

多波长RP-HPLC法同时测定参芍口服液中5种成分的含量^Δ

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

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3423-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.38

摘要 目的:建立同时测定参芍口服液中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。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、230、320 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:在此色谱条件下,5种成分可完全分离,丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B的质量浓度分别在24~384、1.25~20、40.5~648、1.5~24、145~2 320 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 2.2\%$;平均加样回收率分别为100.7%、100.0%、99.6%、100.3%、99.3%,RSD分别为1.23%、2.19%、0.87%、1.11%、2.46%($n=9$)。结论:该方法专属性强,精密度、准确度高,可用于测定参芍口服液中5种成分的含量。

关键词 多波长反相高效液相色谱法;参芍口服液;丹参素;原儿茶醛;芍药苷;阿魏酸;丹酚酸B

Simultaneous Determination of 5 Components in Shenshao Oral Liquid by Multi-wavelength RP-HPLC Method

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

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of tanshinol, protocatechuic aldehyde, paeoniflorin, ferulic acid and salvianolic acid B in Shenshao oral liquid. METHODS: RP-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, 230 and 320 nm, column temperature was 30 ℃ and volume was 10 μl. RESULTS: Under the chromatographic conditions, 5 kinds of components could be completely separated, the linear range of tanshinol, protocatechuic aldehyde, paeoniflorin, ferulic acid and salvianolic acid B were respectively 24-384 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 1.25-20 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 40.5-648 μg/ml ($r=0.999\ 8$), 1.5-24 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 145-2 320 μg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.2%; the average recovery was respectively 100.7% (RSD=1.23%, $n=9$), 100.0% (RSD=2.19%, $n=9$), 99.6% (RSD=0.87%, $n=9$), 100.3% (RSD=1.11%, $n=9$) and 99.3% (RSD=2.46%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is specific with good precision and reproducibility, and can be used for the content determination of 5 components in Shenshao oral liquid.

KEYWORDS Multi-wavelength RP-HPLC; Shenshao oral liquid; Tanshinol; Protocatechuic aldehyde; Paeoniflorin; Ferulic acid; Salvianolic acid B

参芍口服液是唐山市工人医院自制制剂,由丹参、赤芍、当归、川芎等10味中药组成,具有活血化瘀、益气通络之效,临床用于冠心病、心绞痛以及预防经皮冠状动脉成形术后患者再狭窄等。该制剂的质控方法,已有文献报道采用高效液相色谱(HPLC)法对其中1种或2种有效成分进行测定^[1-4]。为更好控制本制剂内在质量,笔者把中药复方制剂的有效成分测定作为研究的思路与方法,建立了参芍口服液的5种有效成分(丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B)的多波长反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。

1 材料

1200系列HPLC仪,包括G1315D型二极管阵列检测器、

^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)

* 硕士研究生。研究方向:药理学、药物分析学。电话:0315-3722840。E-mail:1303231983@163.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:tsgrylxh@163.com

G1311A型四元泵、G1329A型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1322A型脱气机、化学工作站B.03.02版(美国Agilent公司);1810D型摩尔细胞型超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司);CP225D型分析天平(德国Sartorius公司);80-2型离心沉淀机(上海手术器械厂)。

参芍口服液(唐山工人医院,批号:130608、130706、131008,规格:10 ml/支);丹参素、原儿茶醛、芍药苷、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、110736-200423、0773-9910、111562-201212,纯度均为100%);甲醇、乙腈均为色谱纯,无水乙醇、冰醋酸、甲酸、磷酸均为分析纯,水为自制超纯水。

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,程序详见表1;流速:1.0 ml/min;检测波长:280、230、320 nm;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	94	4	2
10	86	10	4
20	77	18	5
33	67	26	7
45	55	35	10

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B对照品各适量,置于同一10 ml量瓶中,用75%乙醇溶解并定容,得质量浓度分别为0.212、0.35、1.52、0.2、3 mg/ml的混合对照品溶液,再经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取参芍口服液1 ml,置于10 ml量瓶中,加75%乙醇稀释至刻度,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按参芍口服液的处方工艺制备除丹参、赤芍、当归+川芎的3种阴性样品,再按“2.1.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

在上述色谱条件下,丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B峰形良好,保留时间分别在9、12、23、26、42 min左右,理论板数以相应色谱峰计均>2 000,与其相邻色谱峰分离度均大于1.5。

2.4 专属性试验

在上述色谱条件下,对阴性对照溶液进样分析,将所得色谱图与样品图进行比较。结果表明,阴性溶液对所测组分的测定无干扰,色谱见图1。

2.5 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下制成的混合对照品贮备液适量,再用75%乙醇溶液倍比稀释成系列混合对照品标准溶液,按确定的色谱条件依次进样,测定峰面积,以对照品进样浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,各待测成分的线性关系良好,结果详见表2。

2.6 检测限试验

精密吸取混合对照品溶液适量逐倍稀释,每次进样10 μl,以待测组分的峰高为噪声的3倍时计,丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B的最低检测限分别为1.06、0.10、2.78、0.03、150 ng/ml。

2.7 精密度试验

取对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件注入高效液相色谱仪,重复进样6次,每次进样10 μl。结果,丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.83%、1.4%、0.52%、1.3%、1.9%,表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取批号为130608的供试品溶液适量,分别于配制1、2、4、8、10、12 h时进样测定。结果,丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.37%、0.91%、1.2%、1.3%、2.2%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.9 重复性试验

取同一批样品(批号:130608)6份,每份精密吸取1 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B的平

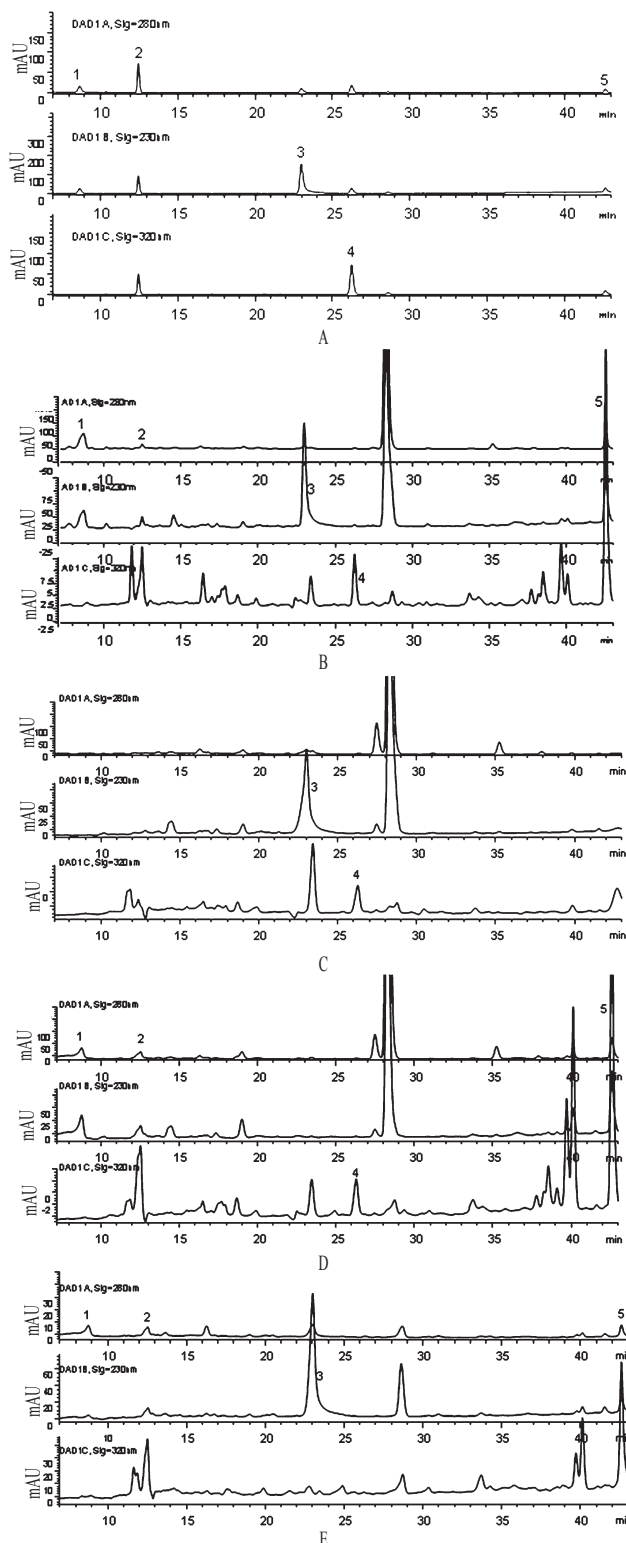


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 样品; C. 缺丹参的阴性样品; D. 缺赤芍的阴性样品; E. 缺川芎+当归的阴性样品; 1. 丹参素; 2. 原儿茶醛; 3. 芍药苷; 4. 阿魏酸; 5. 丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference; B. sample; C. negative sample without *Salvia miltiorrhiza*; D. negative sample without *Radix paeoniae*; E. negative sample without *Ligusticum chuanxiong*+*Angelica sinensis*; 1. tanshinol; 2. protocatechuic aldehyde; 3. paeoniflorin; 4. ferulic acid; 5. 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, $\mu\text{g/ml}$	r
丹参素	$y=5.2508x-0.65$	24~384	0.9999
原儿茶醛	$y=31.281x+8.8854$	1.25~20	0.9999
芍药苷	$y=11.941x+67.182$	40.5~648	0.9998
阿魏酸	$y=37.911x+6.4283$	1.5~24	0.9999
丹酚酸B	$y=1.1003x+25.935$	145~2320	0.9999

均含量分别为1.88、0.0959、3.43、0.1164、11.01 mg/ml, RSD分别为1.1%、1.4%、0.96%、0.88%、1.6%,表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的参芍口服液(批号:130608)9份,每份精密吸取0.5 ml,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%的量加入对照品溶液,再按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样10 μl ,记录峰面积,按外标法计算加样回收率,结果详见表3。

2.11 样品含量测定

取3批参芍口服液样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供

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	取样量, ml	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	0.5	0.9394	0.7511	1.7126	102.9	100.7	1.23	
	0.5	0.9394	0.7519	1.7032	101.6			
	0.5	0.9394	0.7513	1.6958	100.7			
	0.5	0.9394	0.9389	1.8959	101.9			
	0.5	0.9394	0.9393	1.8768	99.8			
	0.5	0.9394	0.9399	1.8788	99.9			
	0.5	0.9394	1.1277	2.0543	98.9			
	0.5	0.9394	1.1278	2.0755	100.7			
	0.5	0.9394	1.1268	2.0667	100.0			
	原儿茶醛	0.5	0.0480	0.0387	0.0872	101.3	100.0	2.19
		0.5	0.0480	0.0382	0.0869	101.8		
		0.5	0.0480	0.0391	0.0882	102.8		
0.5		0.0480	0.0484	0.0959	99.0			
0.5		0.0480	0.0481	0.0955	98.8			
0.5		0.0480	0.0476	0.0937	96.0			
0.5		0.0480	0.0581	0.1074	102.2			
0.5		0.0480	0.0579	0.1057	99.7			

表4 样品含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

批号	丹参素, mg/ml	RSD, %	原儿茶醛, $\mu\text{g/ml}$	RSD, %	芍药苷, mg/ml	RSD, %	阿魏酸, $\mu\text{g/ml}$	RSD, %	丹酚酸B, mg/ml	RSD, %
130608	1.88 ± 0.019	1.00	95.93 ± 2.67	2.78	3.43 ± 0.065	1.89	116.43 ± 2.71	2.31	11.00 ± 0.365	3.32
130706	1.91 ± 0.010	0.50	96.38 ± 2.83	2.94	3.43 ± 0.079	2.29	118.66 ± 3.54	2.99	11.36 ± 0.298	2.62
131008	1.90 ± 0.017	0.90	95.03 ± 1.60	1.69	3.50 ± 0.050	1.44	118.52 ± 1.05	0.89	11.19 ± 0.266	2.38

醇-乙腈-冰醋酸-甲酸-磷酸等进行不同组合、不同浓度、不同比例的流动相系统进行等度或梯度洗脱。结果发现,以0.5%磷酸水溶液-甲醇-乙腈为流动相进行梯度洗脱时,不仅峰形好、峰面积相对较大,且可达到满意的分离效果与较高的灵敏度。该方法专属性强,精密度、准确度好,可用于测定参芍口服液中5种成分的含量。

参考文献

[1] 侯林中,刘晓红,张熙洁.高效液相色谱法测定宽心口服液中丹参素钠的含量[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(10):18.

续表3

Continued tab 3

待测成分	取样量, ml	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, %	
芍药苷	0.5	0.0480	0.0577	0.1049	98.6	99.6	0.87	
	0.5	1.7164	1.3734	3.0754	99.0			
	0.5	1.7164	1.3742	3.0698	98.5			
	0.5	1.7164	1.3729	3.0883	99.9			
	0.5	1.7164	1.7167	3.4287	99.7			
	0.5	1.7164	1.7162	3.4471	100.8			
	0.5	1.7164	1.7166	3.4219	99.4			
	0.5	1.7164	2.0599	3.7953	100.9			
	0.5	1.7164	2.0592	3.7484	98.7			
	阿魏酸	0.5	0.0582	0.0468	0.1061	102.4	100.3	1.11
		0.5	0.0582	0.0463	0.1038	98.5		
		0.5	0.0582	0.0466	0.1044	99.1		
0.5		0.0582	0.0591	0.1178	100.8			
0.5		0.0582	0.0583	0.1168	100.5			
0.5		0.0582	0.0588	0.1173	100.5			
0.5		0.0582	0.0696	0.1275	99.6			
0.5		0.0582	0.0702	0.1287	100.4			
丹酚酸B	0.5	0.0582	0.0691	0.1278	100.7			
	0.5	5.5000	4.4007	9.9735	101.7	99.3	2.46	
	0.5	5.5000	4.4021	9.9207	100.4			
	0.5	5.5000	4.4032	9.8514	98.8			
	0.5	5.5000	5.5012	11.0042	100.1			
	0.5	5.5000	5.5023	11.1098	102.0			
	0.5	5.5000	5.5017	10.8517	97.3			
	0.5	5.5000	6.6012	12.2104	101.7			
	0.5	5.5000	6.6003	11.8828	96.7			
	0.5	5.5000	6.6006	11.7852	95.2			

试品溶液,平行3份,测定丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸B峰面积,以外标法计算各组分含量和RSD,并对测定结果进行分析比较,结果详见表4。

3 讨论

在流动相的选择上,有文献报道采用乙腈-0.2%甲酸水溶液^[5]、乙腈-甲酸-三乙胺-水^[6]、甲醇-0.5%磷酸溶液-乙腈^[7]、甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸溶液^[8]、乙腈-0.1%磷酸溶液^[9]、乙腈-甲酸-水^[10]等进行梯度洗脱。在本试验中笔者曾分别尝试了水-甲

[2] 张熙洁,王玉,侯林中,等.宽心口服液中丹参素和原儿茶醛的含量测定[J].中国药理学杂志,2011,46(19):1530.

[3] 侯林中,裴玉书,张熙洁,等.HPLC法测定宽心口服液中芍药苷的含量[J].中国药房,2011,22(31):2933.

[4] 王玉,侯林中,张熙洁,等.HPLC测定参芍口服液中阿魏酸含量[J].中国药理学杂志,2010,45(21):1674.

[5] 鄢燕,汤宏敏,饶毅,等.多波长高效液相色谱法测定血府逐瘀口服液中5种有效成分[J].药物分析杂志,2009,29(3):347.

[6] 陈恒冲,马彬峡,吴春高,等.RP-HPLC同时测定乐脉颗

复方王不留行片的质量标准研究

赵建颖*, 卢晓梅, 李亮亮, 许明哲(洛阳市食品药品检验所, 河南 洛阳 471023)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3426-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.39

摘要 目的:对复方王不留行片的质量标准进行补充研究。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中的王不留行进行定性鉴别;采用高效液相色谱法同时测定王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸的含量。色谱柱为YMC-Pack Pro C₁₈,流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μl。结果:TLC斑点清晰、分离较好,阴性对照无干扰。王不留行黄酮苷和邻氨基苯甲酸进样量分别在0.055 7~2.228 7、2.011 4~40.227 9 μg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均 $\leq 1.01\%$;平均加样回收率分别为99.69%、99.84%,RSD分别为1.11%、1.18%($n=6$)。结论:该方法操作简便、快捷,结果准确、重复性好,可作为复方王不留行片的质量控制方法。

关键词 复方王不留行片;王不留行黄酮苷;邻氨基苯甲酸;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on the Quality Standard of Compound Vaccariae Tablets

ZHAO Jian-ying, LU Xiao-mei, LI Liang-liang, XU Ming-zhe (Luoyang Institute for Food and Drug Control, Henan Luoyang 471023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To conduct supplementary study for quality standard for Compound vaccariae tablets. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of Vaccariae; HPLC was used to determine the contents of vaccarin and anthranilic acid. The column was YMC-Pack Pro C₁₈ with mobile phase of methanol - 0.3% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 35 ℃ and volume size was 10 μl. RESULTS: The chromatographic spots were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range was 0.055 7-2.228 7 μg ($r=0.999\ 9$) for vaccarin and 2.011 4-40.227 9 μg ($r=0.999\ 9$) for anthranilic acid; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.01%; average recoveries were respectively 99.69% (RSD=1.11%, $n=6$) and 99.84% (RSD=1.18%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate with good reproducibility, and can be used for quality control of Compound vaccariae tablets.

KEYWORDS Compound vaccariae tablets; Vaccarin; Anthranilic acid; TLC; HPLC

复方王不留行片是由王不留行、邻氨基苯甲酸、干酵母、乳酸钙组成的复方制剂,具有增强体质、通经活血、散结、下乳、消肿、消痈的功效,临床上用于产后气血亏损、乳汁不通不下或乳少及乳痛、乳肿等症。国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第十四册WS-10001-(HD-1369)-2003未对方中主药王不留行进行质量控制,文献报道^[1]仅见方中王不留行薄层色谱(TLC)鉴别方法,未见王不留行中王不留行黄酮苷的含量测定方法。为了有效地控制产品质量,笔者建立了TLC法对王不留行进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定方中邻氨基苯甲酸及王不留行黄酮苷的含量。

1 材料

1.1 仪器

U3000型HPLC仪,包括LPG-3400SD型泵、WPS-3000SL型自动进样器、TCC-3000RS型柱温箱、VWD-3100型紫外检测器、Chromleon色谱工作站(美国Dionex公司);92SM-202-A-DR电子分析天平(瑞士Precisa公司);UV-2401PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方王不留行片(白云山汤阴东泰药业有限责任公司,批

粒中阿魏酸和丹酚酸B含量[J].中成药,2009,31(4):554.

[7] 刘征辉,叶挺祥,赵琳琳,等.HPLC多波长法同时测定血府逐瘀颗粒中多指标成分的含量[J].中国中药杂志,2010,35(16):2157.

[8] 杜志茂,黄安军,白娟.HPLC同时测定消栓通络胶囊中阿魏酸、芦丁和丹酚酸B的含量[J].中成药,2010,32

(3):433.

[9] 黄安军,聂晓玲.HPLC法同时测定乳核内消液中芍药苷和阿魏酸的含量[J].西北药学杂志,2009,24(6):436.

[10] 王静,魏娜,赵洪芝,等.HPLC、UPLC测定芪参益气滴丸中5个丹参活性成分含量的比较研究[J].药物分析杂志,2011,31(9):1678.

(收稿日期:2014-08-09 修回日期:2015-06-19)

(编辑:余庆华)

*主管药师。研究方向:药品质量标准。电话:0379-63935767。

E-mail: lyxbl2012@163.com