

HPLC-双波长切换法同时测定双参通冠胶囊中脱氢紫堇碱、丹酚酸B的含量^Δ

孙锦*,张鹏#,彭勍,孟硕,任钧国,刘建勋(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,北京 100091)

中图分类号 R932;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)07-0886-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.07.06

摘要 目的:建立同时测定双参通冠胶囊中脱氢紫堇碱和丹酚酸B含量的方法。方法:采用HPLC-双波长切换法。色谱柱为Waters symmetry C₁₈,以乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长为286 nm(丹酚酸B)、336 nm(脱氢紫堇碱),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果:在建立的检测条件下,脱氢紫堇碱和丹酚酸B均能达到基线分离,二者进样量线性范围分别为0.157~1.259 μg、0.391~3.131 μg(*r*均为0.999 9);精密性、重复性和稳定性试验(24 h内)的RSD均小于2.00%(*n*=6~10);平均加样回收率分别为101.61%、102.85%(RSD分别为3.59%、2.85%,*n*=6)。结论:建立的HPLC-双波长切换法可同时测定双参通冠胶囊中脱氢紫堇碱和丹酚酸B含量,且方法操作简便、快速,可用于双参通冠胶囊的质量控制。

关键词 双参通冠胶囊;HPLC-双波长切换法;含量测定;丹酚酸B;脱氢紫堇碱

Simultaneous Determination of Dehydrocorydine and Salvianolic Acid B in Shuangshen Tongguan Capsules by HPLC-dual Wavelength Switching Method

SUN Jin, ZHANG Peng, PENG Qing, MENG Shuo, REN Junguo, LIU Jianxun (Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop an method for determining the contents of dehydrocorydine and salvianolic acid B in Shuangshen tongguan capsules simultaneously. METHODS: The HPLC-dual wavelength switching method was used. The determination was performed on Waters symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 286 nm (salvianolic acid B) and 336 nm (dehydrocorydine). The column temperature was maintained at 25℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: Under this condition, dehydrocorydaline and salvianolic acid B could be separated in baseline. The linear range of them were 0.157-1.259 μg and 0.391-3.131 μg (*r*=0.999 9). RSDs of precision, reproducibility and stability tests (within 24 h) were all lower than 2.00% (*n*=6-10). The average recovery rates were 101.61% and 102.85% (RSD=3.59% and 2.85%, *n*=6). CONCLUSIONS: Established HPLC-dual wavelength switching method can be used for simultaneous determination of dehydrocorydine and salvianolic acid B in Shuangshen tongguan capsules. The method is simple and rapid, and can be used for the quality control of Shuangshen tongguan capsule.

KEYWORDS Shuangshen tongguan capsules; HPLC-dual wavelength switching method; Content determination; Salvianolic acid B; Dehydrocorydine

双参通冠胶囊是由人参、丹参、延胡索等中药提取物以一定比例配伍而成的组分中药,目前正处于临床前研究阶段。在该制剂中,人参大补元气、养血生津,丹参活血、化瘀、消痈,延胡索行气活血并具有良好的止痛效果,三药配伍具有益气活血、理气止痛之效^[1]。前期研究表明,三药组成的方剂或制剂(原方曾用名有双参通冠方、双参宁心方、双参宁心胶囊等)具有明显改善动物急性心肌缺血和心肌梗塞的作用,能够减轻心肌损伤程

度、缩小心肌梗塞面积,对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[2-4];另还可扩张冠脉血管、降低冠脉阻力、增加冠脉血流量,从而改善心肌的供血供氧,对心血管系统起到调整和改善作用^[5-6]。为有效地控制其内在质量,本实验室前期建立了分别对其有效成分脱氢紫堇碱(延胡索)和丹酚酸B(丹参)进行含量测定的色谱方法,操作较烦琐;为优化其测定方法,本文中通过切换波长、采用梯度洗脱,建立了同时测定双参通冠胶囊中脱氢紫堇碱和丹酚酸B含量的方法,以期为其质量标准拟定提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);METTLER AE240型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多

^Δ 基金项目:国家科技重大专项课题——重大新药创制专项(No.2017ZX09301018)

* 硕士研究生。研究方向:中药物质基础。E-mail:sunin0924@163.com

通信作者:研究员,硕士生导师。研究方向:中药物质基础。E-mail:onflown@sina.com

公司);KQ-300型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q型超纯水仪(美国密理博公司)。

1.2 药品与试剂

双参通冠胶囊[本实验室制备,批号:20180510(小试样品),20180810、20180829、20180917(中试样品),规格:160 mg/粒];脱氢紫堇碱对照品(日本和光纯药工业株式会社,批号:045-32941,纯度:85.53%);丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111562-201716,纯度:94.1%);乙腈、磷酸均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备

取脱氢紫堇碱、丹酚酸B对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL中含脱氢紫堇碱0.09 mg、丹酚酸B 0.2 mg的混合溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备

取双参通冠胶囊10粒,倒出其内容物,研细,混匀。取细粉约10 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加入80%甲醇,超声(功率:300 W,频率:40 kHz,10 min)处理使其溶解,定容,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 阴性样品溶液的制备

双参通冠胶囊在制剂过程中加入了一定量的辅料糊精,为考察辅料和人参提取物对测定结果是否有干扰,按处方比例称取适量辅料和人参提取物制成阴性样品,按“2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.4 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为Waters symmetry C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μL;流动相:乙腈-0.05%磷酸溶液(V/V),梯度洗脱;检测波长:0~30 min:336 nm(脱氢紫堇碱),30~60 min:286 nm(丹酚酸B)。在上述色谱条件下,取“2.1”“2.2”“2.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液(批号:20180510)和阴性样品溶液进样分析,结果脱氢紫堇碱和丹酚酸B理论板数均不低于20 000,相邻峰之间分离度均大于1.5。梯度洗脱程序见表1,3种溶液的色谱图见图1。

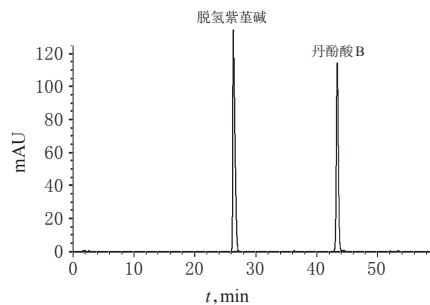
表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

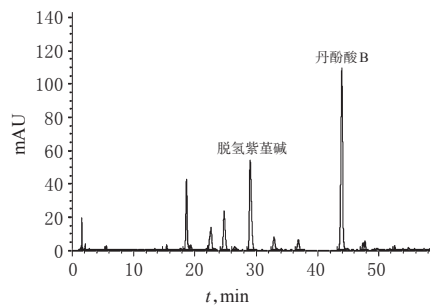
时间,min	乙腈,%	0.05%磷酸,%
0	10	90
16	17	83
40	22	78
50	30	70
55	40	60
60	40	60

2.5 方法学考察

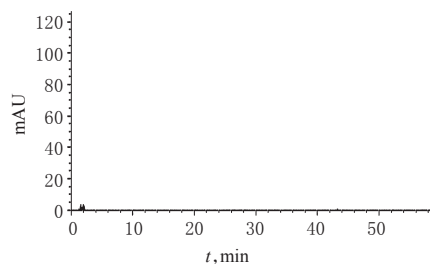
2.5.1 线性关系考察与定量限试验 精密吸取混合对照品溶液2、4、6、8、10、12、14、16 μL,注入液相色谱仪中,按照“2.1”项下色谱条件测定。分别以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,计算回归方程。结果,



A.混合对照品溶液



B.供试品溶液



C.阴性样品溶液

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

脱氢紫堇碱、丹酚酸B的回归方程分别为: $y=330.12x-17.62$ ($r=0.9999$)、 $y=252.31x-17.62$ ($r=0.9999$),表明脱氢紫堇碱、丹酚酸B进样量分别在0.157~1.259、0.391~3.131 μg范围内与其峰面积具有良好的线性关系。

以信噪比约10:1时相应的质量浓度作为定量限进行试验。结果表明,脱氢紫堇碱定量限为1.60 μg/mL(信噪比为9.8),丹酚酸B的定量限为5.18 mg/mL(信噪比为12.6)。

2.5.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,按“2.1”项色谱条件连续进样6次。结果,脱氢紫堇碱、丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.54%、0.54%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号:20180510),按“2.1”项色谱条件,分别于0、1、2、4、6、8、12、16、20、24 h进样测定,读取各成分峰面积值。结果,脱氢紫堇碱、丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.79%、0.68%($n=10$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20180510)共6份,按“2.3”项下方法制备成供试品溶液,

依法独立测定,计算样品中脱氢紫堇碱、丹酚酸B含量,结果含量的RSD分别为2.00%、1.82%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已知含量样品(批号:20180510)共6份(脱氢紫堇碱21.01 mg/g、丹酚酸B 49.37 mg/g),分别精密加入对照品适量,依法测定,结果表明本法准确度较好,方法可行,详见表2。

表2 回收率结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery rate($n=6$)

成分	取样量,mg	含有量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
丹酚酸B	10.210	0.504	0.426	0.919	97.37	102.85	2.85
	10.180	0.502	0.426	0.944	103.52		
	10.310	0.509	0.426	0.945	102.27		
	10.270	0.507	0.426	0.960	105.71		
	10.190	0.503	0.426	0.950	104.79		
	10.260	0.506	0.426	0.947	103.42		
脱氢紫堇碱	10.210	0.214	0.172	0.387	100.84	101.61	3.59
	10.180	0.214	0.172	0.377	95.04		
	10.310	0.217	0.172	0.395	104.15		
	10.270	0.216	0.172	0.395	104.51		
	10.190	0.214	0.172	0.393	104.32		
	10.260	0.215	0.172	0.388	100.82		

2.6 样品含量测定

取3批中试样品(批号分别为20180810、20180829、20180917),依法制备成供试品溶液,注入液相色谱仪,测定峰面积,计算含量,并与本试验室前期建立的分别测定2种成分含量(各测定波长均分别与本法相同)的结果进行比较,详见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab 3 Results of content determination of samples (mg/g, $n=3$)

批次	方法	脱氢紫堇碱	丹酚酸B
20180810	同时测定(本法)	26.71	48.83
	分别测定	26.40	48.26
20180829	同时测定(本法)	13.02	34.54
	分别测定	12.77	33.74
20180917	同时测定(本法)	21.11	47.69

3 讨论

3.1 测定成分的选择

丹参药材中含有水溶性的酚酸类成分和脂溶性的丹参酮类成分,而研究发现对于冠心病的治疗,其中水溶性部分更为重要,而丹酚酸B是水溶性物质中活性最强的成分^[7];另外,2015年版《中国药典》(一部)也以丹酚酸B为指标对丹参药材进行质量控制。延胡索中的主要化合物为生物碱,其中叔胺类生物碱约占0.65%,季胺类生物碱约占0.3%^[8]。2015年版《中国药典》以延胡索乙素(叔胺类生物碱)作为指标性成分对延胡索药材进行质量控制,但在延胡索中还同时含有季胺类生物碱如脱氢紫堇碱。研究表明,叔胺类生物碱延胡索乙素是延胡索镇痛的主要活性成分^[9],而季胺类生物碱在治疗心血管疾病中具有重要作用^[10]。结合本实验室初期工

艺筛选及药效学实验研究发现,延胡索含有的季胺类生物碱中以脱氢紫堇碱含量较高,并具有较好的药理作用,所以最终决定选择丹酚酸B和脱氢紫堇碱作为该制剂的指标性成分进行含量测定。

3.2 供试品制备方法的确定

本研究在前期试验中,采用了单因素试验对供试品溶液制备过程中的提取溶剂、提取时间和溶剂用量进行了考察。分别考察了不同体积分数(50%、80%、100%)的甲醇、乙醇(乙醇最高体积分数为95%)等溶剂的提取效果,结果表明采用80%甲醇或80%乙醇为提取溶剂时各指标成分提取率均较高,纯甲醇对丹酚酸B的提取有影响,导致提取率偏低;分别对不同提取时间(5、10、15、30 min)进行了考察,结果表明以80%甲醇为溶剂,超声提取10、15 min的提取率基本一致,且超声提取10 min时有效成分基本提取完全,故选择超声提取10 min;分别对提取溶剂用量为10、15、20 mL(样品量为10 mg)时进行比较,结果表明使用10 mL溶剂量即可有效提取出各成分。故最终得到优化的提取方法为用80%甲醇10 mL超声提取10 min。

3.3 色谱条件的选择

在对中药进行分析时,流动相选择不当,常常会使峰形不佳^[11]。本试验需同时测定丹参中水溶性酚酸类成分和延胡索中生物碱类成分,2种成分性质相差较大,故最终采用梯度洗脱。在前期试验中,笔者曾考察了乙腈-0.1%磷酸溶液(三乙胺调pH至6)、乙腈-0.2%磷酸溶液(三乙胺调pH至4)、乙腈-0.1%磷酸溶液和乙腈-0.05%磷酸溶液等不同溶液组成的流动相^[12-14]以不同比例进行对比试验研究。结果表明,采用乙腈-0.05%磷酸系统较其他系统基线平稳、洗脱能力强,可以使各指标成分良好分离,峰形对称,故确定乙腈-0.05%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱。在前期试验中,对对照品溶液进行全波长扫描,结果发现丹酚酸B和脱氢紫堇碱分别在波长约286、336 nm处呈现最大吸收,与文献报道相似^[15-17]。因2种成分最大吸收波长差异较大,故本文采用波长切换法对双参通冠胶囊中2种成分进行含量测定。

综上,本试验建立的HPLC-双波长切换法可同时测定双参通冠胶囊中酚酸类成分丹酚酸B和生物碱类成分脱氢紫堇碱的含量,该方法简单快速、重复性好,且在各组分适宜波长处分别测定其含量,使得测定结果更加准确。本法可作为双参通冠胶囊含量测定方法,可为其质量控制和质量标准的建立提供参考。

参考文献

- [1] 林晓斐.基于药代动力学机制的双参通冠方配伍关系的研究[D].北京:中国中医科学院,2015.
- [2] 李雪丽,刘建勋,郭宇洁.双参宁心方对大鼠心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响[J].中国中药杂志,2013,38(17):2874-2877.

吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用及机制研究^Δ

孙翔*,李庆林[#](安徽中医药大学科研实验中心/新安医学教育部重点实验室,合肥 230038)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)07-0889-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.07.07

摘要 目的:研究吡拉格雷钠对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用及相关机制。方法:将72只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组(地佐环平 0.8 mg/kg)和吡拉格雷钠低、中、高剂量组(20、30、45 mg/kg),每组12只。除假手术组大鼠行假手术外,其余各组大鼠均采用大脑中动脉结扎诱导脑缺血再灌注损伤模型。术后2 h尾静脉注射相应药物,假手术组和模型组大鼠注射等量生理盐水,连续给药6 d,给药间隔均为24 h。再灌注24 h和末次给药后,评估大鼠的神经功能缺陷评分和姿势反射评分,采用微正电子发射断层扫描评估脑损伤情况(包括全脑、岛状皮层、壳核、纹状体、体细胞皮层、杏仁核、运动皮层)。然后处死大鼠,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色后观察脑梗死情况并计算脑梗死体积,酶联免疫吸附试验检测其脑组织中Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶活性和谷氨酸(Glu)含量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠缺血再灌注后24 h和末次给药后的神经功能缺陷评分、姿势反射评分均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),脑缺血再灌注24 h与末次给药后脑组织的SUV、全脑及各不同脑区的右左脑SUV比值均明显降低($P<0.01$);末次给药后脑梗死体积百分数明显升高($P<0.01$),脑组织中Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性明显降低($P<0.01$),Glu含量明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,吡拉格雷钠低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠上述指标均明显改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:吡拉格雷钠对大鼠脑缺血再灌注损伤和神经功能有改善作用,这可能与上调脑组织中Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性和下调Glu含量有关。

关键词 吡拉格雷钠;脑缺血再灌注损伤;神经功能;大鼠;机制

Improvement Effects and Mechanism Study of Pyragrel Sodium on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

SUN Xiang, LI Qinglin (Research Laboratory Center, Anhui University of TCM/Key Lab of Xin'an Medical Medicine, Ministry of Education, Hefei 230038, China)

- [3] 孙宇扬.双参宁心胶囊干预心肌缺血的分子机制研究[D].北京:中国中医科学院,2006.
- [4] 于震,刘建勋,李欣志,等.双参宁心胶囊对小型猪介入性心肌缺血的保护作用[J].中国中药杂志,2007,32(16):1695-1699.
- [5] 孙宇扬,刘建勋,吴晓洋,等.双参宁心方血清药物化学和抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2006,13(5):36-37.
- [6] 刘建勋,于震,李欣志,等.双参宁心胶囊对心导管介入血栓法制备小型猪心肌缺血模型的影响[J].中国中西医结合杂志,2006,26(8):728-731.
- [7] 尹音,王峰,徐向阳.丹酚酸B研究进展[J].中国药师,2007,10(10):1034-1037.
- [8] 唐逸丰.延胡索化学成分与药理作用研究概况[J].中医临床研究,2018,10(23):144-146.
- [9] 徐婷,金昔陆,曹惠明.延胡索乙素药理作用的研究进展[J].中国临床药学杂志,2001,10(1):58-60.
- [10] 贺凯,高建莉,赵光树.延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J].中草药,2007,38(12):1909-1912.
- [11] 王海岭,张艳萍,王传升,等.HPLC法同时测定舒眠胶囊中酸枣仁皂苷A和槲皮苷的含量[J].中国药房,2013,24(8):739-741.
- [12] 戴金明,林徐剑,施晓萍,等.丹参药材用不同水温超声提取后丹酚酸B的含量测定[J].药学研究,2016,35(8):460-462.
- [13] 王红,田明,王一,等.高效液相色谱法测定延胡索总生物碱滴丸中巴马汀碱和脱氢紫堇碱含量[J].中医药学报,2013,41(1):63-64.
- [14] 姜晓燕,张琳,窦志华,等.反相高效液相色谱法同时测定丹参中5种成分含量[J].医药导报,2016,35(9):997-1000.
- [15] 侯晓琳,刘芳馨,鲍慧玮,等.延冰片中脱氢紫堇碱的含量测定[J].中国民族民间医药,2015,24(18):17-19.
- [16] 姚建标,叶伟峰,王如伟.延胡索中脱氢延胡索碱的含量测定方法研究[J].中国药业,2008,17(24):18.
- [17] 赵静宜,陆洋,杜守颖,等.双波长HPLC同时测定延胡索中3种生物碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):107-110.

Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2012ZX09102-101-005)

* 硕士。研究方向:神经药理学。电话:0551-65169371。E-mail:1728720024@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:分子药理学。电话:0551-65169371。E-mail:qinglin_lee@hotmail.com

(收稿日期:2018-11-07 修回日期:2019-01-01)

(编辑:刘萍)