

HPLC法测定复方降脂颗粒中丹酚酸B和大黄酚的含量

胡长明^{1*}, 陈树和^{2#a}, 邵晓虹¹, 窦智¹, 叶晓川^{1,3#b}, 刘焱文^{1,3}(1.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2.湖北省中医院, 武汉 430061; 3.湖北中医药大学中药资源与中药化学省级重点实验室/湖北省中药资源与中药化学省级重点实验室, 武汉 430061)

中图分类号 R283.62⁷; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1403-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.19

摘要 目的: 建立测定复方降脂颗粒中丹酚酸B和大黄酚含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相分别为甲醇-乙腈-0.1%甲酸溶液(25:10:65, V/V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 检测波长分别为286、284 nm。结果: 丹酚酸B和大黄酚的进样量分别在1.91~19.12、0.014 4~0.144 0 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*分别为0.999 8、0.999 9); 二者精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%; 平均加样回收率分别为98.58%(RSD=0.97%, *n*=9)、97.71%(RSD=0.59%, *n*=9)。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 可用于复方降脂颗粒的质量控制。

关键词 复方降脂颗粒; 丹酚酸B; 大黄酚; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Salviamolic Acid B and Chrysophanol in Compound Jiangzhi Granules by HPLC

HU Chang-ming¹, CHEN Shu-he², SHAO Xiao-hong¹, DOU Zhi¹, YE Xiao-chuan^{1,3}, LIU Yan-wen^{1,3}(1.College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China; 2.Hubei Hospital of TCM, Wuhan 430061, China; 3.Provincial Key Laboratory of Resources Science and Chemistry of TCM, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of salviamolic acid B and chrysophanol in Compound jiangzhi granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.1% formic acid (25:10:65, V/V/V) for salviamolic acid B and acetonitrile-0.1% phosphoric acid for chrysophanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength were 286 nm for salviamolic acid B and 284 nm for chrysophanol. RESULTS: The linear ranges were 1.91-19.12 μg for salviamolic acid B (*r*=0.999 8) and 0.014 4-0.144 0 μg for chrysophanol (*r*=0.999 9); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2% with an average recovery of 98.58%(RSD=0.97%, *n*=9) and 97.71%(RSD=0.59%, *n*=9). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for quality control of Compound jiangzhi granules.

KEYWORDS Compound jiangzhi granules; Salviamolic acid B; Chrysophanol; HPLC; Content determination

复方降脂颗粒处方源于湖北省中医院国家肝病治疗中心临床有效经验方, 由丹参、决明子等中药组成, 并采用传统水煎煮工艺制备而成, 临床主要用于治疗湿浊内停、肝郁血瘀所致非酒精性脂肪性肝炎。方中丹参为君药, 丹酚酸B为其主要有效成分之一, 具有抗肝纤维化、抗氧化、保护心肌、抗肿瘤等多种药理活性^[1-3]; 决明子为臣药, 大黄酚为其主要成分之一, 具有保肝、利胆、降血压、降血脂的作用^[4-7]。为了有效控制该制剂的质量, 本试验采用高效液相色谱(HPLC)法测定复方降脂颗粒中丹酚酸B、大黄酚的含量, 旨在为该制剂的质量控制

提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪系统(美国Agilent公司); SK250HP型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); BP211D型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

复方降脂颗粒(湖北省中医院制剂室自制, 批号: 120529、120601、120605); 丹酚酸B、大黄酚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为111562-200403、111562-200403); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸B的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.1%甲酸溶液(25:10:65, V/V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 286 nm; 柱温: 30 ℃; 进样

* 硕士研究生。研究方向: 中药及其制剂的物质基础。E-mail: angiecmhu@126.com

#a 通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 中药物质基础和医院制剂。电话: 027-88929176。E-mail: chenshuhe606@163.com

#b 通信作者: 研究员, 硕士研究生导师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及质量评价。电话: 027-88920834。E-mail: yxxcc1965@163.com

量:10 μ l。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取约1.0 g,精密称定,精密加入50%甲醇20 ml,称定质量,超声处理(频率:53 kHz,功率:250 W)30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 取丹酚酸B对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成每1 ml含0.956 mg的溶液,即得。

2.1.4 缺丹参阴性对照溶液的制备 取本品处方中缺丹参的其余药材,按本品制法制成阴性样品,再按“2.1.2”项下方法制备缺丹参的阴性对照溶液。

2.1.5 系统适用性试验 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μ l,按上述色谱条件进样测定。结果显示,供试品色谱在与对照品色谱相应保留时间处有相同色谱峰出现,阴性对照色谱无相应色谱峰,表明阴性对照不干扰样品测定。目标峰与相邻色谱峰的分离度均 >1.5 ;理论板数按丹酚酸B色谱峰计算应不低于2 000。丹酚酸B含量测定的HPLC图见图1。

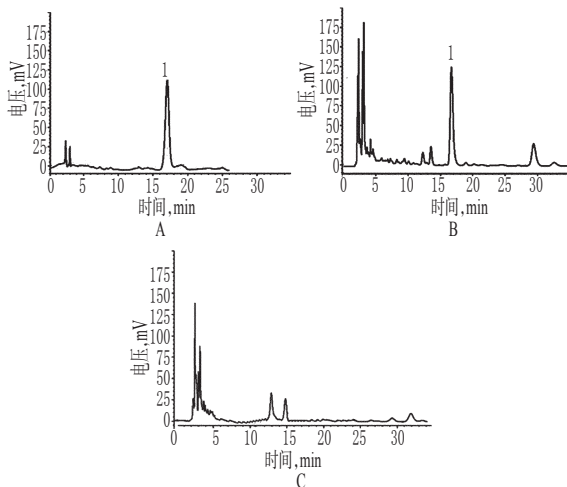


图1 丹酚酸B含量测定的HPLC图

A.丹酚酸B对照品;B.供试品;C.缺丹参的阴性对照;1.丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms of salviamolic acid B

A.salviamolic acid B control; B. test sample; C. negative control without *Salvia miltiorrhiza*; 1.salviamolic acid B

2.1.6 线性关系考察 精密吸取丹酚酸B对照品溶液2、4、6、8、10、20 μ l,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以丹酚酸B的进样量(x, μ g)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=387.550x+62.482$ ($r=0.9998, n=6$)。结果表明,丹酚酸B的进样量在1.91~19.12 μ g范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 精密吸取丹酚酸B对照品溶液10 μ l,重复进样5次,按上述色谱条件测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=1.10%$ ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于0、1、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=1.45%$ ($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 取同一批样品适量,共6份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标两点法计算样品中丹酚酸B的含量。

结果显示,每1 g样品平均含丹酚酸B 16.69 mg, $RSD=1.09%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品适量(约0.25 g),共9份,每3份为一组,分别精密加入样品中丹酚酸B含量80%、100%、120%对应的丹酚酸B对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 丹酚酸B的加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests of salviamolic acid B($n=9$)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	4.1775	3.3360	7.5121	99.96		
2	4.1704	3.3360	7.4889	99.48		
3	4.1793	3.3360	7.4396	97.73		
4	4.1725	4.1700	8.2734	98.34		
5	4.1733	4.1700	8.2720	98.29	98.58	0.97
6	4.1767	4.1700	8.3248	99.47		
7	4.1785	5.0040	9.1358	99.07		
8	4.1786	5.0040	9.0395	97.14		
9	4.1771	5.0040	9.0700	97.78		

2.1.11 样品含量测定 取3批复方降脂颗粒各适量,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标两点法计算样品中丹酚酸B的含量,每批样品平行测定3次,结果见表2。

表2 样品中丹酚酸B、大黄酚的含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of salviamolic acid B and chrysophanol ($n=3$)

批号	丹酚酸B		大黄酚	
	含量,mg/g	RSD,%	含量, μ g/g	RSD,%
120529	16.70	0.97	3.14	1.22
120601	16.76	1.02	3.26	1.19
120605	16.65	1.23	3.15	1.25

2.2 大黄酚的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)^[8],梯度洗脱(0~15 min, 40% A; >15~30 min, 40% A \rightarrow 90% A; >30~40 min, 90% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:284 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取约9.0 g,精密称定,精密加入70%乙醇100 ml,称定质量,置水浴中加热回流30 min,放冷,再次称定,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液50 ml,蒸干,残渣加10%盐酸30 ml使溶解,置水浴中加热水解1 h,立即冷却,用三氯甲烷振摇提取4次,每次30 ml,合并三氯甲烷液,回收溶剂至干,残渣用无水乙醇-乙酸乙酯(2:1, V/V)溶解、转移至10 ml量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 取大黄酚对照品适量,精密称定,加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1, V/V)混合液制成每1 ml含大黄酚72 μ g的溶液,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液1 ml,转移至10 ml量瓶中,以无水乙醇-乙酸乙酯(2:1, V/V)定容,摇匀,即得对照品溶液(每1 ml含大黄酚7.2 μ g)。

2.2.4 缺决明子阴性对照溶液的制备 取本品处方中缺决明子的其余药材,按本品制法制成阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备缺决明子的阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供

试品溶液、阴性对照溶液各 10 μl ,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示,供试品色谱在与对照品色谱相应保留时间处有相同色谱峰出现,阴性对照色谱无相应色谱峰,表明阴性对照不干扰样品测定。目标峰与相邻色谱峰的分度度均 > 2.0;理论板数按大黄酚色谱峰计算应不低于 3 000。大黄酚含量测定的 HPLC 图见图 2。

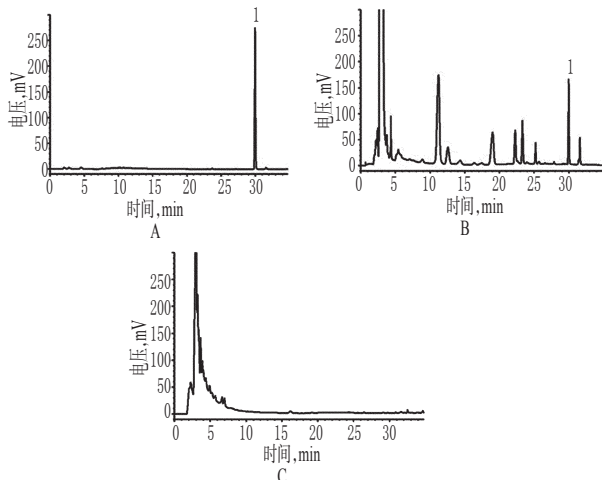


图2 大黄酚含量测定的 HPLC 图

A. 大黄酚对照品; B. 供试品; C. 决明子的阴性对照; 1. 大黄酚

Fig 2 HPLC chromatograms of chrysophanol

A. chrysophanol control; B. test sample; C. negative control without Cassia Semen; 1. chrysophanol

2.2.6 线性关系考察 精密吸取大黄酚对照品溶液 2、4、6、8、10、20 μl ,注入液相色谱仪,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以大黄酚的进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=1\ 794.200\ 0x+0.633\ 1$ ($r=0.999\ 9, n=6$)。结果表明,大黄酚的进样量在 0.014 4~0.144 0 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.2.7 精密性试验 精密吸取大黄酚对照品溶液 10 μl ,重复进样 5 次,按“2.2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.48\%$ ($n=5$),表明仪器精密性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.47\%$ ($n=7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取同一批样品适量,共 6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标两点法计算样品中大黄酚的含量。结果显示,每 1 g 样品平均含大黄酚 3.17 μg , $RSD=1.60\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品适量,共 9 份,每 3 份为一组,分别精密加入样品中大黄酚含量 80%、100%、120% 对应的大黄酚对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表 3。

2.2.11 样品含量测定 取 3 批复方降脂颗粒各适量,分别按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标两点法计算样品中大黄酚的含量,每批样品平行测定 3 次,结果见表 2。

表3 大黄酚的加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 3 Results of recovery tests of chrysophanol($n=9$)

编号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	28.620 3	22.800 0	50.781 4	97.20		
2	28.561 2	22.800 0	50.710 2	97.14		
3	28.450 4	22.800 0	50.844 9	98.22		
4	28.553 7	28.500 0	56.213 0	97.05		
5	28.535 8	28.500 0	56.643 3	98.62	97.71	0.59
6	28.513 6	28.500 0	56.537 6	98.33		
7	28.521 9	34.200 0	61.842 9	97.43		
8	28.510 7	34.200 0	61.993 7	97.90		
9	28.557 8	34.200 0	61.889 2	97.46		

3 讨论

3.1 丹酚酸 B、大黄酚提取条件的考察

本试验比较了不同提取方法(冷浸、热提、超声^[9]法)、不同提取溶剂(水、甲醇、50%甲醇)及不同提取时间(15、30、45、60 min)下丹酚酸 B 的含量,结果表明,以 50% 甲醇超声提取 30 min 即可将丹酚酸 B 提取完全。

试验亦对大黄酚的提取方法、提取溶剂、提取时间、加入酸的体积分数和加入量进行了考察,发现以 70% 乙醇作为提取溶剂,水浴加热回流提取 30 min 即可提取完全;加入盐酸的体积分数为 10%,且 10% 盐酸与药液的体积比为 3:5 比较合适。

3.2 丹酚酸 B 的稳定性探讨

试验过程中发现, pH、光线等对丹酚酸 B 的稳定性具有一定影响。因此,笔者将样品低温避光保存,检测过程中采用具有合适 pH 值范围的流动相,均可提高丹酚酸 B 的稳定性。

综上所述,本方法简单、准确、重复性好,可用于复方降脂颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 赵娜,郭治昕,赵雪,等.丹参的化学成分与药理作用[J].国外医药:植物药分册,2007,22(4):155.
- [2] 徐丽君,黄光英.丹参的化学成分及其药理作用研究概述[J].中西医结合研究,2009,2(1):45.
- [3] 张志云,王芳.丹参为主的中药复方治疗脂肪肝研究进展[J].中西医结合肝病杂志,2009,19(2):126.
- [4] 焦素芳,韩海东.决明子的化学成分与药理作用[J].临床合理用药杂志,2010,3(4):81.
- [5] 刘斌,巩鸿霞,肖学凤,等.决明子化学成分及药理作用研究进展[J].药物评价研究,2010,33(4):312.
- [6] 郭全华.近年来决明子的药理药化临床研究进展[J].中国中医药信息杂志,1999,6(12):23.
- [7] 尹音,王峰,徐向阳.丹酚酸 B 研究进展[J].中国药师,2007,10(10):1 034.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:136.
- [9] 张凤芹,龚伟,曲雷鸣.HPLC 法测定前列康欣颗粒中丹酚酸 B 的含量[J].中国药房,2009,20(33):2 614.

(收稿日期:2013-10-24 修回日期:2014-01-20)