

HPLC法测定乐脉颗粒中丹参素、羟基红花黄色素A和芍药苷

唐颖¹, 朱玉晓¹, 王淑云², 赵陆华^{1*}

(1. 中国药科大学 分析测试中心, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省中医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 建立一种反相高效液相色谱方法同时测定乐脉颗粒中的3种有效成分。方法 采用HPLC法。Alltech C₁₈色谱柱; 甲醇-0.2%冰醋酸溶液梯度洗脱; 检测波长切换: 丹参素 281 nm, 羟基红花黄色素A 403 nm, 芍药苷 230 nm 定量3种有效成分。结果 采用HPLC法检测制剂中丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷的量, 其线性关系良好, 线性范围分别为: 5.40~64.98 μg/mL, 4.65~55.80 μg/mL, 55.50~666.00 μg/mL, 回收率丹参素为100.68%, RSD为1.12%; 羟基红花黄色素A为96.42%, RSD为1.05%; 芍药苷为102.11%, RSD为1.92%。结论 本测定方法简便可行、重复性好, 可用于制剂的质量控制。

关键词:乐脉颗粒; 丹参素; 羟基红花黄色素A; 芍药苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2008)04-0539-03

乐脉颗粒是由丹参、红花、赤芍等数味药材组成的中药方剂^[1], 具有行气活血、化瘀通脉之功效, 用于气滞血瘀所致冠心病、心绞痛和多发性脑梗死的治疗。丹参素是丹参主要的水溶性成分, 羟基红花黄色素A和芍药苷分别是红花和赤芍的主要有效成分。丹参素、羟基红花黄色素A和芍药苷均具有明显的心血管效应, 能舒张动脉和冠脉, 保护心肌, 抗血栓的形成, 为可能的有效成分^[2~4]。在方剂中, 复方的化学成分并非是单味药化学成分简单加和, 在煎煮过程中的量可能发生变化, 并且配伍对指标成分体内药动学特征及复方药效具有显著影响^[5,6]。因此, 制剂中丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷的测定对该制剂的质量控制, 以及治疗药物监测具有重要的意义。为了快速、简便的测定乐脉颗粒中的活性成分, 本实验建立了高效液相色谱法同时测定制剂中丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷的方法, 该法可以直接表征乐脉颗粒的质量, 并对乐脉颗粒的生产过程进行更好的控制。

1 仪器、试剂与药品

岛津 LC-10AD VP 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-10A VP 紫外检测器, 浙江大学 N2000 色谱工作站。

甲醇为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为纯净水。丹参素(批号 855-200413)、羟基红花黄色素A(批号 110736-200527)、芍药苷(批号 111637-200503)对照品均购自中国药品生物制品检定所。丹参、红花、赤芍、香附、木香、川芎、山楂购于南京先声药业

公司, 经中国药科大学宋学华教授鉴定。乐脉颗粒由四川川大华西药业股份有限公司提供, 每袋 3 g。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Alltech C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2%冰醋酸溶液, 梯度洗脱, 0~12 min, 甲醇比例由 18% 递升至 35%, 12~22 min, 甲醇比例由 35% 递升至 45%; 柱温: 30 °C; 检测波长: 丹参素 281 nm, 羟基红花黄色素A 403 nm, 芍药苷 230 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 灵敏度: 0.05 AUFS。此条件下经丹参、红花、赤芍空白对照试验, 证明其他药材对丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷的测定无干扰, 且与其他组分的分离度大于 1.5, 色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

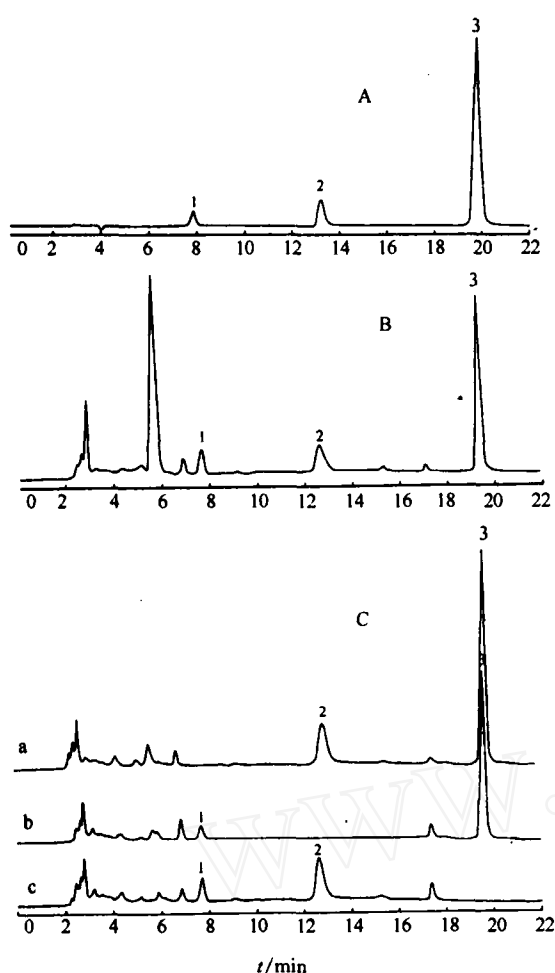
2.2.1 对照品溶液的制备: 取干燥至恒重的丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷对照品适量, 精密称定, 加 60% 甲醇溶解, 分别配成含丹参素 649.80 μg/mL、羟基红花黄色素A 279.00 μg/mL、芍药苷 1 332 μg/mL 的对照品储备液; 临用前量取适量, 加 60% 甲醇制成含丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷分别为 21.66、18.60、222.00 μg/mL 的溶液, 作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备: 乐脉颗粒研细, 取 0.5 g, 准确称定, 精密加入 60% 甲醇 15 mL, 称定质量, 超声 25 min, 放冷, 60% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。同法制备缺丹参、红花、赤芍的阴性对照溶液。

收稿日期: 2007-06-05

作者简介: 唐颖(1983—), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。E-mail: tyng07@sina.com

* 通讯作者 赵陆华 Tel: (025)83271185 E-mail: zhaoluhua@hotmail.com



1-丹参素 2-羟基红花黄色素 A 3-芍药苷
1-danshensu 2-hydroxysafflor yellow A 3-paeoniflorin

图1 混合对照品(A)、乐脉颗粒(B)和阴性对照(C:a为缺丹参、b为缺红花、c为缺赤芍)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Lemai Granula (B), and negative samples (C: a, b, c were negative samples without *Radix Salviae Miltiorrhizae*, *Flos Carthami*, or *Radix Paeoniae Rubra*)

2.3 线性关系考察:精密移取丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷对照品储备液适量,加 60% 甲醇配制成含丹参素 5.40、10.83、21.66、43.32、64.98 $\mu\text{g/mL}$, 羟基红花黄色素 A 4.65、9.30、18.60、37.20、55.80 $\mu\text{g/mL}$, 芍药苷 55.50、111.00、222.00、444.00、666.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,摇匀。分别取上述溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,记录峰面积。以丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程和线性范围。丹参素: $Y = 2\,066.1 X + 4\,144.4$, $r = 0.999\,5$; 羟基红花黄色素 A: $Y = 10\,255 X + 15\,667$, $r = 0.999\,5$; 芍药苷: $Y = 4\,004.4 X + 38\,821$, $r = 0.999\,7$ 。结果表明丹参素在 5.40~64.98

$\mu\text{g/mL}$, 羟基红花黄色素 A 在 4.65~55.80 $\mu\text{g/mL}$, 芍药苷在 55.50~666.00 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 最低检测限:取丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷对照品溶液以不同比例稀释后测定,以信噪比 2~3 为最低检出,结果本色谱条件下的最低检测限:丹参素为 3.5 ng, 羟基红花黄色素 A 为 3.3 ng, 芍药苷为 5.4 ng。

2.5 精密度试验:取同一混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定峰面积,计算得丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷的峰面积 RSD 分别为 1.94%、1.71%、1.29%。

2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液(批号 061206),分别于制备后 0、2、4、6、8 h 依法测定,以峰面积值计算,丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷的 RSD 分别为 0.35%、0.64%、0.38%,表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验:取同一批样品(批号 061206) 6 份,制备供试品溶液,进行测定,计算丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷的质量分数,其 RSD 分别为 1.55%、1.63%、2.48%。

2.8 回收率试验:精密称取批号 061206 的样品 0.25 g, 6 份,精密加入 1.0 mL 324.9 $\mu\text{g/mL}$ 丹参素对照品溶液,1.0 mL 167.4 $\mu\text{g/mL}$ 羟基红花黄色素 A 对照品溶液,2.0 mL 740.7 $\mu\text{g/mL}$ 芍药苷对照品溶液,制备供试品溶液,测定,计算加样回收率和 RSD,结果丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷的回收率和 RSD 分别为 100.68%、1.12%、96.42%、1.05%、102.11%、1.92%。

2.9 样品测定:取 3 个不同批号样品,制备供试品溶液,进样测定,以外标法计算样品中丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷,结果见表 1。

表 1 乐脉颗粒中丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of danshensu, hydroxysafflor yellow A, and paeoniflorin in Lemai Granula ($n=3$)

批号	丹参素/ ($\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$)	羟基红花黄色素 A/ ($\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$)	芍药苷/ ($\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$)
061206	4.048 5	1.995 6	19.573 8
061209	4.137 6	2.048 7	19.946 4
070316	4.092 0	1.965 0	20.233 8

3 讨论

参考相关文献报道^[7],本实验曾采用乙腈-0.2%冰醋酸、甲醇-0.1%冰醋酸、甲醇-0.2%冰醋

酸、甲醇-0.4%冰醋酸系统,结果甲醇-0.2%冰醋酸溶液梯度洗脱(0~12 min,甲醇比例由18%递升至35%;12~22 min,甲醇比例由35%递升至45%),分离效果好,重现性强,可同时检测到丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷,且各成分均达到基线分离。

丹参素、羟基红花黄色素A、芍药苷分别在281、403、230 nm下检测,这样比在同一波长下检测更灵敏而准确。如果检测波长直接由403 nm变为230 nm,基线漂移严重,故设置检测波长为:0~10 min,281 nm;10~15 min,403 nm;15~18 min,280 nm;18~22 min,230 nm。该条件下,230 nm处基线略有漂移,但制剂中有效成分的量较高,不影响测定。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 袁恒杰. 丹参素药理作用研究新进展[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(5): 604-606.
- [3] 朴永哲,金 鸣. 红花抗心肌缺血研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(5): 473-475.
- [4] 乔 雪,徐 曼,韩 健,等. 中药复方冠心Ⅰ号的化学成分及药理研究进展[J]. 世界科学技术:中医药现代化, 2007, 9(3): 86-96.
- [5] 杨祖貽,裴 瑾,刘荣敏,等. 温里药配伍提高赤芍效应成分芍药苷生物利用度的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(9): 822-824.
- [6] 张 壮,刘 楠,陈可冀,等. 川芎赤芍配伍比例对阿魏酸在麻醉犬体内药代动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(3): 28-31.
- [7] 甘洪全,黄 熙,屈 扬,等. RP-HPLC法同时测定冠心Ⅰ号中的丹参素、原儿茶醛、芍药苷和阿魏酸[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(9): 772-775.

当归微波提取物相对分子质量的分布特征研究

邱倩倩^{1,2},杨俊红^{2*},张铁军³,张恒春²

(1. 天津商业大学,天津 300134; 2. 天津大学,天津 300072; 3. 天津药物研究院,天津 300193)

摘 要:目的 应用提取物相对分子质量的分布特征研究微波强化植物材料溶剂提取机制。方法 采用超滤膜和原子力显微镜对比分析传统回流和微波辅助提取对当归浸出物相对分子质量分布和形貌的影响。结果 浸出物总量基本相同,对于相对分子质量小于 3.0×10^4 段内浸出物质量占总浸出物质量的比率,微波辅助提取比传统回流提取约增加24%;对于浸出物颗粒形态特征,二者均呈不规则岛屿状聚集,传统回流为微波辅助提取所得颗粒高度的2倍。结论 微波对高分子化合物起到分散作用,可以改变浸出物相对分子质量分布特征,在促进有效成分的快速浸出方面显著优于传统回流工艺。

关键词:当归提取物;相对分子质量;微波辅助提取;回流提取

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0541-03

微波辅助提取是将微波技术和传统溶剂提取相结合形成的一种环境友好的绿色技术。近年来,国内外关于微波辅助提取天然药物活性成分方面的研究十分活跃。相关文献报道主要集中在微波对细胞壁产生的影响、提高有效成分的转移率和提取速率方面。如Pare等^[1]认为微波可以使细胞壁破裂;郝金玉等^[2]研究表明微波可以使细胞壁上增加一些孔洞,使细胞变得疏松等。但是微波辅助提取天然植物药有效成分萃取机制的研究较少。中药有效成分提取的过程,可以认为是植物性多孔介质材料内部所含可溶性物质向溶液主体扩散的过程^[3]。从传质学的角度分析,不但药材形态结构对有效成分的提取具有重要作用,溶质相对分子质量特征在一定程度上也具有很大影响^[3]。因此本实验以当归药材为研

究对象,根据“天然组合化学库”的思想^[4],采用传统回流和微波提取两种方法水提当归有效成分,利用膜超滤技术、原子力显微镜分别表征当归水提取液浸出物相对分子质量分布和浸出物形态等聚集态特征,从微波对提取物相对分子质量分布特征影响的角度探讨微波强化药用植物有效成分提取的作用机制。

1 材料与设备

当归药材由天津药物研究院提供,经张铁军研究员鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的根。提取溶剂为蒸馏水。0.45 μm 微孔滤膜和截流相对分子质量分别为 1.4×10^5 、 7.0×10^4 、 3.0×10^4 、 1.0×10^4 的超滤膜(中国科学院上海应用物理研究所膜分离技术开发中心)。

WF-4000 微波快速反应系统(上海屹尧分析

收稿日期:2007-11-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50576066)

作者简介:邱倩倩(1972—),女,河北卢龙人,讲师,在读博士,研究方向为中草药提取机制。E-mail: dqqian@tjcu.edu.cn

* 通讯作者 杨俊红 E-mail: yangjunhong@tju.edu.cn