

HPLC法同时测定益心饮口服液中6种成分的含量

陈 力^{1,2*},高守红¹,熊筱娟²,朴淑娟¹,张 凤^{1#}(1.上海长征医院药学部,上海 200003;2.宜春学院化学与生物工程学院,江西 宜春 332000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)09-1272-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.09.38

摘要 目的:建立同时测定益心饮口服液中丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Sepax Sapphire-C₁₈,流动相为乙腈-0.2%甲酸(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为283 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A检测质量浓度线性范围为25.00~400.00、2.50~40.00、5.00~80.00、6.25~100.00、18.75~300.00、5.00~80.00 μg/ml($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为101.52%~102.24%、96.25%~99.25%、99.80%~101.80%、96.60%~100.00%、96.51%~99.77%、97.09%~102.00%,RSD分别为0.23%、1.06%、0.75%、1.29%、1.20%、1.91%($n=6$)。结论:该方法操作简单、准确性高、重复性好,可用于同时测定益心饮口服液中丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A的含量。
关键词 高效液相色谱法;益心饮口服液;丹参素钠;原儿茶醛;毛蕊异黄酮苷;甘草苷;丹酚酸B;丹酚酸A

Simultaneous Determination of the 6 Components in Yixinyin Oral Solution by HPLC

CHEN Li^{1,2}, GAO Shouhong¹, XIONG Xiaojuan², PIAO Shujuan¹, ZHANG Feng¹(1.Dept. of Pharmacy, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China; 2.College of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Jiangxi Yichun 332000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for contents determination of salvianic acid A sodium, protocatechualdehyde, calycosin-7-glycoside, liquiritin, salvianolic acid B and salvianolic acid A. METHODS: HPLC was performed on the column of Sepax Sapphire-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.2% formic acid (gradient elution) at a flow rate of 0.8 ml/min, the detection wavelength was 283 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 25.00-400.00 μg/ml for salvianic acid A sodium ($r=0.999\ 9$), 2.50-40.00 μg/ml for protocatechualdehyde ($r=0.999\ 9$), 5.00-80.00 μg/ml for calycosin-7-glycoside ($r=0.999\ 9$), 6.25-100.00 μg/ml for liquiritin ($r=0.999\ 9$), 18.75-300.00 μg/ml for salvianolic acid B ($r=0.999\ 8$) and 5.00-80.00 μg/ml for salvianolic acid A ($r=0.999\ 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 101.52%-102.24% (RSD=0.23%, $n=6$), 96.25%-99.25% (RSD=1.06%, $n=6$), 99.80%-101.80% (RSD=0.75%, $n=6$), 96.60%-100.00% (RSD=1.29%, $n=6$), 96.51%-99.77% (RSD=1.20%, $n=6$) and 97.09%-102.00% (RSD=1.91%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for simultaneous determination of salvianic acid A sodium, protocatechualdehyde, calycosin-7-glycoside, liquiritin, salvianolic acid B and salvianolic acid A in Yixinyin oral solution.
KEYWORDS HPLC; Yixinyin oral solution; Salvianic acid A sodium; Protocatechualdehyde; Calycosin-7-glycoside; Liquiritin; Salvianolic acid B; Salvianolic acid A

益心饮口服液为上海长征医院院内制剂,由黄芪、甘草、丹参、地黄、当归和黄连等15味药材经过加工炮制而成。临床可用于冠心病心绞痛、心肌炎、心律失常等疾病的治疗^[1]。丹参提取物具有增加心肌收缩力、扩张冠状动脉、增加心肌血流量和扩张外周血管、抗血栓等作用;甘草中的甘草苷抗氧化作用显著;黄芪中的毛蕊异黄酮苷具有抗心力衰竭、改善心肌功能和保护心脑血管系统的作用^[2-4]。目前,现有的质量标准仅对黄芪、甘草、当归、黄连进行薄层鉴别^[5],尚不能全面反映益心饮口服液中有效成分的含量。因此,笔者参考相关文献^[6],采用高效液相色谱(HPLC)法建立了同时测定益心饮口服液中丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B、丹酚酸A

含量的方法,以为益心饮口服液的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1311A型输液泵、G1329A型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1314B-VWD型紫外检测器、HPRV.B.0302化学工作站(美国Agilent公司);SKY 7200H型超声清洗仪(上海科超超声仪器有限公司);5810R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);CPA225D型十万分之一天平(德国Sartorius公司);WL-901型旋涡振荡混和器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 药品与试剂

益心饮口服液(上海长征医院自制,批号:131017、140620、140926);丹参素钠对照品(批号:110855-200809,纯度>98%)、原儿茶醛对照品(批号:110810-200506,纯度>98%)、丹酚酸B对照品(批号:111562-201212,纯度>98%)、甘草苷

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:021-60748767。
E-mail:chli0909@163.com
通信作者:主管药师,博士。研究方向:生药学和临床药学。电话:021-60748767。E-mail:fengzhangky@aliyun.com

对照品(批号:111610-201106,纯度>98%)均购自中国食品药品检定研究院;丹酚酸A对照品[鼎瑞化工(上海)有限公司,批号:SAA201207,纯度>98%];毛蕊异黄酮苷对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:O0313AS,纯度≥98%);甲醇和乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Sepax Sapphire-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%甲酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.8 ml/min;检测波长:283 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure		
时间,min	A,%	B,%
0	3	97
18	14	86
45	25	75
46	30	70
60	35	65

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A对照品适量,加30%甲醇制成每1 ml含丹参素钠0.80 mg、原儿茶醛0.08 mg、毛蕊异黄酮苷0.16 mg、甘草苷0.20 mg、丹酚酸B 0.60 mg和丹酚酸A 0.16 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取样品1 ml,置于5 ml量瓶中,加30%甲醇稀释至刻度,超声(功率:350 W,频率:53 kHz)处理5 min,冷却至室温(25 ℃),加30%甲醇稀释至刻度,涡旋30 s混匀,转移至离心管中,以半径为10 cm、14 000 r/min离心15 min,取上清液,经0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按益心饮口服液的配方比例制备不含甘草、黄芪、丹参的阴性对照样品,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

取“2.2”项下混合对照溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A与邻近峰均能达到基线分离,分离度均>1.5,理论板数按丹参素钠峰计>8 200。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液62.5、62.5、125.0、250.0、312.5、375.0、500.0 μl,分别置于2、1、1、1、1、1 ml量瓶中,加30%甲醇定容,摇匀,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见表2。

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equations and linear range			
待测成分	回归方程	线性范围,μg/ml	r
丹参素钠	y=7.766 6x+1.484 5	25.00~400.00	0.999 9
原儿茶醛	y=52.301x-1.628 9	2.50~40.00	0.999 9
毛蕊异黄酮苷	y=26.803x-0.494 6	5.00~80.00	0.999 9
甘草苷	y=16.786x-0.444 6	6.25~100.00	0.999 9
丹酚酸B	y=15.361x-30.069	18.75~300.00	0.999 8
丹酚酸A	y=37.281x-21.804	5.00~80.00	0.999 8

2.5 检测限和定量限考察

吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,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3:1时,得检测限(LOD);当信噪比为10:1时(LOQ),得定量限,结果见表3。

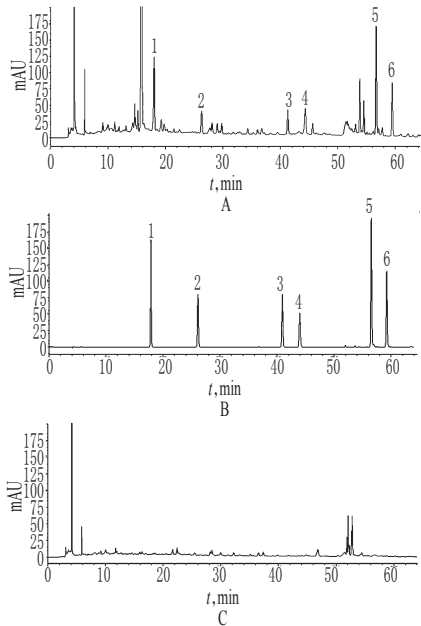


图1 高效液相色谱图

A.混合对照;B.供试品;C.阴性对照;1.丹参素钠;2.原儿茶醛;3.毛蕊异黄酮苷;4.甘草苷;5.丹酚酸B;6.丹酚酸A

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substances;B.test samples;C.negative control;1.salvi-anic acid A sodium;2.protocatechualdehyde;3.calycosin-7-glycoside;4. liquiritin;5.salvianolic acid B;6.salvianolic acid A

表3 检测限和定量限测定结果

Tab 3 Determination results of detection limit and quantitation limit

待测成分	LOD,μg/ml	LOQ,μg/ml
丹参素钠	0.10	0.50
原儿茶醛	0.05	0.20
毛蕊异黄酮苷	0.25	1.00
甘草苷	0.50	2.00
丹酚酸B	0.25	1.00
丹酚酸A	0.20	0.50

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液250 μl,置于1 ml量瓶中,加30%甲醇稀释至刻度,摇匀,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、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A峰面积的RSD分别为0.13%、0.11%、0.07%、0.12%、0.11%、1.09%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取样品(批号:131017)适量,分别于放置0、4、6、8、12、24 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、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A峰面积的RSD分别为0.85%、1.27%、1.02%、1.81%、1.19%、1.48%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:131017)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,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、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A的平均含量分别为198.55、8.38、21.16、37.80、

108.82、22.19 μg/ml, RSD 分别为 0.66%、1.63%、0.95%、0.98%、0.65%、1.12% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

分别精密吸取已知含量的样品(批号:131017)1 ml,共6份,精密加入丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B、丹酚酸A对照品适量,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	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	0.977 7	1.000 0	2.000 1	102.24	101.92	0.23
	0.980 5	1.000 0	1.995 7	101.52		
	0.975 4	1.000 0	1.995 1	101.97		
	0.980 5	1.000 0	2.000 6	102.01		
	0.981 1	1.000 0	2.000 5	101.94		
原儿茶醛	0.979 3	1.000 0	1.997 8	101.85	98.00	1.06
	0.042 8	0.040 0	0.081 8	97.50		
	0.040 6	0.040 0	0.080 0	98.50		
	0.041 4	0.040 0	0.080 6	98.00		
	0.040 5	0.040 0	0.079 9	98.50		
毛蕊异黄酮苷	0.044 0	0.040 0	0.082 5	96.25	100.60	0.75
	0.041 9	0.040 0	0.081 6	99.25		
	0.105 0	0.100 0	0.206 8	101.80		
	0.107 3	0.100 0	0.208 5	101.20		
	0.106 9	0.100 0	0.206 9	100.00		
甘草苷	0.105 8	0.100 0	0.206 2	100.40	98.59	1.29
	0.106 3	0.100 0	0.206 1	99.80		
	0.105 6	0.100 0	0.206 0	100.40		
	0.189 8	0.200 0	0.383 0	96.60		
	0.188 5	0.200 0	0.385 5	98.50		
丹酚酸B	0.185 1	0.200 0	0.385 0	99.95	98.49	1.20
	0.190 1	0.200 0	0.386 5	98.20		
	0.188 5	0.200 0	0.385 1	98.30		
	0.185 7	0.200 0	0.385 7	100.00		
	0.535 1	0.525 0	1.056 1	99.24		
丹酚酸A	0.535 1	0.525 0	1.058 9	99.77	100.68	1.91
	0.540 1	0.525 0	1.060 6	99.14		
	0.539 4	0.525 0	1.053 0	97.83		
	0.539 6	0.525 0	1.046 3	96.51		
	0.540 1	0.525 0	1.056 9	98.44		

2.10 样品含量测定

分别取3批样品适量,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并计算样品含量,结果见表5。

3 讨论

3.1 测定成分的选择

在益心饮口服液处方中,黄芪(药材质量百分比约26.55%)、炙甘草(药材质量百分比约13.27%)、丹参(药材质量百分比约13.27%)为主药,丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B和丹酚酸A为上述药材的有效活性成分,考虑到该制剂是采用传统水煎方法制得,因此本研究选择上

述6种水溶性化合物作为待测成分。

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/ml)

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

待测成分	样品批号		
	131017	140620	140926
丹参素钠	0.994 2	1.034 5	1.131 7
原儿茶醛	0.043 1	0.044 2	0.049 5
毛蕊异黄酮苷	0.108 7	0.112 3	0.123 1
甘草苷	0.196 8	0.202 6	0.225 0
丹酚酸B	0.543 3	0.544 8	0.597 1
丹酚酸A	0.111 0	0.118 7	0.130 8

3.2 提取条件的考察

笔者参考相关文献^[1],前处理方法考察了稀释法和萃取法。稀释法分别考察了甲醇、甲醇(10%、30%、50%、70%)-水溶液与纯水作为稀释溶剂,发现30%甲醇-水溶液稀释后效果较好,随后又考察了稀释倍数(2、5、10倍),发现将益心饮口服液稀释5倍后,目标峰响应好,分离度高。采取二氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和正丁醇作为萃取剂进行萃取,将萃取物蒸干后加30%甲醇复溶,并用复溶物过滤后的续滤液进行分析。结果,采用萃取虽然能够减少杂质峰,但待测的6种成分不能全部被测出。综合分析,直接稀释法操作简单且30%甲醇-水溶液稀释后效果较好,故最终选择了30%甲醇-水溶液作为稀释溶剂。

3.3 色谱柱的选择

笔者分别考察了Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、DIKMA Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Sepax Sapphire-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)3个不同品牌的色谱柱,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果发现,Agilent ZORBAXSB-C₁₈对部分待测成分(丹参素钠、丹酚酸B)不能达到有效分离(分离度<1.5);DIKMA Diamonsil C₁₈则需要更长的分析时间;仅Sepax Sapphire-C₁₈可使所测的各成分峰形良好,与邻近杂质峰能达到较好的基线分离,且分析时间恰当。因此,选用Sepax Sapphire-C₁₈为本试验的色谱柱。

综上所述,本方法操作简便、准确性高、重复性好,可用于益心饮口服液中丹参素钠、原儿茶醛、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、丹酚酸B、丹酚酸A的含量测定。

参考文献

[1] 龙卫平,陈剑,何汉康,等.益心饮治疗冠状动脉慢血流的临床研究[J].环球中医药,2010,3(4):286.
[2] 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,2015:76、86、124.
[3] 王元,瞿彩云,彭雪晶.甘草及其衍生物药理作用的研究新进展[J].甘肃医药,2011,30(7):398.
[4] 全欣.黄芪主要活性成分的药理作用[J].时珍国医国药,2011,22(5):1 246.
[5] 林厚文,沈阳,沈利民,等.益心饮口服液薄层色谱鉴别研究[J].时珍国医国药,2001,12(5):421.
[6] Li LL, Hou S, Zheng TT, et al. Simultaneous Determination of Five Hydrophilic and Lipophilic Components from roots of Salvia miltiorrhiza by HPLC[J]. CHM, 2015, 7 (1):75.

(收稿日期:2015-08-19 修回日期:2015-12-29)
(编辑:刘 柳)