

HPLC-DAD 法同时测定精制冠心病片中 7 种指标成分

张玲艳¹, 雷勇胜², 葛强^{3*}

1. 天津医科大学第二医院 药学部, 天津 300211

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 中国人民武装警察部队后勤学院 救援医学系 部队卫生学教研室, 天津 300162

摘要: 目的 建立 HPLC-DAD 法同时测定精制冠心病片中丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花黄色素 A、藜本内酯、丹参素 7 种指标成分的量。方法 采用 HPLC 法, Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 甲醇-乙腈 (25 : 75, A) -0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 梯度洗脱: 0~10.0 min, 95% B; 10.0~16.0 min, 95%~85% B; 16.0~18.0 min, 85% B; 18.0~22.0 min, 85%~75% B; 22.0~26.0 min, 75%~65% B, 26.0~40.0 min, 65%~15% B; 分段变波长测定: 0~19.0 min 为 270 nm, 19.0~22.0 min 为 230 nm, 22.0~27.0 min 为 320 nm, 27.0~40.0 min 为 402 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。分别对线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率进行考察。结果 7 种指标成分丹参酮 II_A 在 0.4~8.0 mg/L ($r=0.9995$)、芍药苷在 1.2~24.0 mg/L ($r=0.9991$)、丹酚酸 B 在 3.2~64.0 mg/L ($r=0.9993$)、阿魏酸在 0.08~1.60 mg/L ($r=0.9995$)、红花黄色素 A 在 1.2~24.0 mg/L ($r=0.9993$)、藜本内酯在 0.24~4.80 mg/L ($r=0.9997$)、丹参素在 0.32~6.40 mg/L ($r=0.9997$) 线性关系良好; 精密度良好, RSD 均小于 2.0%; 重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 在室温条件下 12 h 内稳定; 平均加样回收率在 98.05%~101.27%, RSD 均小于 2.0%。6 批样品中丹参酮 II_A 在 0.704~0.797 mg/g, 芍药苷在 3.124~3.411 mg/g, 丹酚酸 B 在 7.129~7.611 mg/g, 阿魏酸在 0.180~0.198 mg/g, 红花黄色素 A 在 2.718~2.966 mg/g, 藜本内酯在 0.590~0.683 mg/g, 丹参素在 0.811~0.899 mg/g。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 为精制冠心病片的质量控制提供实验依据。

关键词: 精制冠心病片; 多指标成分; 高效液相色谱法; 丹参酮 II_A; 芍药苷; 丹酚酸 B; 阿魏酸; 红花黄色素 A; 藜本内酯; 丹参素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)14-2092-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.013

Simultaneous determination of seven index components in Refined Coronary Tablet by HPLC

ZHANG Ling-yan¹, LEI Yong-sheng², GE Qiang³

1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Hygiene Department of the Medical Rescue System, Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for the simultaneous determination of tanshinone II_A, paeoniflorin, salvianolic acid B, ferulic acid, safflor yellow A, ligustilide, and danshensu in Refined Coronary Tablets. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) with methanol-acetonitrile (25 : 75, A)-0.1% formic acid (B) as mobile phases at the flow rate of 1.0 mL/min for gradient elution: 0—10.0 min, 95% B; 10.0—16.0 min, 95%—85% B; 16.0—18.0 min, 85% B; 18.0—22.0 min, 85%—75% B; 22.0—26.0 min, 75%—65% B; 26.0—40.0 min, 65%—15% B; Detection with variable wavelength: 0—19.0 min was 270 nm, 19.0—22.0 min was 230 nm, 22.0—27.0 min was 320 nm, 27.0—40.0 min was 402 nm, and the column temperature was 30 ℃. Its linear relationship, precision, repeatability, stability, and recoveries were investigated. **Results** The results showed that the seven active components were well separated and showed good linearity,

收稿日期: 2015-03-12

作者简介: 张玲艳 Tel: 13820419555 E-mail: yanayan1986@126.com

*通信作者 葛强 Tel: 13662146892 E-mail: gq1988@aliyun.com

tanshinone II_A 0.4—8.0 mg/L ($r = 0.999\ 5$), paeoniflorin 1.2—24.0 mg/L ($r = 0.999\ 1$), salvianolic acid B 3.2—64.0 mg/L ($r = 0.999\ 3$), ferulic acid 0.08—1.60 mg/L ($r = 0.999\ 5$), safflor yellow A 1.2—24.0 mg/L ($r = 0.999\ 3$), ligustilide 0.24—4.80 mg/L ($r = 0.999\ 7$), and danshensu 0.32—6.40 mg/L ($r = 0.999\ 7$). The precision was good, and RSD was less than 2.0%. The repeatability was good, and RSD was less than 2.0%. The stability was good in 12 h. The average recoveries were between 98.05%—101.27%, and RSD was less than 2.0%. The contents of target components in Refined Coronary Tablets, tanshinone was 0.704—0.797 mg/g, paeoniflorin was 3.124—3.411 mg/g, salvianolic acid B was 7.129—7.611 mg/g, ferulic acid was 0.180—0.198 mg/g, safflor yellow A was 2.718—2.966 mg/g, ligustilide was 0.590—0.683 mg/g, and danshensu was 0.811—0.899 mg/g. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable. It can be applied to the quality control of Refined Coronary Tablets.

Key words: Refined Coronary Tablets; multi-index composition; HPLC; tanshinone II_A; paeoniflorin; salvianolic acid B; ferulic acid; safflor yellow A; ligustilide; danshensu

精制冠心病片收载于《中国药典》2010年版一部, 该药由丹参、赤芍、川芎、红花、降香5味中药组成, 具有活血化瘀之功效, 临床用于瘀血内停所致的胸痹, 症见胸闷、心前区刺痛, 以及冠心病心绞痛见上述症候者^[1]。精制冠心病片现行标准中对丹参酮 II_A 进行定量测定并规定了其量的限度。有关精制冠心病片中丹参酮 II_A、芍药苷等成分的定量测定方法已有相关报道^[2-4], 但关于精制冠心病片中多指标成分定量测定方法的研究尚未见报道。本实验采用梯度洗脱法, 首次建立了 RP-HPLC 同时测定精制冠心病片中丹参酮 II_A (丹参)、芍药苷 (赤芍)、丹酚酸 B (丹参)、阿魏酸 (川芎)、红花黄色素 A (红花)、藜本内酯 (川芎)、丹参素 (丹参) 7种指标成分的方法, 可以多指标控制该药的质量, 从而更加科学地分析药物的成分与含量; 结果表明, 该方法简便、快速、灵敏度高, 为精制冠心病片的质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相系统, 美国安捷伦公司, 配有 DAD 检测器; 梅特勒托利多 MS105DU 电子天平, 十万分之一, 瑞士梅特勒公司; KH2200DB 超声仪, 昆山禾创超声仪器有限公司。

对照品丹参酮 II_A (批号 110766-201005, 质量分数 ≥ 98.0%)、芍药苷 (批号 110736-201104, 质量分数 ≥ 98.0%)、丹酚酸 B (批号 111562-201002, 质量分数 ≥ 98.0%)、阿魏酸 (批号 110774-201108, 质量分数 ≥ 98.0%)、藜本内酯 (批号 111737-201001, 质量分数 ≥ 98.0%)、丹参素 (批号 110724-201111, 质量分数 ≥ 98.0%)、红花黄色素 A (批号 111637-201201, 质量分数 ≥ 98.0%), 购于中国食品药品检定研究院。精制冠心病片, 规格: 18片/盒, 长春晨光药业有限公司, 批号 20130801、20130802、20130803、20131105、20131106、20131107。乙腈、

甲醇、甲酸 (色谱纯), 水 (超纯水)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为甲醇-乙腈 (25 : 75, A)-0.1%甲酸水溶液 (B), 体积流量 1.0 mL/min, 梯度洗脱: 0~10.0 min, 95% B; 10.0~16.0 min, 95%~85% B; 16.0~18.0 min, 85% B; 18.0~22.0 min, 85%~75% B; 22.0~26.0 min, 75%~65% B; 26.0~40.0 min, 65%~15% B; 分段变波长测定: 0~19.0 min 为 270 nm, 19.0~22.0 min 为 230 nm, 22.0~27.0 min 为 320 nm, 27.0~40.0 min 为 402 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备

取对照品丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花黄色素 A、藜本内酯、丹参素适量, 精密称定, 用甲醇配制成含丹参酮 II_A 10 μg/mL、芍药苷 30 μg/mL、丹酚酸 B 80 μg/mL、阿魏酸 2 μg/mL、红花黄色素 A 30 μg/mL、藜本内酯 6 μg/mL、丹参素 8 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备

取精制冠心病片, 除去薄膜衣, 研成细粉, 取细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇约 20 mL, 超声 (80 W, 50 kHz) 处理 30 min, 放冷, 用 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

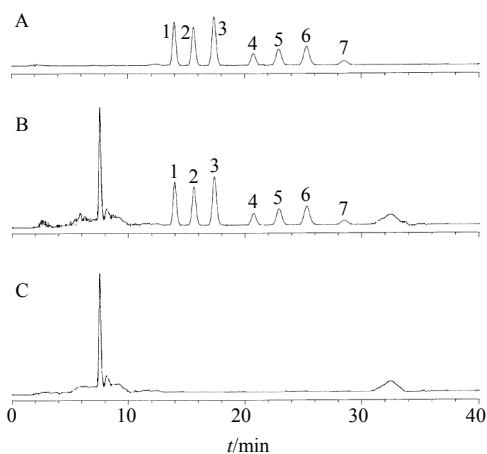
2.4 阴性对照溶液制备

取按精制冠心病片工艺方法制备的缺丹参、赤芍、川芎、红花的阴性对照样品, 按“2.3”下项方法操作, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定,

结果供试品中各待测成分色谱峰的分离度均大于1.5, 其他杂质峰及阴性对照溶液对待测成分均无干扰。见图1。



1-丹参酮 II_A 2-藜本内酯 3-丹参素 4-丹酚酸 B 5-芍药苷
6-阿魏酸 7-红花黄色素 A
1-tanshinone II_A 2-ligustilide 3-danshensu 4-salvianolic acid B
5-paeoniflorin 6-ferulic acid 7-safflor yellow A

图1 混合对照品(A)、供试品(B)、阴性对照样品(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative sample (C)

2.5.2 线性关系考察 精密吸取按“2.2”项下方法制备的混合对照品储备液1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、17.5、20.0 mL, 分别置25 mL量瓶中, 以甲醇定容, 摇匀, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述系列混合对照品溶液各10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积积分值(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 得回归方程: 丹参酮 II_A $Y=15\ 314 X-53\ 678$, $r=0.999\ 5$, 线性范围0.4~8.0 mg/L; 芍药苷 $Y=3\ 562.7 X-924.5$, $r=0.999\ 1$, 线性范围1.2~24.0 mg/L; 丹酚酸 B $Y=6\ 391.1 X-646.9$, $r=0.999\ 3$, 线性范围3.2~64.0 mg/L; 阿魏酸 $Y=55\ 556 X-5\ 328$, $r=0.999\ 5$, 线性范围0.08~1.60 mg/L; 红花黄色素 A $Y=34\ 778 X-5\ 365$, $r=0.999\ 3$, 线性范围1.2~24.0 mg/L; 藜本内酯 A $Y=53\ 679 X-1\ 290$, $r=0.999\ 7$, 线性范围0.24~4.8 mg/L; 丹参素 $Y=31\ 222 X-6\ 329$, $r=0.999\ 7$, 线性范围0.32~6.40 mg/L。

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.5.2”项下中间质量浓度梯度点的混合对照品溶液(丹参酮 II_A 4.0 mg/L、芍药苷 12.0 mg/L、丹酚酸 B 32.0 mg/L、阿魏酸 0.8 mg/L、红花黄色素 A 12.0 mg/L、藜本内酯

2.4 mg/L、丹参素 3.2 mg/L) 10 μL, 连续进样6次, 按上述色谱条件测定峰面积值。结果表明丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花黄色素 A、藜本内酯、丹参素峰面积的 RSD 分别为 0.58%、0.88%、1.37%、1.41%、1.85%、0.77%、0.86%, 表明精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液(批号 20130801), 分别于 0、2、4、6、8、12 h, 按上述色谱条件测定峰面积。结果供试品溶液在 12 h 内色谱峰面积无明显变化, 丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花黄色素 A、藜本内酯、丹参素的 RSD 分别为 1.01%、1.12%、1.38%、1.36%、1.75%、1.34%、1.16%, 表明供试品溶液在制备后 12 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取同一批样品(批号 20130801) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定各物质的量。结果丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花黄色素 A、藜本内酯、丹参素的平均质量分数分别为 0.725、3.124、7.362、0.189、2.864、0.590、0.832 mg/g, RSD 分别为 1.45%、0.56%、0.96%、0.88%、1.25%、0.45%、0.76%。

2.5.6 加样回收率试验 取同一批号已测定的样品 6 份(批号 20130801), 每份约 0.1 g, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 记录色谱峰峰面积, 计算回收率。结果丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花黄色素 A、藜本内酯、丹参素的平均回收率分别为 100.59%、100.67%、101.27%、98.91%、98.05%、99.31%、99.71%, RSD 分别为 1.22%、1.54%、1.51%、1.49%、1.88%、1.17%、1.23%。

2.6 样品测定

取 6 批精制冠心病片, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 采用外标法计算, 结果见表 1。

3 讨论

丹参中丹参酮 II_A 与丹参素的检测波长分别为 270 nm 与 280 nm^[4], 丹酚酸 B 的检测波长为 286 nm^[3], 赤芍中芍药苷的检测波长为 230 nm^[2], 经紫外扫描发现, 川芎中的阿魏酸与藜本内酯分别在 320 nm 与 280 nm 波长处有最大吸收, 红花中的红花黄色素 A 在 402 nm 波长处有最大吸收。为使各成分均在其最大吸收波长下进行测定, 提高分析方法

表 1 精制冠心片中指标性成分的质量分数 (n = 6)
Table 1 Contents of index components in Refined Coronary Tablets (n = 6)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	丹参酮 II _A	丹酚酸 B	芍药苷	阿魏酸	红花黄色素 A	藜本内酯	丹参素
20130801	0.725	7.362	3.124	0.189	2.864	0.590	0.832
20130802	0.704	7.469	3.259	0.195	2.811	0.655	0.887
20130803	0.786	7.129	3.328	0.192	2.966	0.619	0.819
20131105	0.745	7.231	3.334	0.181	2.778	0.609	0.811
20131106	0.797	7.598	3.411	0.198	2.949	0.683	0.899
20131107	0.761	7.611	3.222	0.180	2.718	0.616	0.862

的灵敏度, 采用分段变波长检测法对此 7 种化学成分进行测定。

对于多指标成分的分离分析, 流动相体系的筛选是关键^[5-6]。在参考文献的基础上^[2-4], 根据指标性成分的理化性质和色谱行为, 比较了以甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸-水、乙腈-甲酸-水、甲醇-磷酸-水、乙腈-磷酸-水、甲醇-乙腈-甲酸-水、甲醇-乙腈-磷酸-水构成的洗脱系统, 分别进行等度与梯度的洗脱方式。结果表明, 甲醇-乙腈-甲酸-水系统进行梯度洗脱的分析效果较好, 各成分分离效果较好, 各色谱峰的分离度和理论塔板数均符合要求。

分别考察了提取溶剂甲醇与水的比例、超声时间对测定结果的影响, 结果发现 50% 甲醇, 超声 30 min 时, 各组分提取完全。因此, 本实验选用 50% 甲醇超声处理 30 min 为样品的提取方法。

本实验采用 HPLC-DAD 法同时测定精制冠心片中丹参酮 II_A、芍药苷、丹酚酸 B、阿魏酸、红花

黄色素 A、藜本内酯、丹参素 7 种指标成分的量。该方法更科学合理, 为精制冠心片质量标准的提高研究提供参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] 孙博光, 魏传梅, 王庆玲, 等. HPLC 测定精制冠心片中芍药苷的含量 [J]. 中国药师, 2003, 6(6): 353-354.
 [3] 蒋珍藕, 兰宝强, 邱宏聪, 等. HPLC 法测定精制冠心片中丹酚酸 B 的含量 [J]. 中医药导报, 2011, 17(1): 83-85.
 [4] 蒙跃龙, 冯改利, 史亚军, 等. HPLC 测定精制冠心片中丹参酮 II_A 的含量 [J]. 陕西中医, 2005, 26(7): 709-710.
 [5] 杨青波, 靳风云, 陈伟, 等. 银杏达莫注射液中黄酮类和萜类内酯 7 种成分的定量测定 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3279-3283.
 [6] 吴剑涓, 李文明, 李腾飞. HPLC-DAD 法同时测定八味沉香散中的 6 种成分 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3569-3572.