

双波长HPLC法测定益心舒胶囊中4种成分的含量^Δ

王绍志*, 张熙洁, 付连浩, 刘晓红[#](唐山市工人医院, 河北唐山 063000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3844-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.36

摘要 目的:建立测定益心舒胶囊中丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈,流动相为0.5%磷酸水溶液-甲醇-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm(丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B)、320 nm(阿魏酸),柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B质量浓度分别在9~144、0.5~8、0.65~10.4、221.25~3 540 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系(*r*均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均≤1.90%;平均加样回收率分别为100.8%、100.1%、100.1%、99.4%,RSD分别为1.65%、2.87%、3.01%、2.05%(*n*=9)。结论:该方法简单易行、重复性好,可用于益心舒胶囊的质量控制。

关键词 双波长高效液相色谱法;益心舒胶囊;丹参素;原儿茶醛;阿魏酸;丹酚酸B

Contents Determination of 4 Components in Yixinshu Capsule By Dual-wavelength HPLC

WANG Shao-zhi, ZHANG Xi-jie, FU Lian-hao, LIU Xiao-hong (Tangshan Worker Hospital, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of tanshinol, protocatechuic aldehyde, ferulic acid and salvianolic acid B in Yixinshu capsule. METHODS: Dual-wavelength HPLC was performed on the column of Eclipse XDB-C₁₈ with mobile phase of 0.5% phosphoric acid-methanol-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm (tanshinol, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B) and 320 nm (ferulic acid), column temperature was 30 ℃ and volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of tanshinol, protocatechuic aldehyde, ferulic acid and salvianolic acid B were respectively 9-144 μg/ml (*r*=0.999 9), 0.5-8 μg/ml (*r*=0.999 9), 0.65-10.4 μg/ml (*r*=0.999 9) and 221.25-3 540 μg/ml (*r*=0.999 9); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.90%; the average recovery was respectively 100.8% (RSD=1.65%, *n*=9), 100.1% (RSD=2.87%, *n*=9), 100.1% (RSD=3.01%, *n*=9) and 99.4% (RSD=2.05%, *n*=9). CONCLUSIONS: The method is simple and reproducible, and can be used for the quality control of Yixinshu capsule.

KEYWORDS Dual-wavelength HPLC; Yixinshu capsule; Tanshinol; Protocatechuic aldehyde; Ferulic acid; Salvianolic acid B

益心舒胶囊是由人参、麦冬、五味子、黄芪、丹参、川芎、山楂等七味中药组成的复方制剂,该制剂组方以生脉饮方为基础,增加了黄芪、丹参、川芎、山楂四味药,提高了益气复脉、养阴生津的功效,增加了活血化痰的作用。因此,药理作用较生脉饮方更胜一筹,是目前治疗缺血性心血管疾病、心律失常及抗休克的中成药。该药已收录于2010年版《中国药典》(一部)成方制剂部分^[1],目前其质控定量标准已有采用高效液相色谱(HPLC)法测定1~3种成分^[2-8],以及对益心舒片的脂溶性成分测定^[9-10]的报道。为更好地控制本制剂内在质量,笔者参考了相关文献^[11-12],采用双波长HPLC-二极管阵列检测(DAD)法,建立了测定益心舒胶囊中4种水溶性有效成分(丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B)的定量分析方法,并对3个批次药品进行含量测定。

1 材料

Δ 基金项目:河北省自然科学基金石药集团医药联合研究基金资助项目(No.C2011105042)

* 硕士。研究方向:药理学、药物分析学。电话:0315-3722348。E-mail: wangshaozhi0508@sina.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:药理学、临床药理学、药物分析学。电话:0315-3722435。E-mail: 13930520000@163.com

1200系列HPLC仪,包括G1315D DAD器、G1311A四元泵、G1329A自动进样器、G1316A柱温箱、G1322A脱气机、化学工作站B.03.02版(美国Agilent公司);细胞型1810D摩尔纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司);80-2型离心沉淀机(上海手术器械厂);FS-150N型超声波处理器(上海生析超声仪器有限公司)。

益心舒胶囊(贵州信邦制药股份有限公司,批号:20120211、20121110、20121209,规格:0.4 g×36粒/盒);丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B对照品(均购于中国食品药品检定研究院,批号分别为110855-200507、110810-200205、0773-9910、111562-201212,纯度均为100%);甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸、冰醋酸、磷酸均为分析纯,水为超纯水(摩尔纯水机自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.5%磷酸水溶液(A)-甲醇(B)-乙腈(C),梯度洗脱(洗脱程序详见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm(丹参素、原儿茶醛和丹酚酸B)、320 nm(阿魏酸);柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

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	95	4	1
7	93	5	2
10	89	7	4
20	86	10	4
35	63	25	12
45	52	32	16

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B对照品适量,置于同一10 ml量瓶中,用75%甲醇溶解定容,经0.45 μm有机膜滤过,即得含各成分质量浓度分别为0.212、0.35、0.2、3 mg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取益心舒胶囊约0.3 g,精密称定,置于10 ml量瓶中,加75%甲醇稀释至刻度,超声(功率:80 W,频率:20 kHz)处理30 min后,冷却,再用75%甲醇补足减少的质量,以半径为5 cm,3 500 r/min离心10 min,吸取上清液,经0.45 μm有机膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按益心舒胶囊组方工艺分别制成不含丹参、川芎的两种阴性对照制剂,再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液,即得。

2.3 专属性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可见,丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B峰形良好,保留时间分别在8、12、31、40 min左右,理论板数均大于10 000,与其相邻色谱峰分离度均大于1.5。对阴性对照溶液进样分析,将所得色谱图与供试品图进行比较,发现阴性对照溶液对所测组分的测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,用75%甲醇溶液倍比稀释成系列混合对照品标准溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。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,回归方程和线性范围详见表2。

2.5 最低检测限

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,逐倍稀释,精密吸取10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比为3计算丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B的最低检测限分别为1.06、0.10、0.03、150 ng/ml。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续测定6次,记录峰面积。结果,丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.74%、1.70%、0.85%、1.50%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液(批号:20120211)适量,分别于放置1、2、4、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.97%、0.89%、1.30%、1.60%(n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:20120211)6份,每份约0.3 g,精密

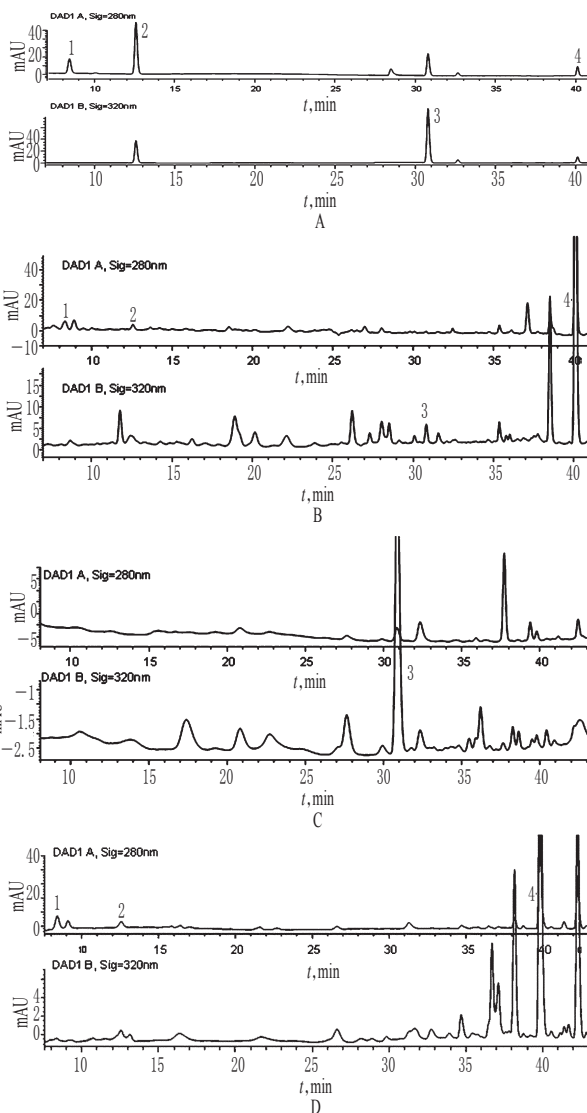


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺丹参的阴性对照品;D.缺川芎的阴性对照品;1.丹参素;2.原儿茶醛;3.阿魏酸;4.丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative sample without *Salvia miltiorrhiza*; D.negative sample without *Ligusticum chuanxiong*; 1.tanshinol; 2.protocatechuic aldehyde; 3.ferulic acid; 4.salvianolic acid B

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
丹参素	$y=5.1557x+0.3464$	9~144	0.9999
原儿茶醛	$y=31.165x+8.9865$	0.5~8	0.9999
阿魏酸	$y=38.084x+3.9788$	0.65~10.4	0.9999
丹酚酸B	$y=1.0233x+49.539$	221.25~3540	0.9999

称定,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,记录峰面积。结果,丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸B峰面积的RSD分别为1.10%、1.30%、0.82%、1.90%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的益心舒胶囊(批号:20120211)9份,每份约0.15 g,精密称定,平行分组,每组3份,分别按相当于样品中各

组分含量的80%、100%、120%的量加入混合对照品溶液,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,计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	称样量, g	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, %
丹参素	0.150 7	0.178 5	0.143 1	0.327 4	104.1	100.8	1.65
	0.151 2	0.179 1	0.143 5	0.323 7	100.8		
	0.150 4	0.178 2	0.141 3	0.318 8	99.5		
	0.149 8	0.177 5	0.177 7	0.352 1	98.3		
	0.150 2	0.177 9	0.177 6	0.356 6	100.6		
	0.149 5	0.177 1	0.177 1	0.354 4	100.1		
	0.150 9	0.178 8	0.215 2	0.399 1	102.4		
	0.149 6	0.177 2	0.212 5	0.390 3	100.3		
	0.151 1	0.179 0	0.212 2	0.393 4	101.0		
	0.150 7	0.010 5	0.009 0	0.019 4	98.9		
0.151 2	0.010 5	0.009 2	0.020 1	104.3			
0.150 4	0.010 5	0.008 8	0.019 1	97.7			
0.149 8	0.010 4	0.010 5	0.020 5	96.2			
0.150 2	0.010 5	0.011 1	0.021 4	98.2			
0.149 5	0.010 4	0.010 2	0.020 7	101.0			
0.150 9	0.010 5	0.013 0	0.023 8	102.3			
0.149 6	0.010 4	0.013 2	0.024 1	103.8			
0.151 1	0.010 5	0.012 8	0.023 1	98.4			
0.150 7	0.013 5	0.011 0	0.024 1	96.4	100.1	3.01	
0.151 2	0.013 5	0.010 6	0.024 3	101.9			
0.150 4	0.013 5	0.010 2	0.023 3	96.8			
0.149 8	0.013 4	0.013 3	0.026 9	101.5			
0.150 2	0.013 5	0.014 1	0.028 3	105.0			
0.149 5	0.013 4	0.013 7	0.027 4	102.2			
0.150 9	0.013 5	0.016 2	0.029 9	101.2			
0.149 6	0.013 4	0.016 7	0.029 7	97.6			
0.151 1	0.013 5	0.015 9	0.029 2	98.7			
0.150 7	8.800 9	7.042 3	15.978 3	101.9			99.4
0.151 2	8.830 1	7.063 7	15.973 1	101.1			
0.150 4	8.783 4	7.052 1	15.774 7	99.1			
0.149 8	8.748 3	8.748 8	17.343 9	98.2			
0.150 2	8.771 7	8.770 8	17.752 8	102.4			
0.149 5	8.730 8	8.721 8	17.441 3	99.9			
0.150 9	8.812 6	10.576 2	19.055 6	96.8			
0.149 6	8.736 6	10.485 3	18.980 4	97.7			
0.151 1	8.824 2	10.482 3	19.038 4	97.4			

2.10 样品含量测定

取3批样品各约0.3 g,精密称定,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并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Results of content determination of samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	丹参素, $\mu\text{g}/\text{粒}$	原儿茶醛, $\mu\text{g}/\text{粒}$	阿魏酸, $\mu\text{g}/\text{粒}$	丹酚酸B, $\text{mg}/\text{粒}$
20120211	473.87 \pm 18.78	27.85 \pm 1.20	35.83 \pm 0.81	23.36 \pm 0.62
20121110	486.86 \pm 20.52	26.90 \pm 1.19	35.47 \pm 0.58	23.21 \pm 0.34
20121209	468.50 \pm 16.19	26.47 \pm 0.85	35.07 \pm 0.84	22.87 \pm 0.10

3 讨论

3.1 提取方法的选择

在提取条件的选择上,分别对不同提取溶剂及超声时间进行了比较,分别以水、甲醇、乙腈、甲酸、冰醋酸、磷酸进行,最终发现以75%甲醇萃取,超声处理30 min时,各组分分离度较好。

3.2 流动相的选择

选取0.5%磷酸水溶液-甲醇-乙腈为流动相进行梯度洗脱,不仅可以得到满意峰形以及相对较大的峰面积,而且分离效果与灵敏度均较好。

3.3 检测波长的选择

DAD可以同时选择多个波长进行检测。本文选择丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B在280 nm,阿魏酸在320 nm波长处进行测定,结果发现各主要成分在各自的最大吸收波长下均可得到较好分离。

综上所述,该方法简单易行、重复性好,可用于益心舒胶囊的质量控制。

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,2010:1 022.
- [2] 吕武清,虞金宝,李晶.益心舒片的质量标准研究[J].中国药师,2010,13(2):226.
- [3] 肖飞,李卫民,李其凤.益心舒胶囊质量标准[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):85.
- [4] 杨小孟.高效液相色谱法测定益心舒胶囊中黄芪甲苷的含量[J].首都医药,2013,20(3):64.
- [5] 郭忠奎,塔常丽.HPLC测定益心舒胶囊中人参皂苷Re的含量[J].长春中医学院学报,2005,21(3):37.
- [6] 许乾丽,茅向军,熊慧林.HPLC测定益心舒胶囊中人参皂苷Rg₁、Re的含量[J].中国中药杂志,2005,30(18):1 462.
- [7] 杜佳新,顾玉红,李萌.HPLC测定益心舒胶囊中人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):88.
- [8] 付娟,李家春,张海弢,等.HPLC-ELSD法同时测定益心舒片中人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量[J].广东药学院学报,2015,31(1):62.
- [9] 郭洁,黄伟.高效液相色谱法测定益心舒分散片中五味子醇甲的含量[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(10):233.
- [10] 秦建平,吴建雄,毕宇安,等.HPLC同时测定益心舒片中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮II_A的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(2):77.
- [11] 潘莹.HPLC法同时测定通脉颗粒中丹参素、阿魏酸和葛根素的含量[J].中国药房,2011,22(4):376.
- [12] 周晓希,孔羽,魏宇昆,等.RP-HPLC-DAD同时测定丹参及丹参片中6种水溶性成分[J].中药材,2014,37(2):343.

(收稿日期:2014-11-20 修回日期:2015-01-29)

(编辑:余庆华)