

HPLC法同时测定心舒乐片中丹酚酸B、葛根素和羟基红花黄色素A的含量

李中娥*(南阳市食品药品检验所,河南 南阳 473061)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)06-0830-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.06.35

摘要 目的:建立同时测定心舒乐片中丹酚酸B、葛根素和羟基红花黄色素A含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welchrom C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(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:丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A检测质量浓度线性范围分别为31.54~189.22($r=0.999\ 1$)、17.13~102.76($r=0.999\ 7$)、4.27~25.60 μg/ml($r=0.999\ 5$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为96.29%~100.88%(RSD=1.73%, $n=6$)、97.12%~100.57%(RSD=1.15%, $n=6$)、97.09%~99.95%(RSD=1.01%, $n=6$)。结论:该方法简便实用、重现性好,专属性强,可有效控制该制剂质量。

关键词 丹酚酸B;葛根素;羟基红花黄色素A;心舒乐片;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Salvianolic Acid B, Puerarin and Hydroxysafflor Yellow A in Xinshule Tablet by HPLC

LI Zhongge(Nanyang Institute for Food and Drug Control, Henan Nanyang 473061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of salvianolic acid B, puerarin and hydroxysafflor yellow A in Xinshule tablet. METHODS: HPLC was performed on a Welchrom C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0ml/min, detection wavelength was 280 nm, column temperature was 35 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 31.54-189.22 μg/ml for salvianolic acid B ($r=0.999\ 1$), 17.13-102.76 μg/ml for puerarin($r=0.999\ 7$) and 4.27-25.60 μg/ml for hydroxysafflor yellow A($r=0.999\ 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 96.29%-100.88% (RSD=1.73%, $n=6$), 97.12%-100.57% (RSD=1.15%, $n=6$) and 97.09%-99.95% (RSD=1.01%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, practical and reproducible, and can effectively control the quality of preparation.

KEYWORDS Salvianolic acid B; Puerarin; Hydroxysafflor yellow A; Xinshule tablet; HPLC

心舒乐片收载于国家药品监督管理局《国家中成药标准汇编:中成药地方标准上升国家标准部分:内科:心系分册》^[1],由丹参、葛根、红花、郁金、桃仁5味中药材精制而成,具有活血化瘀,舒通心脉之功效,临床用于治疗瘀血痹阻的胸痹之证,症见胸闷胸痛、舌暗瘀斑等。现行标准中仅规定了葛根素的含量限值,对于心舒乐片质量控制的研究也有报道^[2],笔者参考相关文献[3-10],选取丹参中水溶性有效成分丹酚酸B作为丹参的质控成分,可与同是水溶性成分的另两味药的有效成分葛根素、羟基红花黄色素A同时测定,这样一个样品、一次检测,可同时控制3种成分的含量,从而在简化检测步骤、节约检测资源的情况下,更好地把关该药品的质量。结果表明,该方法简便实用、重现性好,专属性强,可有效控制该制剂质量。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪,包括紫外检测器(美国Agilent公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-250E型数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

心舒乐片(A厂,批号:140426、140223、131217;B厂,批号:20130729、20130923、20131120;C厂,批号:140425-11、140519-14、140325-13;D厂,批号:20140319、20140409、20131215,规格均为0.3 g/片);丹酚酸B对照品(批号:111562-201110,纯度:98.0%)、葛根素对照品(批号:110752-200912,纯度:96.0%)、羟基红花黄色素A对照品(批号:111637-200905,纯度:91.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯化水。

研究进展[J].中药新药与临床药理,2009,20(2):187.
[9] 晓健,孙婷婷,高丽丽,等.中药重金属研究概况[J].江西中医学院学报,2007,19(6):88.

[10] 杜静,秦民坚,黄林芳,等.石斛中微量元素的含量测定及其安全性评价[J].中国药房,2012,23(47):4 477.

* 副主任药师。研究方向:药品检验与药品质量标准。电话:0377-63893589。E-mail:Lizhongge@126.com

(收稿日期:2015-02-27 修回日期:2015-08-14)
(编辑:张 静)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welchrom C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0	12	88
12	12	88
20	35	65
30	35	65
35	12	88

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11.62 mg,置于50 ml量瓶中,加75%甲醇溶解并定容,摇匀,得羟基红花黄色素A对照品溶液;精密称取丹酚酸B对照品32.18 mg、葛根素对照品17.84 mg,置于20 ml量瓶中,加上述羟基红花黄色素A对照品溶液溶解并定容,摇匀,即得丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A质量浓度分别为1.576 8、0.856 3、0.213 3 mg/ml的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液2 ml,置于20 ml量瓶中,加75%甲醇定容,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品10片,除去包衣,精密称定,研细,精密称取0.25 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇25 ml,密塞,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷,再次称定质量,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按心舒乐片处方和制备工艺分别制备缺丹参、葛根、红花的单一阴性样品,并按“2.2.2”项下方法分别制成单一阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验和专属性试验

分别取“2.2.1”“2.2.2”“2.2.3”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图1。由图1可知,理论板数以丹酚酸B、葛根素和羟基红花黄色素A峰计分别为13 980、10 967、8 326,分离度均>1.5,各成分基线分离良好,且阴性对照无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml,分别置于10 ml量瓶中,75%甲醇溶解并定容,制成系列混合对照品溶液。精密吸取上述系列混合对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x,μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得丹酚酸B、葛根素和羟基红花黄色素A回归方程分别为 $y=11.425\ 0x-0.854\ 6$ ($r=0.999\ 1$)、 $y=10.003\ 3x+1.665\ 8$ ($r=0.999\ 7$)、 $y=12.269\ 7x+1.263\ 8$ ($r=0.999\ 5$)。结果

表明,丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A检测质量浓度线性范围分别为31.54~189.22、17.13~102.76、4.27~25.60 μg/ml。

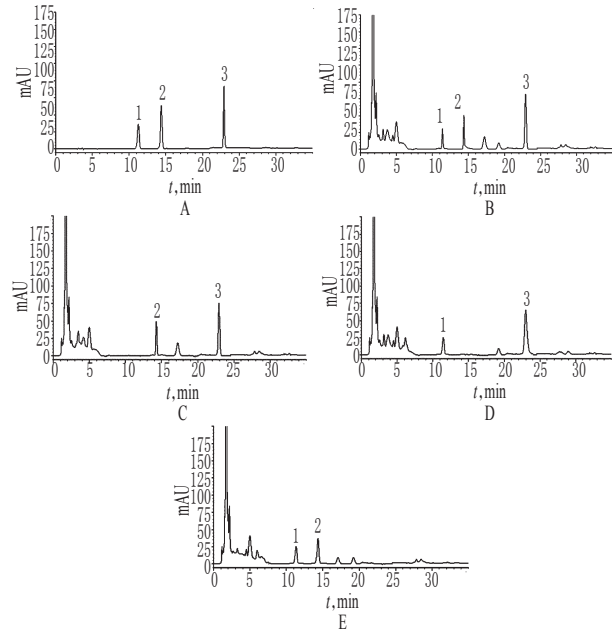


图1 高效液相色谱图

A.对照品; B.供试品; C.缺红花的阴性对照; D.缺葛根的阴性对照; E.缺丹参的阴性对照; 1.羟基红花黄色素A; 2.葛根素; 3.丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control without *Carthamus tinctorius*; D. negative control without *Pueraria lobata*; E. negative control without *Salvia miltiorrhiza*; 1. hydroxysafflor yellow A; 2. puerarin; 3. salvianolic acid B

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A峰面积的RSD分别为0.97%、1.56%、1.22%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20130923)适量,分别于放置0、2、4、6、8 h时进样测定,记录峰面积。结果,丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A峰面积的RSD分别为1.39%、1.03%、1.57%($n=5$),表明供试品溶液在8 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20130923)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A峰面积的RSD分别为1.30%、0.91%、1.28%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20130923)适量,共6份,分别加入一定质量的丹酚酸B、葛根素、羟基红花黄色素A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,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表2。

2.9 样品含量测定

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test(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,%
丹酚酸B	0.123 8	1.569 5	1.576 8	3.095 3	96.77	98.05	1.73
	0.125 2	1.587 3	1.576 8	3.128 2	97.72		
	0.124 3	1.575 9	1.576 8	3.112 9	97.48		
	0.123 5	1.565 7	1.576 8	3.156 4	100.88		
	0.126 1	1.598 7	1.576 8	3.117 0	96.29		
葛根素	0.123 2	1.561 9	1.576 8	3.125 2	99.14	99.07	1.15
	0.123 8	0.854 2	0.856 3	1.700 6	98.84		
	0.125 2	0.863 9	0.856 3	1.695 5	97.12		
	0.124 3	0.857 7	0.856 3	1.706 4	99.11		
	0.123 5	0.852 1	0.856 3	1.700 5	99.08		
羟基红花黄色素A	0.126 1	0.870 1	0.856 3	1.723 8	99.70	98.44	1.01
	0.123 2	0.850 1	0.856 3	1.711 3	100.57		
	0.123 8	0.213 6	0.213 3	0.424 9	99.06		
	0.125 2	0.216 0	0.213 3	0.426 0	98.45		
	0.124 3	0.214 5	0.213 3	0.421 6	97.09		
	0.123 5	0.213 1	0.213 3	0.426 3	99.95		
	0.126 1	0.217 6	0.213 3	0.427 3	98.31		
	0.123 2	0.212 6	0.213 3	0.421 2	97.80		

取12批样品各适量,分别按“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3。

表3 样品含量测定结果(n=3,mg/片)

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

厂家	样品批号	丹酚酸B	葛根素	羟基红花黄色素A
A	140426	3.551	1.715	0.218
	140223	2.922	1.523	0.206
	131227	3.170	1.678	0.258
B	20130729	5.566	2.885	0.762
	20130923	5.529	2.996	0.746
	20131120	5.711	2.904	0.739
C	140425-11	5.927	2.738	0.491
	140519-14	5.602	2.277	0.528
	140328 13	5.304	2.391	0.599
D	20140319	3.836	1.597	0.331
	20140409	3.351	1.432	0.304
	20131215	3.912	1.630	0.252

由表3可知,不同厂家不同批次的样品的3种成分含量均有所差异,表明制剂质量参差不齐,尤以羟基红花黄色素A的含量上差别较大,可能与标准中葛根素的含量限值定位偏低,丹酚酸B性质不太稳定致提取过程中易损失,而红花作为一种较贵重药材却在成药质量标准中较少被检测有关,所以很有必要对3种成分合理定量从而监管该药品的质量。

3 讨论

在提取溶剂的选择上,笔者根据3种成分的溶解性,笔者采用了30%乙醇、甲醇、50%甲醇、75%甲醇考察提取效果,结果以75%甲醇提取所得可更好地兼顾3种成分的含量,遂确定以75%甲醇为提取溶剂。因丹酚酸B对热不太稳定,故未采用回流而采用超声方式提取,试验发现超声提取25 min后,3种成分的含量无明显增加,所以将提取时间定在30 min。

在多成分同时检测中,很多采用波长转换的检测方式以期取得好的效果^[4-8],但本试验发现,采用丹酚酸B的最大吸收波长280 nm作为检测波长,其他两种成分亦吸收稳定,响应信号良好,线性范围满足试验需要,故最终舍弃了多波长检测转换而采用简便的单波长检测,更利于基层相关机构的检测工作开展。

参考文献

[1] 国家药品监督管理局.国家中成药标准汇编:中成药地方标准上升国家标准部分:内科:心系分册[S].2002:519.

[2] 陈珏蓓,马文彪,王月红.HPLC法测定心舒乐片中丹参酮Ⅱ_A、羟基红花黄色素A、苦杏仁苷[J].中成药,2012,34(3):490.

[3] 严红.HPLC法同时测定中药多种有效成分含量的应用[J].天津药学,2010,22(1):67.

[4] 厉瑶,郭正泰,龚行楚,等.丹参红花混煎液中丹参素、羟基红花黄色素A、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸B的HPLC测定方法[J].中国中药杂志,2013,38(11):1 653.

[5] 宋永贵,苏丹,耿璐璐,等.HPLC-DAD同时测定通达颗粒中4种活性成分的含量[J].中成药,2010,32(7):1 137.

[6] 李耿,孟繁蕴,杨洪军,等.UHPLC法同时测定脑心通胶囊中5个成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(3):414.

[7] 暴风伟,张振秋,刘玉强,等.波长切换HPLC法同时测定丹参中5种水溶性成分的含量[J],中国药房,2013,24(11):1 002.

[8] 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.

[9] 吕渭升,徐美丽,刘昌辉,等.双丹胶囊质量标准研究[J].中药新药与临床药理,2014,25(1):55.

[10] 王光忠,李桥,宋恬,等.HPLC法测定脑得生软胶囊中葛根素和羟基红花黄色素A的含量[J].中国药师,2009,12(6):699.

(收稿日期:2015-03-20 修回日期:2015-08-24)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,欢迎投稿、订阅