

HPLC法同时测定双丹颗粒中3种成分的含量

南海军^{1*}, 谭玉彬², 梁生旺¹, 龚梦鹃¹, 韩亮^{3#}(1.广东药学院中药学院, 广州 510006; 2.南方医科大学附属何贤纪念医院, 广州 511400; 3.广东药学院科技产业与社会服务处, 广州 510006)

中图分类号 R283.627; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2154-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.17

摘要 目的: 建立同时测定双丹颗粒中丹酚酸B、丹参酮II_A、丹皮酚含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-甲酸(甲酸8.3 ml→500 ml)水溶液(30:7:63, V/V/V), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为286 nm, 柱温为30 ℃。结果: 丹酚酸B、丹参酮II_A、丹皮酚的进样量分别在0.414~4.140、0.064~0.640、0.228~2.280 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 7、0.999 8); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%; 平均加样回收率分别为97.35% (RSD=1.19%, *n*=6)、97.56% (RSD=1.86%, *n*=6)、96.86% (RSD=1.67%, *n*=6)。结论: 该方法简单、可靠、专属性强, 可作为双丹颗粒的质量控制方法。

关键词 双丹颗粒; 丹酚酸B; 丹参酮II_A; 丹皮酚; 含量测定; 高效液相色谱法

Content Determination of 3 Components in Shuangdan Particles by HPLC

NAN Hai-jun¹, TAN Yu-bin², LIANG Sheng-wang¹, GONG Meng-juan¹, HAN Liang³(1.School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2.Hexian Memorial Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 511400, China; 3.Scientific Research and Social Service Office, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of salvianolic acid B, tanshinone II_A and paeonol in Shuangdan particles. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-formic acid (8.3 ml→500 ml) solution (30:7:63, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 286 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of salvianolic acid B, tanshinone II_A and paeonol were 0.414-4.140 μg (*r*=0.999 8), 0.064-0.640 μg (*r*=0.999 7) and 0.228-2.280 μg (*r*=0.999 8). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The average recoveries were 97.35% (RSD=1.19%, *n*=6), 97.56% (RSD=1.86%, *n*=6) and 96.86% (RSD=1.67%, *n*=6). CONCLUSIONS: The method is simple, reliable and specific. It can be used for quality control of Shuangdan particles.

KEYWORDS Shuangdan particles; Salvianolic acid B; Tanshinone II_A; Paeonol; Content determination; HPLC

双丹颗粒是由丹参、牡丹皮经现代提取工艺制备的新型中药复方制剂, 具有活血化瘀、通脉镇痛之功效, 用于淤血痹阻所致的胸痹等症的治疗, 处方中丹酚酸B、丹参酮II_A、丹参

素、丹皮酚等为其主要有效成分^[1-2]。文献报道, 双丹颗粒目前多采用高效液相色谱(HPLC)法测定单一组分或多组分的含量进行质量控制, 如李正国等^[3]采用HPLC同时测定双丹颗粒

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志: 第52卷第2册[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 75.
- [2] 江苏新医学院. 中药大词典: 上册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 531.
- [3] 清·刘善述. 草木便方[M]. 重庆: 重庆出版社, 1988: 122.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 128.
- [5] 《四川中药志》协作编写组. 四川中药志: 第1卷[M]. 成都: 四川人民出版社, 1980: 64.
- [6] 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: 附录34、附录52、附录53、附录62.
- [7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第5册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 596.
- [8] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 第2册[M]. 北京: 科学出版社, 1972: 975.
- [9] 罗伦才, 季小平, 张仲林, 等. 水甲痔血胶囊毒理作用研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(19): 157.
- [10] 广州市药品检验所. 农村中草药制剂技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 456.

(收稿日期: 2014-02-27 修回日期: 2014-04-13)

* 讲师, 硕士。研究方向: 药物分析、色谱分析。电话: 020-39352180。E-mail: gdpuetm@gmail.com

通信作者: 助理研究员, 博士。研究方向: 临床药理与药物代谢学。电话: 020-39352691。E-mail: hanliang72@126.com

中丹参素和原儿茶醛的含量,葛志伟等^[4]同时测定双丹颗粒中的丹酚酸B和芍药苷含量。本研究以丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、丹皮酚为质量控制指标,参考相关文献^[5-10],采用HPLC法同时测定三者在双丹颗粒中的含量,并进行方法学考察,为改进和提高双丹颗粒的质量控制标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Dionex HPLC系统,包括P680 HPLC泵、ASI-100自动进样器、TCC-100柱温箱、PDA-100紫外检测器、Chromleon色谱工作站(美国戴安公司);AUW220D型十万分之一分析天平(日本岛津公司);DL-360A超声波清洗器(上海之信仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

丹酚酸B对照品、丹参酮Ⅱ_A对照品和丹皮酚对照品均购于中国药品生物制品检定所(批号分别为111562-201009、111248-201105和110708-200506);双丹颗粒购自山东孔圣堂制药有限公司,批号为120203、120204、120301;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)购于北京迪马科技公司;甲醇(分析纯)、乙腈(分析纯)、甲酸(分析纯)购于广州东巨实验仪器有限公司;怡宝饮用纯净水(华润怡宝食品饮料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:甲醇-乙腈-甲酸(甲酸8.3 ml→500.0 ml)水溶液(30:7:63, V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:286 nm;进样量:10 μl。理论板数以丹酚酸B计不得小于5 000,待测组分与其他峰的分度应良好。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 丹酚酸B对照品溶液 精密称取丹酚酸B对照品10.48 mg,置10 ml容量瓶中,加体积分数75%甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,制成丹酚酸B对照品溶液(1.048 mg/ml)。

2.2.2 丹参酮Ⅱ_A对照品溶液 精密称取丹参酮Ⅱ_A对照品14.92 mg,置10 ml容量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,制成丹参酮Ⅱ_A对照品溶液(1.492 mg/ml)。

2.2.3 丹皮酚对照品溶液 精密称取丹皮酚对照品11.48 mg,置10 ml容量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,制成丹皮酚对照品溶液(1.148 mg/ml)。

2.2.4 供试品溶液 取双丹颗粒适量,于干燥环境下快速研细,约取650 mg置50 ml具塞三角瓶中,精密称定后加体积分数75%甲醇20 ml,称质量,超声处理(功率:250 W,频率:33 kHz)30 min,放冷,用75%甲醇补足减失质量,摇匀,静置,取上清液用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.5 阴性对照溶液 按处方比例分别配制缺丹参、牡丹皮的阴性空白样品,按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 测定法

吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”所述色谱条件进样分析。结果,各被测组分与其他组分均达到基线分离,分离度R>1.5,丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、丹皮酚保留时间分别约为17、30、36 min,阴性对照均无干扰,见图1。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取丹酚酸B(212 μg/ml)、丹参酮Ⅱ_A(32 μg/ml)、丹皮酚对照品溶液(114 μg/ml)2、6、10、12、16、20 μl,注入液相

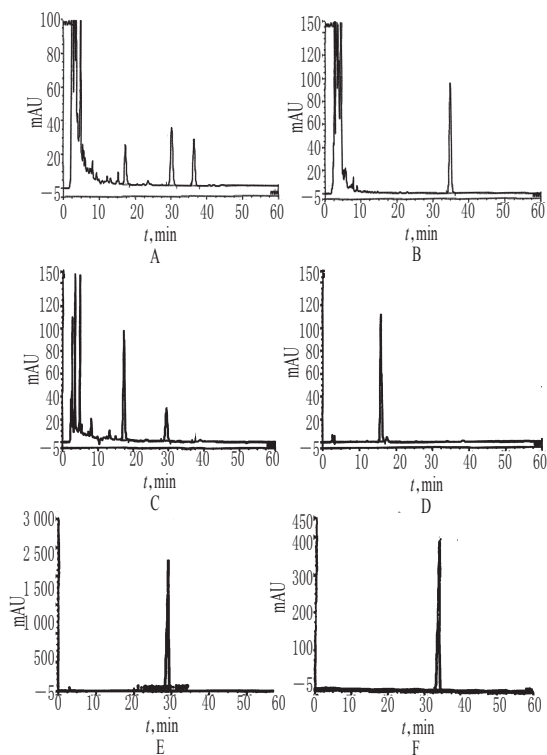


图1 高效液相色谱图

A. 供试品; B. 丹参阴性对照; C. 牡丹皮阴性对照; D. 丹酚酸B对照品; E. 丹参酮Ⅱ_A对照品; F. 丹皮酚对照品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test sample; B. *S. miltiorrhiza* negative control; C. bark of *Paeonia suffruticosa* negative control; D. salvianolic acid B control; E. tanshinone II_A control; F. paeonol control

色谱仪,以峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品质量(x, μg)为横坐标进行线性回归,得下述方程:丹酚酸B: $y=6.382x+0.018$, $r=0.9998$;丹参酮Ⅱ_A: $y=77.914x-0.035$, $r=0.9997$;丹皮酚: $y=15.207x+0.235$, $r=0.9998$ 。结果表明,丹酚酸B在0.414~4.14 μg、丹参酮Ⅱ_A在0.064~0.640 μg、丹皮酚在0.228~2.280 μg范围内均呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

分别精密吸取丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、丹皮酚对照液各10 μl,重复进样6次,测得丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、丹皮酚的RSD分别为0.48%、1.07%、1.35%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取批号为120203的双丹颗粒供试品溶液10 μl,每间隔4 h进样1次,共进样6次。结果,丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、丹皮酚的RSD分别为2.15%、1.78%、1.63%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 重复性试验

取批号为120203的双丹颗粒样品,精密称取6份,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,依法测定。结果,丹酚酸B的平均质量分数为0.652%,RSD=1.88%;丹参酮Ⅱ_A的平均质量分数为0.098%,RSD=2.060%;丹皮酚的平均质量分数为0.354%,RSD=1.93%。以上结果表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取批号为120203的双丹颗粒样品6份,每份约0.32 g,分别置于20 ml量瓶中,精密称定,分别加入适量对照品溶液,按

“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,测定含量,并计算回收率,结果见表1~表3。

表1 丹酚酸B的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test of salvianolic acid B(n=6)

序号	称样量,mg	样品含量,mg	对照品加入量,mg	实测量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	325.18	2.120	2.096	4.098	94.43		
2	319.65	2.084	2.096	4.046	93.57		
3	321.28	2.095	2.096	4.083	94.84	94.72	1.19
4	338.14	2.205	2.096	4.157	93.46		
5	319.05	2.080	2.096	4.092	95.96		
6	322.71	2.104	2.096	4.118	96.10		

表2 丹参酮II_A的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test of tanshinone II_A(n=6)

序号	称样量,mg	样品含量,mg	对照品加入量,mg	实测量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	325.18	0.319	0.298	0.603	96.55		
2	319.65	0.313	0.298	0.587	92.33		
3	321.28	0.315	0.298	0.601	96.19	95.44	1.86
4	338.14	0.331	0.298	0.613	95.17		
5	319.05	0.313	0.298	0.603	97.44		
6	322.71	0.316	0.298	0.598	94.94		

表3 丹皮酚的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery test of paeonol(n=6)

序号	称样量,mg	样品含量,mg	对照品加入量,mg	实测量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	325.18	1.151	1.148	2.221	93.22		
2	319.65	1.132	1.148	2.181	91.25		
3	321.28	1.137	1.148	2.237	95.78	93.72	1.67
4	338.14	1.197	1.148	2.285	94.99		
5	319.05	1.129	1.148	2.204	93.53		
6	322.71	1.142	1.148	2.216	93.52		

结果表明,待测组分的平均加样回收率在93.72%~95.44%之间,加样回收率良好。

2.9 样品含量测定

取不同批号本品适量,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,精密量取续滤液和对照品溶液各10 μl,注入液相色谱仪测定,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(mg/g,n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples(mg/g,n=3)

批号	丹酚酸B	丹参酮II _A	丹皮酚
120203	6.57	1.05	3.48
120204	6.49	0.98	3.36
120301	6.42	1.12	3.44

3 讨论

3.1 流动相的选择

试验过程中先后采用了甲醇-水(65:35,V/V)、甲醇-0.1%冰醋酸(10:90,V/V)、甲醇-乙腈-甲酸(甲酸8.3 ml→500 ml)水溶液(30:7:63,V/V/V)等度系统。但是,甲醇-水(65:35)拖尾现象较严重,甲醇-0.1%冰醋酸(10:90)分离度太小,故最终确定以甲醇-乙腈-甲酸(甲酸8.3 ml→500 ml)水溶液(30:7:63,V/V/V)等度洗脱为流动相测定。

3.2 检测波长的选择

根据相关文献报道及3种待测组分紫外吸收情况,选择在286 nm波长处检测。在此波长下,样品中3种待测组分吸收强度相差较小,阴性干扰小,符合方法学的要求。

本研究采用HPLC法,选择制剂处方中各味药材的主要有效成分作为待测成分,建立了可靠、准确、专属性强的多组分同时测定方法,为该制剂的质量控制提供了依据。

参考文献

- [1] 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,2009,1(1):45.
- [2] 李方军.牡丹皮化学成分及药理作用研究进展[J].安徽医药,2004,8(1):9.
- [3] 李正国,郭凡岭,张爱岑.RP-HPLC法测定双丹颗粒中丹参素和原儿茶醛含量[J].药物分析杂志,2004,24(5):558.
- [4] 葛志伟,贺庆,水文波,等.HPLC测定双丹颗粒中丹酚酸B和芍药苷的含量[J].中国中药杂志,2006,31(13):1062.
- [5] 江莉华,徐天生,陈兴兴,等.高效液相色谱测定丹参中丹酚酸B含量的方法研究[J].时珍国医国药,2007,18(6):1395.
- [6] 赵鸣舒,赵希贤.双波长高效液相色谱法测定丹参中多种成分的含量[J].中国药事,2010,24(8):804.
- [7] 李骅,杨倩,王四旺,等.高效液相色谱法测定双丹胶囊中丹皮酚的含量[J].解放军药学学报,2011,27(3):251.
- [8] 邱丽丽,容蓉,蒋海强,等.高效液相色谱法同时测定丹参提取物中4种成分的含量[J].分析实验室,2009,28(1):23.
- [9] 陈钢,牧磊,张晓,等.三七总皂苷多成分经鼓室给药的体内分布及药代动力学研究[J].中国中药杂志,2011,36(13):1815.
- [10] 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):1002.

(收稿日期:2013-12-09 修回日期:2014-04-15)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅