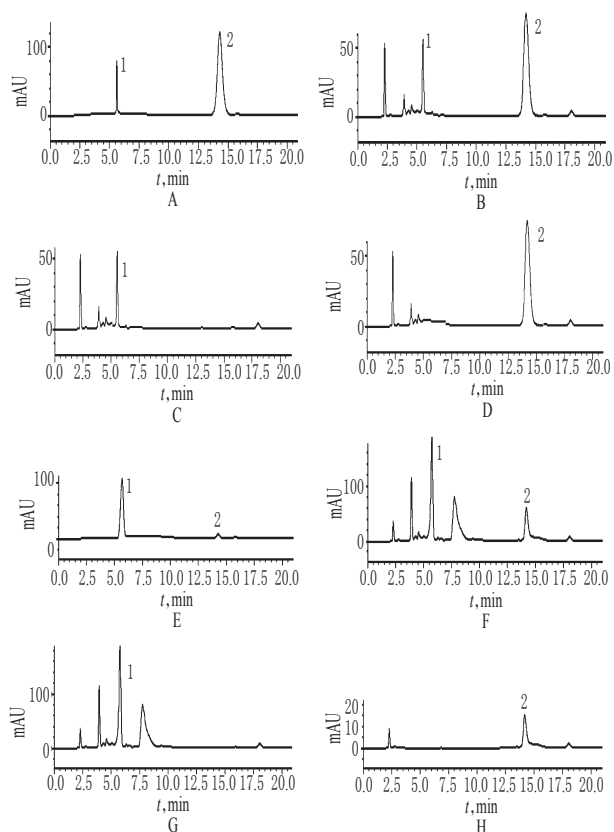


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品(286 nm);B.供试品(286 nm);C.缺丹参的阴性对照(286 nm);D.缺红花的阴性对照(286 nm);E.混合对照品(403 nm);F.供试品(403 nm);G.缺丹参的阴性对照(403 nm);H.缺红花的阴性对照(403 nm);1.羟基红花黄色素A;2.丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference (286 nm);B.test sample (286 nm);C. negative control without *Salvia miltiorrhiza* (286 nm); D. negative control without *Carthamus tinctorius* (286 nm); E.mixed reference (403 nm); F.test sample (403 nm); G.negative control without *S. miltiorrhiza* (403 nm); H. negative control without *C. tinctorius* (403 nm); 1. hydroxysafflor yellow A; 2.salvianolic acid B

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,置于10 ml量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,制成系列质量浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取上述系列混合对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积积分值(y)为纵坐标进行线性回归,得羟基红花黄色素A、丹酚酸B的回归方程分别为 $y=406.11x-164.68$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=180.00x+407.23$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,羟基红花黄色素A、丹酚酸B检测质量浓度线性范围分别为2.01~20.10、39.80~398.00 μg/ml。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 20 μ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.86%、1.28% ($n=6$),表明仪器精密良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20130208)适量,分别于放置 0、4、8、16、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 1.72%、1.15% ($n=5$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密量取复方丹参口服液(批号:20130208)2.0 ml,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 的平均质量浓度分别为 0.238 9、9.605 6 mg/ml,RSD 分别为 0.93%、1.69% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 对照品各适量,置于同一 25 ml 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,制得每 1 ml 含羟基红花黄色素 A 0.24 mg、丹酚酸 B 9.80 mg 的混合对照品溶液。精密量取已知质量浓度的复方丹参口服液(批号:20130208)9 份,每份 1.0 ml,分别精密吸取混合对照品溶液 0.8、1.0、1.2 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=9$)

待测成分	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
羟基红花黄色素 A	0.238 9	0.192 0	0.430 1	99.58	99.79	0.94
	0.238 9	0.192 0	0.431 4	100.26		
	0.238 9	0.192 0	0.430 2	99.64		
	0.238 9	0.240 0	0.479 6	100.29		
	0.238 9	0.240 0	0.480 1	100.50		
	0.238 9	0.240 0	0.478 4	99.79		
	0.238 9	0.288 0	0.522 8	98.58		
	0.238 9	0.288 0	0.521 9	98.26		
	0.238 9	0.288 0	0.530 5	101.25		
	丹酚酸 B	9.605 6	7.840 0	17.437 5		
9.605 6		7.840 0	17.495 6	100.64		
9.605 6		7.840 0	17.551 8	101.35		
9.605 6		9.800 0	19.402 9	99.97		
9.605 6		9.800 0	19.418 6	100.13		
9.605 6		9.800 0	19.278 6	98.70		
9.605 6		11.760 0	21.357 5	99.93		
9.605 6		11.760 0	21.428 7	100.54		
9.605 6		11.760 0	21.398 5	100.28		

2.9 样品含量测定

精密量取 5 批复方丹参口服液样品各适量,按“2.2.2”项下

方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n=3$, mg/ml)

Tab 2 Results of contents determination ($n=3$, mg/ml)

批号	羟基红花黄色素 A	丹酚酸 B
20130208	0.238 9	9.650 6
20130210	0.243 1	9.630 4
20130301	0.250 5	9.572 8
20130418	0.238 2	9.665 3
20130425	0.240 6	9.548 7

3 讨论

参照 2010 年《中国药典》(一部)^[3]及全波长扫描结果,羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的最大吸收波长分别为 403 nm 和 286 nm,因此选择在 403 nm 波长处测定羟基红花黄色素 A,286 nm 波长处测定丹酚酸 B 的含量。

在流动相的选择上,由于羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 均为酸性化合物^[4-6],流动相中加酸可提高柱效,防止拖尾^[7-9],笔者先后对乙腈-磷酸、乙腈-甲酸系统和甲醇-磷酸、甲醇-系统的比例及酸质量浓度进行择优选择,根据分离度结果最终选定甲醇-0.5% 磷酸(35:65, V/V)为流动相。

综上所述,本方法简便可行、重复性好,可用于复方丹参口服液中羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B 的含量测定。

参考文献

- [1] 马丙祥,董宠凯.丹参的药理作用研究新进展[J].中国药房,2014,25(7):663.
- [2] 徐如英,童树洪.红花的化学成分及药理作用研究进展[J].中国药业,2010,19(20):86.
- [3] 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,2010:71,141.
- [4] 王永新,徐荣,白霜.高效液相色谱法测定红花散瘀胶囊中羟基红花黄色素 A 的含量[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):12.
- [5] 张维萍,王冬梅,吴庆芝,等.RP-HPLC 法同时测定安神补心片中 5 个成分的含量[J].药物分析杂志,2014,34(2):259.
- [6] 黄燕萍.HPLC 法同时测定红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素 A 的含量[J].中国药房,2013,24(43):4 092.
- [7] 周思多,王晓,杨洪军,等.红花药材中四种化学成分的高效液相色谱双波长法同时测定[J].时珍国医国药,2014,25(11):2 595.
- [8] 李怀斌,王毅.丹芍生脉胶囊中丹酚酸 B 与芍药苷的含量测定[J].陕西中医,2013,34(8):1 059.
- [9] 张红,陈军.高效液相色谱法测定白疔消软膏中丹酚酸 B 的含量[J].中国医院药学杂志,2009,29(19):1 684.

(收稿日期:2015-01-07 修回日期:2015-08-21)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅