

HPLC 法同时测定心可舒丸中丹参素、原儿茶醛及葛根素

吴 锋¹, 鲁建丽¹, 豆久锋¹, 陈宗良²

1. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003

2. 金华市食品药品检验所, 浙江 金华 321000

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定心可舒丸中丹参素、原儿茶醛及葛根素的方法。方法 采用 HPLC 法测定, 色谱柱为 Agilent Exlipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.3%磷酸溶液 (12:88) 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 269 nm。结果 丹参素在 0.013~0.254 μg ($r=0.9994$), 原儿茶醛在 0.021~0.414 μg ($r=0.9998$), 葛根素在 0.100~2.000 μg ($r=0.9999$) 与峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 98.18%、97.39%、98.06% ($n=6$), RSD 分别为 0.9%、1.1%、1.4% ($n=6$)。结论 本方法分析时间短且重复性和稳定性较好, 可降低工作量, 减少检验成本, 为更好地控制心可舒丸的质量提供依据。

关键词: 心可舒丸; 丹参素; 原儿茶醛; 葛根素; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1770-03

Simultaneous determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, and puerarin in Xinkeshu Pills by HPLC

WU Feng¹, LU Jian-li¹, DOU Jiu-feng¹, CHEN Zong-liang²

1. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

2. Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua 321000, China

Key words: Xinkeshu Pills; danshensu; protocatechuic aldehyde; puerarin; HPLC

心可舒丸由丹参、葛根、三七、山楂、木香 5 味中药组成。该处方以丹参活血化瘀为君, 其中所含有的丹参酚酸类成分丹参素、原儿茶醛是抗心肌缺血和增加冠状动脉血流量的活性成分; 葛根、三七活血通脉为臣, 葛根素是葛根中的主要活性成分, 具有提高免疫力、增强心肌收缩力、保护心肌细胞、降低血压、抗血小板聚集等作用; 山楂活血导滞为佐; 木香行气止痛为使, 使气行血行; 共奏活血化瘀、行气止痛之功^[1-2]。目前对此类中成药质量控制的主要手段是测定其君药或主要药材中的主要指标成分^[3-7]。心可舒丸标准中也仅有葛根素的定量测定, 为更好地体现中药多成分、多途径、多靶点的作用, 降低工作量, 减少检验成本, 本实验对君臣药丹参及葛根中的有效成分丹参素、原儿茶醛及葛根素进行了 HPLC 法同时测定, 为更全面有效地控

制产品质量提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪、Agilent 色谱工作站 (美国 Agilent 公司), XS105Du 电子天平 (梅特勒公司), USC-502 超声波清洗器 (上海波龙电子设备有限公司)。

对照品丹参素钠 (批号 110855-200809)、原儿茶醛 (批号 110810-200506)、葛根素 (批号 110752-200511) 均购自中国药品生物制品检定所。心可舒丸为市售 (批号 100810、110806、110907, 吉林吉春制药有限公司), 缺丹参、葛根阴性对照样品 (自制)。乙腈为色谱纯 (Mark 公司), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 混合对照品储备液的制备

分别精密称取丹参素钠 (每 1 mg 丹参素钠相

收稿日期: 2011-12-09

基金项目: 浙江省中医药科学研究基金计划 (2011ZA052)

作者简介: 吴 锋, 浙江大学医学院附属第一医院, 主管中药师, 主要研究方向中药药理。Tel: 13588817326 E-mail: lishuiwufeng@163.com

*通讯作者 陈宗良 Tel: (0579)82301314 E-mail: zongliangchen@163.com

网络出版时间: 2012-07-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120706.1710.002.html>

当于 0.9 mg 丹参素)、原儿茶醛、葛根素对照品适量, 分别加 60% 甲醇溶液适量溶解并定量稀释成含丹参素 57.1 μg/mL、原儿茶醛 103.5 μg/mL、葛根素 500.4 μg/mL 的对照品储备液。精密量取各对照品储备液 5 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取心可舒丸适量, 研细, 称取 0.5 g, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加入 60% 甲醇溶液 15 mL, 超声提取 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 用 60% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性对照溶液的制备

按处方比例分别制备缺丹参、缺葛根的阴性样品, 按“2.2”项操作得阴性对照溶液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Agilent Exlipce XDB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量 5 μL, 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 °C, 乙腈-0.3% 磷酸溶液 (12:88) 为流动相, 检测波长 269 nm, 理论塔板数按葛根素峰计算大于 5 000。

在此色谱条件下, 丹参素、原儿茶醛、葛根素的分离度均大于 1.5, 且阴性对照样品无干扰。色谱图见图 1。

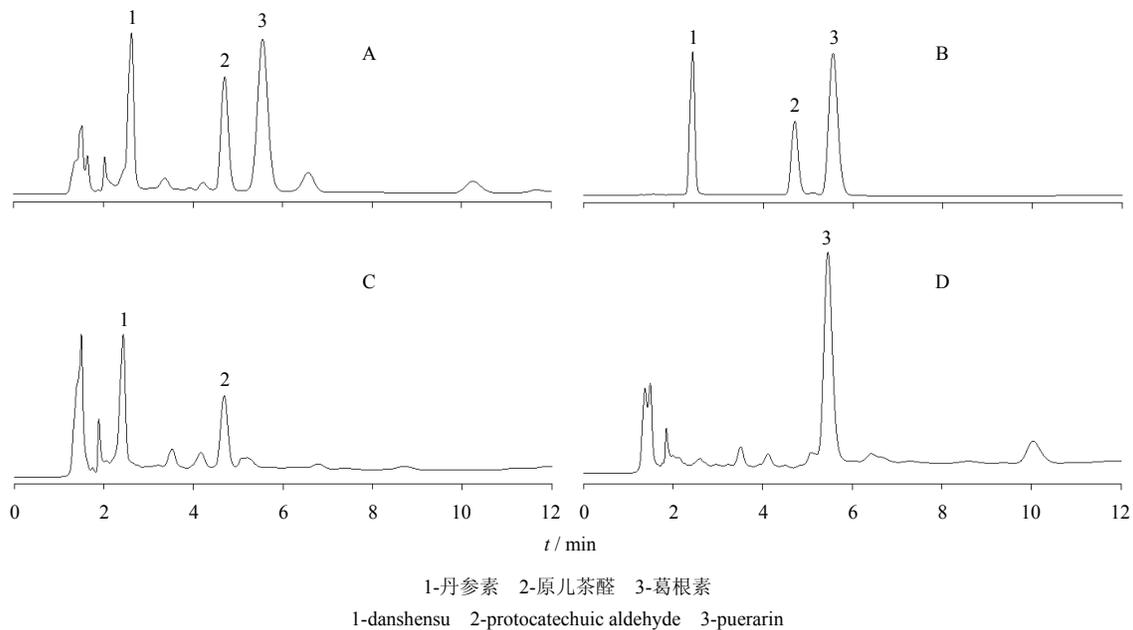


图 1 心可舒丸 (A)、混合对照品 (B) 和缺粉葛 (C)、缺丹参 (D) 阴性样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Xinkeshu Pills (A), mixed reference substances (B), negative samples without *Puerariae Lobatae Radix* (C), and negative samples without *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (D)

2.5 线性关系考察

取混合对照品溶液, 分别进样 1、2、5、10、15、20 μL, 按上述色谱条件测定。以各对照品峰面积为纵坐标 (Y), 进样质量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程: 丹参素 $Y=18\,448 X-53.484$, $r=0.999\,4$, 原儿茶醛 $Y=7\,660.2 X+25.173$, $r=0.999\,8$, 葛根素 $Y=4\,103.5 X+3.255\,7$, $r=0.999\,9$; 结果表明丹参素在 0.013~0.254 μg, 原儿茶醛在 0.021~0.414 μg, 葛根素在 0.100~2.000 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 (丹参素 12.68 μg/mL、

原儿茶醛 20.70 μg/mL、葛根素 100.1 μg/mL) 5 μL, 连续进样 6 次, 计算丹参素、原儿茶醛、葛根素峰面积的 RSD 分别为 0.7%、0.4%、0.1%。

2.7 稳定性试验

取批号为 100810 的样品, 按“2.2”项下方法操作制备供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定, 结果丹参素、原儿茶醛、葛根素峰面积的 RSD 分别为 1.1%、0.7%、1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取批号为 100810 的样品, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算得丹参

素、原儿茶醛、葛根素质量分数的 RSD 分别为 1.6%、1.5%、0.7%。

2.9 回收率试验

取批号为 100810 的样品 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 分置 6 个 20 mL 量瓶中, 每份分别精密加入含丹参素 57.1 $\mu\text{g/mL}$ 、原儿茶醛 103.5 $\mu\text{g/mL}$ 、葛根素 500.4 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液各 5 mL, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下方法进样测定, 计算回收率, 结果丹参素、原儿茶醛、葛根素的平均回收率分别为 98.18%、97.39%、98.06%, RSD 分别为 0.9%、1.1%、1.4%。

2.10 样品测定

取 3 批样品 (批号 100810、110806、110907), 每批 2 份, 制备供试品溶液, 分别进样测定, 外标法计算, 结果见表 1。

表 1 3 批心可舒丸中丹参素、原儿茶醛、葛根素的测定 ($n=2$)

Table 1 Determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, and puerarin in three batches of Xinkeshu Pills ($n=2$)

批 号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	丹参素	原儿茶醛	葛根素
100810	0.96	1.65	9.81
110806	0.87	1.97	9.54
110907	0.83	1.89	9.33

3 讨论

3.1 流动相的选择

曾选用甲醇-2%醋酸溶液、乙腈-水、甲醇-0.3%磷酸溶液等流动相系统进行等度及梯度洗脱, 由于存在干扰峰、峰型差、拖尾、分析时间过长等因素的影响, 最后选择乙腈-0.3%磷酸溶液 (12:88) 作为流动相, 各峰分离度均大于 1.5, 且峰型较好。

3.2 检测波长的选择

丹参素和原儿茶醛的最大吸收波长是 280 nm^[8], 葛根素的最大吸收波长是 250 nm^[8], 实验中曾用多波长检测的方法, 在检测波长 280 nm (0~5 min), 250 nm (5~14 min) 进行测定, 由于原儿茶醛峰和

葛根素峰比较接近, 考虑到实际应用中选用不同的色谱柱和不同的仪器, 保留时间可能会变异较大, 多波长的变换时间点不好确定, 影响本方法的耐用性, 故本实验采用二极管阵列检测器进行全谱测定, 选择对丹参素、原儿茶醛和葛根素均有较好响应的波长 269 nm 作为检测波长, 方法学考察结果表明该波长下实验方法精密、稳定、准确。

3.3 提取溶剂和方法的选择

丹参素、原儿茶醛为酚性芳香酸类化合物, 是中药丹参中重要的水溶性活性成分^[9]; 葛根素为葛根中的皂苷类化合物, 溶于甲醇, 微溶于水。故本实验根据 3 种化合物的物理性质选择比较了甲醇、乙醇及 60%甲醇溶液 3 种提取溶剂, 考察了加热回流提取和超声提取 2 种方式, 以及提取时间和溶剂体积等, 实验结果表明加入 20 mL 60%甲醇溶液超声提取 30 min 的提取条件下各指标成分提取完全、操作简便。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 中药成方制剂卷 (2010 年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
- [2] 廖彩霞, 戴德雄, 诸葛周. HPLC 法测定心可舒分散片中原儿茶醛 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2255-2257.
- [3] 王志, 李子君, 任荣军. RP-HPLC 法测定心可舒胶囊中原儿茶醛的含量 [J]. 中国药师, 2009, 12(6): 768-769.
- [4] 魏惠珍, 黄周华, 崔金国, 等. HPLC 法测定心可舒胶囊和心可舒片中丹酚酸 B [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1196-1197.
- [5] 陈娇婷, 王跃生, 杨范莉, 等. HPLC 法测定心可舒胶囊中丹酚酸 B [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1181-1182.
- [6] 张含雷, 冉桂梅, 李宝军. 高效液相色谱法测定心可舒软胶囊中葛根素的含量 [J]. 海峡药学, 2009, 21(10): 51-53.
- [7] 罗红波, 冯 华, 罗秀琼. HPLC 法测定心可舒软胶囊中葛根素的含量 [J]. 中医药导报, 2008, 14(7): 95-96.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [9] 陈永红, 续 倩, 赵增超, 等. 一种新的丹参素制备方法 [J]. 中药材, 2011, 34(3): 472-474.