

HPLC法同时测定参柏舒心颗粒中4种成分的含量^Δ

肖春霞*,文永盛#,周世玉(成都市食品药品检验研究院,成都 610045)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4265-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.23

摘要 目的:建立同时测定参柏舒心颗粒中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和盐酸黄柏碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Waters sunfire-C₁₈,流动相为乙腈-0.05%三氟乙酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为288 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μL。结果:丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和盐酸黄柏碱检测进样量线性范围分别为0.040 01~1.600 46 μg($r=0.999\ 9$)、0.013 84~0.553 7 μg($r=0.999\ 9$)、0.049 32~1.972 94 μg($r=0.999\ 6$)、0.014 46~0.578 6 μg($r=0.999\ 8$);定量限分别为7.68、2.66、4.74、1.38 ng,检测限分别为1.92、0.66、2.36、0.69 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.846%~100.762%(RSD=0.77%, $n=6$)、96.632%~99.463%(RSD=0.98%, $n=6$)、98.541%~100.432%(RSD=0.82%, $n=6$)、98.607%~101.521%(RSD=1.11%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、精密度好,可用于参柏舒心颗粒中4种成分含量的同时测定。

关键词 参柏舒心颗粒;含量测定;丹参素钠;原儿茶醛;丹酚酸B;盐酸黄柏碱;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of 4 Components in Shenbai Shuxin Granules by HPLC

XIAO Chunxia, WEN Yongsheng, ZHOU Shiyu (Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of sodium danshensu, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B and phellodendrine hydrochloride in Shenbai shuxin granules. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Waters sunfire-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% trifluoroacetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 288 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 5 μL. RESULTS: The linear ranges of sodium danshensu, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B and phellodendrine hydrochloride were 0.040 01-1.600 46 μg($r=0.999\ 9$), 0.013 84-0.553 7 μg($r=0.999\ 9$), 0.049 32-1.972 94 μg($r=0.999\ 6$), 0.014 46-0.578 6 μg($r=0.999\ 8$). The limits of quantitation were 7.68, 2.66, 4.74, 1.38 ng, and the limits of detection were 1.92, 0.66, 2.36, 0.69 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 98.846% -100.762% (RSD=0.77%, $n=6$), 96.632% -99.463% (RSD=0.98%, $n=6$), 98.541% -100.432% (RSD=0.82%, $n=6$), 98.607% -101.521% (RSD=1.11%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and precise. It can be used for 4 components in Shenbai shuxin granules.

KEYWORDS Shenbai shuxin granules; Content determination; Sodium danshensu; Protocatechuic aldehyde; Salvianolic acid B; Phellodendrine hydrochloride; HPLC

参柏舒心颗粒由丹参、北沙参、黄柏、牡蛎、龙骨五味中药组成,具有活血祛瘀、养阴益气、定悸除烦的功效,临床用于心悸、怔忡、心烦失眠等的治疗^[1]。参柏舒心颗粒收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第7册)》,名为舒心冲剂,原质量标准仅有2个理化鉴别指标,难以有效地控制其质量。丹参为方中君药,其主要有效成分为丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B^[2-4];黄柏为方中臣药,主要有效成分为生物碱类,其中盐酸黄柏碱是黄柏生物碱类的专属性成分^[5-7]。目前尚未有同时测定上述4种成分含量的报道,且又鉴于提高《中国药典》药品标准的目,本课题组采用高效液相

色谱法(HPLC)建立了同时测定参柏舒心颗粒中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和盐酸黄柏碱含量的方法,并对目前市场上流通的10批参柏舒心颗粒进行含量测定,以期完善其质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 infinity型HPLC仪,包括G1315D1260二极管阵列检测器、G1329B1260自动进样器、Agilent OpenLAB色谱工作站(美国Agilent公司);AE-240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);AUX-220型电子分析天平(日本Shimadzu公司);SK250H型超声仪(上海科导超声仪器有限公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

参柏舒心颗粒(云南腾药制药有限公司,批号:

Δ 基金项目:国家药品标准提高研究课题(No.财社[2015]77号)

* 主管药师。研究方向:中药质量标准。电话:028-85362592。

E-mail:79598093@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:中药质量标准。电话:028-85362592。E-mail:cdwyscd@163.com

160101、160102、160103;云南铭鼎制药有限公司,批号:141032、150770、151210;修正药业集团股份有限公司,批号:161001、160901、160902、160703,规格均为14 g/袋;丹参素钠对照品(批号:110855-201210,纯度:91.2%)、原儿茶醛对照品(批号:110810-201007,纯度:98.2%)、丹酚酸B对照品(批号:111562-201514,纯度:93.7%)、盐酸黄柏碱对照品(批号:111895-201504,纯度:94.9%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters sunfire-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%三氟乙酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:288 nm^[8];柱温:30 ℃;进样量:5 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	A,%	B,%
0~20	5	95
20~30	5→9	95→91
30~60	9	91
60~80	9→22	91→78
80~120	22	78

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和盐酸黄柏碱对照品各适量,加70%甲醇溶液制成每1 mL含丹参素钠320.09 μg、原儿茶醛110.74 μg、丹酚酸B394.59 μg和盐酸黄柏碱115.72 μg的混合对照品贮备液;精密量取上述混合对照品贮备液3 mL,置于10 mL量瓶中,加70%甲醇溶液定容,摇匀,即得。

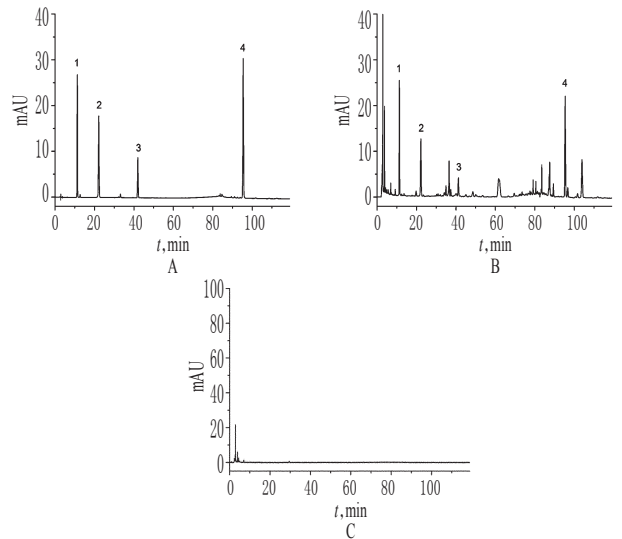
2.2.2 供试品溶液 取样品研细,取5 g,精密称定,置于100 mL锥形瓶中,精密加70%甲醇溶液50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz,下同)30 min,放冷,再次称定质量,加70%甲醇溶液补足缺失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取处方中除丹参、黄柏外的其余药味制成不含丹参、黄柏的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以丹酚酸B峰计均>100 000,其保留时间为96.5 min,阴性对照溶液在相应保留时间处无色谱峰出现。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.丹参素钠;2.原儿茶醛;3.盐酸黄柏碱;4.丹酚酸B

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. sodium danshensu; 2. protocatechuic aldehyde; 3. phellodendrine hydrochloride; 4. salviolic acid B

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液10、5、2.5、1.25、0.5、0.25 mL,分别置于10 mL量瓶中,加70%甲醇溶液定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液5 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
丹参素钠	$y=706.25x-3.306$	0.999 9	0.040 01~1.600 46
原儿茶醛	$y=4 133.1x-17.241$	0.999 9	0.013 84~0.553 7
丹酚酸B	$y=964.03x-13.175$	0.999 6	0.049 32~1.972 94
盐酸黄柏碱	$y=1 160.9x-1.302 9$	0.999 8	0.014 46~0.578 6

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,结果见表3。

表3 LOQ与LOD测定结果(ng)

Tab 3 Results of LOQ and LOD(ng)

待测成分	LOQ	LOD
丹参素钠	7.68	1.92
原儿茶醛	2.66	0.66
丹酚酸B	4.74	2.36
盐酸黄柏碱	1.38	0.69

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,丹

参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B、盐酸黄柏碱峰面积的RSD分别为0.68%、1.13%、1.12%、0.66% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160901)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12、24、48 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B、盐酸黄柏碱峰面积的RSD分别为0.47%、1.52%、0.93%、0.55% (n=8),表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:160901)适量,共6份,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,记录峰面积并计算样品含量。结果,丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B、盐酸黄柏碱的含量平均值分别为0.911、0.123、1.090、0.129 mg/g, RSD分别为1.74%、1.58%、1.27%、0.88% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:160901)共6份,每份约2.5 g,精密称定,置于100 mL具塞锥形瓶中,分别精密加入一定质量的待测成分对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests (n=6)

待测成分	取样量, 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, %
丹参素钠	2.512 7	2.540 8	2.504 0	5.018 7	98.956	99.45	0.77
	2.508 3	2.536 4	2.504 0	5.011 5	98.846		
	2.517 4	2.545 6	2.504 0	5.029 5	99.197		
	2.509 9	2.538 0	2.504 0	5.041 8	99.992		
	2.502 8	2.530 8	2.504 0	5.053 9	100.762		
	2.506 1	2.534 2	2.504 0	5.011 8	98.947		
原儿茶醛	2.512 7	0.308 8	0.296 0	0.599 2	98.104	98.09	0.98
	2.508 3	0.308 3	0.296 0	0.594 3	96.632		
	2.517 4	0.309 4	0.296 0	0.603 8	99.463		
	2.509 9	0.308 5	0.296 0	0.600 1	98.525		
	2.502 8	0.307 6	0.296 0	0.598 7	98.347		
	2.506 1	0.308 0	0.296 0	0.596 5	97.466		
丹酚酸B	2.512 7	2.744 1	2.716 0	5.420 5	98.736	99.37	0.82
	2.508 3	2.739 3	2.716 0	5.449 6	98.541		
	2.517 4	2.749 3	2.716 0	5.434 1	99.790		
	2.509 9	2.741 1	2.716 0	5.468 8	98.853		
	2.502 8	2.733 3	2.716 0	5.450 4	100.432		
	2.506 1	2.736 9	2.716 0	5.414 6	100.040		
盐酸黄柏碱	2.512 7	0.326 7	0.350 8	0.676 6	99.757	99.42	1.11
	2.508 3	0.326 1	0.350 8	0.673 2	98.951		
	2.517 4	0.327 3	0.350 8	0.673 3	98.643		
	2.509 9	0.326 3	0.350 8	0.672 2	98.607		
	2.502 8	0.325 4	0.350 8	0.681 5	101.521		
	2.506 1	0.325 8	0.350 8	0.673 3	99.061		

2.10 样品含量测定

取10批样品各适量,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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果(n=3, mg/袋)

Tab 5 Results of contents determination of samples (n=3, mg/bag)

样品批号	丹参素钠	原儿茶醛	丹酚酸B	丹参主要有效成分总量	盐酸黄柏碱
160101	5.11	0.68	3.64	9.43	0.98
160102	5.13	0.67	3.83	9.63	1.03
160103	5.19	0.72	3.66	9.57	0.94
141032	8.82	1.95	8.38	19.15	2.99
150770	5.86	1.43	5.52	12.81	1.65
151210	12.53	2.51	18.94	33.98	1.89
161001	12.96	1.88	15.83	30.67	1.85
160901	12.76	1.72	15.29	29.77	1.82
160902	13.25	1.79	16.03	31.07	1.87
160703	12.85	1.72	14.06	28.63	0.84

3 讨论

3.1 流动相的选择

试验中曾比较了多个流动相系统(乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.05%三氟乙酸溶液^[8-12])对色谱分离的影响。结果,乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时能使丹参中3种成分均达到较理想的分离效果,但对盐酸黄柏碱的测定有干扰;以乙腈-0.05%三氟乙酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,4种待测成分均能得到良好的分离,且具有重复性好、柱效高等特点。因此,选择乙腈-0.05%三氟乙酸溶液(梯度洗脱)为本试验的流动相。

3.2 检测波长的选择

本研究采用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内分别对丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和盐酸黄柏碱进行光谱扫描,结果显示丹酚酸B在288 nm波长处有最大吸收,丹参素钠、原儿茶醛和盐酸黄柏碱在此波长处亦有较大的吸收。因此,选择288 nm为本试验的检测波长。

3.3 提取溶剂的考察

本试验曾考察了2%盐酸溶液、70%甲醇溶液、1%盐酸溶液-甲醇(1:1, V/V)等多个溶剂系统^[11-13]对样品的提取效果。结果,2%盐酸溶液作为提取溶剂时,不能将丹酚酸B提取出来;1%盐酸溶液-甲醇(1:1, V/V)作为提取溶剂时,制备的供试品溶液中丹参素钠和丹酚酸B极不稳定;而以70%甲醇溶液作为提取溶剂时,待测成分的提取率及供试品溶液的稳定性均较好。因此,本试验选择70%甲醇溶液为提取溶剂。

3.4 样品含量测定结果分析

从10批样品的含量测定结果来看,4种成分含量差异很大。为进一步考察样品中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B以及盐酸黄柏碱的真实含量,本课题组曾采取不同的条件制备4份浸膏进行含量测定。结果,不同的提取条件和干燥方法对样品中盐酸黄柏碱的含量影响不大,而对样品中3种水溶性成分的含量比例影响很大。

HPLC法同时测定干髓糊剂中丁香酚和麝香草酚的含量^Δ

曹伟宇*,贺文娟,雷 丸,王晓娟*(军事口腔医学国家重点实验室/国家口腔疾病临床医学研究中心/陕西省口腔生物工程技术研究/第四军医大学口腔医院药剂科,西安 710032)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4268-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.24

摘要 目的:建立同时测定干髓糊剂中丁香酚和麝香草酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Wonda Cract C₁₈,流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为274 nm,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果:丁香酚和麝香草酚检测质量浓度线性范围分别为0.02~0.19 mg/mL($r=0.9997$)、0.03~0.30 mg/mL($r=0.9996$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为95.85%~99.84%(RSD=1.11%, $n=9$)、95.81%~100.91%(RSD=1.59%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于干髓糊剂中丁香酚和麝香草酚含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法;干髓糊剂;丁香酚;麝香草酚;含量测定

Simultaneous Determination of Eugenol and Thymol in Mummification Pastes by HPLC

CAO Weiyu, HE Wenjuan, LEI Wan, WANG Xiaojuan(State Key Lab of Military Stomatology/National Clinical Research Center for Oral Diseases/Shaanxi Engineering Research Center for Dental Materials and Advanced Manufacture/Dept. of Pharmacy, Stomatology Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of eugenol and thymol in mummification pastes. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Wonda Cract C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 274 nm, and column temperature was set at 25℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of eugenol and thymol

根据相关文献报道,丹参的水溶性成分在一定条件下会互相转化^[4]。故本试验样品中丹参重要有效成分的含量测定以3种成分的总量进行计算。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、精密度好,可用于参柏舒心颗粒中4种成分含量的同时测定。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂:第七册[S].1993:184.
- [2] 刘惠,开金龙.丹参的现代研究进展[J].甘肃中医,2010,23(2):70-72.
- [3] 杨志霞,林谦,马利.丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J].世界中西医结合杂志,2012,7(2):93-96.
- [4] 马丙祥,董龙凯.丹参的药理作用研究新进展[J].中国药房,2014,25(7):663-665.
- [5] 姜昕易,张辉芬,王胜男,等.ILS-HPLC同时测定黄柏中5种生物碱含量[J].中国中药杂志,2014,39(19):3808-3811.
- [6] 刘江亭,李慧芬,崔伟亮.川黄柏、关黄柏饮片和水煎液中3种生物碱含量的比较研究[J].山东中医药大学学报,

- 2013,37(5):437-438,441.
- [7] 周松,刘永刚,张国祥.黄柏化学成分及质量控制研究进展[J].中国药房,2012,23(39):3740-3742.
- [8] 许丽雯,奚之骏,杨铭,等.RP-HPLC法同时测定镇惊泻火颗粒中丹参素钠、原儿茶醛、丹酚酸B和甘草苷[J].中成药,2013,35(10):2157-2159.
- [9] 于晶晶,徐飞鹤.RP-HPLC同时测定香丹注射液中丹参素钠、原儿茶醛和丹酚酸B的含量[J].海峡药学,2012,24(2):45-47.
- [10] 王紫燕,李春沁,穆敏婕,等.HPLC波长切换法同时测定补肾活血方中丹参素、葛根素、大豆苷和丹酚酸B的含量[J].药物分析杂志,2016,36(6):1020-1025.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:630-631,713-714.
- [12] 国家药典委员会.国家药品标准WS₃-B-1445-93-2[S].2012.
- [13] 吴笛,叶秋雄,李楚源.一测多评法测定复方丹参片中5种酚酸类成分的含量[J].中国新药杂志,2013,22(18):2130-2135,2173.
- [14] 张洪超,李伟,马晓慧,等.丹参水溶性成分间相互转化及相互作用研究进展[J].医学综述,2014,20(9):1647-1649.

Δ 基金项目:军队医疗机构制剂标准提高研究项目(No.13ZJZ08)

*药师,硕士。研究方向:药剂学。电话:029-84773998。E-mail:464970076@qq.com

#通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药剂学与新药。电话:029-84776189。E-mail:wxjyh231@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-05-09 修回日期:2017-07-15)

(编辑:刘 柳)