

HPLC同时测定双丹胶囊中7种主要成分

袁凤刚¹, 郝艳玲^{1*}, 陈永刚², 孙远峰²

(1. 徐州医学院 实验动物中心, 机能实验教学中心, 江苏 徐州 221004;
2. 徐州市中心医院, 江苏 徐州 221009)

[摘要] 目的:建立同时测定双丹胶囊中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹皮酚 7 种有效成分的高效液相色谱分析方法。方法:采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液梯度洗脱, 检测波长 235 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果:7 种成分的线性范围分别为 54.43 ~ 544.3, 0.96 ~ 9.6, 2.68 ~ 26.8, 0.92 ~ 9.2, 2.16 ~ 21.6, 9.36 ~ 93.6, 9.16 ~ 91.6 mg·L⁻¹, *r* 分别为 0.999 7, 0.999 6, 0.999 5, 0.999 3, 0.999 2, 0.999 7, 0.999 5。平均加样回收率分别为 98.6% (RSD 1.8%), 100.2% (RSD 1.9%), 100.4% (RSD 2.0%), 99.1% (RSD 2.5%), 98.8% (RSD 2.3%), 100.6% (RSD 1.9%), 99.1% (RSD 1.8%)。结论:该分析方法准确可靠, 重复性好, 能更好地控制双丹胶囊的质量提供科学依据。

[关键词] 双丹胶囊; 丹参素; 原儿茶醛

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0032-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010032

Simultaneous HPLC Determination of Seven Main Components of Shuangdan Capsules

YUAN Feng-gang¹, HAO Yan-ling^{1*}, CHEN Yong-gang², SUN Yuan-feng²

(1. Laboratory Animal Center, Function to Experiment Center, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China;
2. Department of Pharmacy, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the simultaneous determination of tanshinol, protocatechuic aldehyde, paeoniflorin, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and paeonol in Shuangdan capsules. **Method:** An Agilent Zorbax SB-C₁₈ analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, with the mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution for gradient elution at the detection wavelength of 235 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The linear range of the seven components were 54.43-544.3, 0.96-9.6, 2.68-26.8, 0.92-9.2, 2.16-21.6, 9.36-93.6, 9.16-91.6 mg·L⁻¹ respectively, and the correlation coefficients were 0.999 7, 0.999 6, 0.999 5, 0.999 3, 0.999 2, 0.999 7, 0.999 5. The average recoveries were 98.6% (RSD 1.8%), 100.2% (RSD 1.9%), 100.4% (RSD 2.0%), 99.1% (RSD 2.5%), 98.8% (RSD 2.3%), 100.6% (RSD 1.9%), 99.1% (RSD 1.8%). **Conclusion:** This analysis method is accurate, reliable and highly reproducible, and can provide a scientific basis for controlling the quality of Shuangdan capsules.

[Key words] Shuangdan capsules; tanshinol; protocatechuic

双丹胶囊剂是由双丹口服液(《中国药典》2010年版一部收载)经剂型改革而制成的胶囊剂,

由丹参和牡丹皮 2 味中药组成, 药味简单, 主要有效成分包括丹酚酸类^[1]、丹参酮类、丹皮酚类、芍

[收稿日期] 20150120(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31172171); 徐州市中心医院硕士创新团队科技项目(xzs2012046)

[第一作者] 袁凤刚, 硕士, 实验师, 从事生物化学与分子生物学研究, Tel:13905201468, E-mail:yuanfg@xzm.c.edu.cn

[通讯作者] * 郝艳玲, 硕士, 实验师, 从事药物化学与药代动力学研究, E-mail:haoyl@foxmail.com

药苷类^[2]等成分。有文献报导,双丹胶囊能有效改善心肌微循环,增加冠状动脉的血流量,抗动脉粥样硬化^[3];另外能理气生血,去瘀生新,治疗功能失调性子宫出血^[4]。本研究基于该胶囊剂组成药材的化学成分^[5-7]及预实验结果,最终确定了双丹胶囊中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹皮酚 7 种主要有效成分,并建立了 RP-HPLC 同时测定上述 7 种成分的分析方法,旨在为全面评价双丹胶囊质量控制提供参考。

1 材料

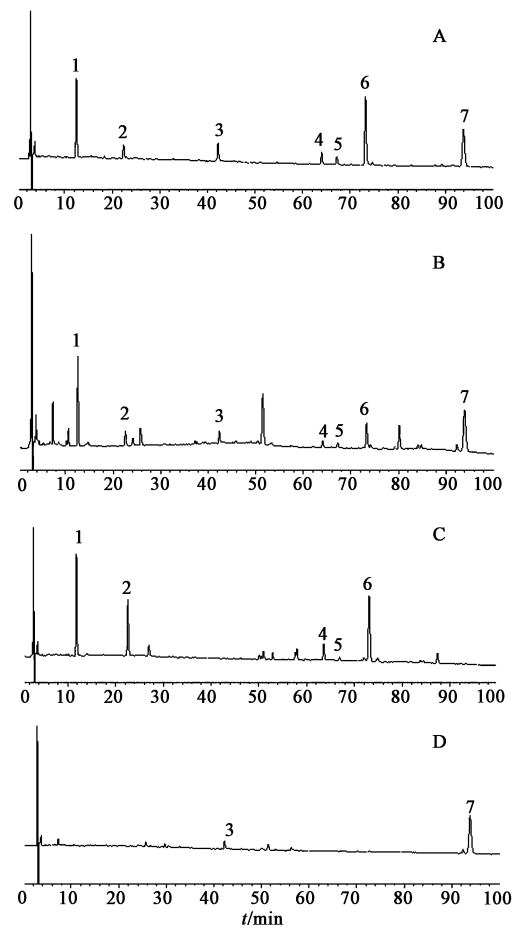
1100 系列高效液相色谱仪(包括 G1311A 型四元低压梯度泵, G1322A 型在线脱气装置, 7725i 型手动进样器, G1314A 型紫外可变波长检测器, Chem Station 色谱工作站, 美国 Agilent 公司), Classic UVF 型超纯水机(英国 Elga 公司), SB-5200D 型超声清洗机(宁波新芝生物科技有限公司), AL204 型 1/10 万电子天平(上海 Mettler Toledo 仪器有限公司)。

丹参素钠、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹皮酚对照品(上海顺勃生物工程有限公司, 批号分别为 201302, 201402, 201308, 201403, 201404, 201404, 201302, 纯度分别为 98.45%, 98.68%, 98.57%, 98.06%, 98.21%, 98.01%, 98.74%); 双丹胶囊(规格为 12 粒/板, 3 板/盒, 每粒 0.5 g, 广州莱泰制药有限公司, 批号分别为 130301, 130502, 130602), 乙腈、甲醇色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 3%~7% A; 20~45 min, 7%~17% A; 45~75 min, 17%~24% A; 75~102 min, 24%~33% A; 102~105 min, 33%~3% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取丹参素钠 15.12 mg, 原儿茶醛 0.24 mg, 芍药苷 0.67 mg, 迷迭香酸 0.23 mg, 紫草酸 0.54 mg, 丹酚酸 B 2.34 mg, 丹皮酚 2.29 mg 分别置于 25 mL 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇配制成含丹参素钠 604.8 mg·L⁻¹(相当于含丹参素 544.3 mg·L⁻¹), 原儿茶醛 9.6 mg·L⁻¹, 芍药苷 26.8 mg·L⁻¹, 迷迭香酸 9.2 mg·L⁻¹, 紫草酸 21.6 mg·L⁻¹, 丹酚酸 B 93.6 mg·L⁻¹, 丹皮酚 91.6 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 4 °C 冷藏备用。



A. 混合对照品; B. 双丹胶囊供试品溶液; C. 缺牡丹皮的阴性对照溶液; D. 缺丹参的阴性对照溶液; 1. 丹参素; 2. 原儿茶醛; 3. 芍药苷; 4. 迷迭香酸; 5. 紫草酸; 6. 丹酚酸 B; 7. 丹皮酚

图 1 双丹胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatographic of Shuangdan capsules

2.3 供试品溶液的配制 精密称取双丹胶囊内容物 1.0 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 称重, 超声处理(功率 300 W, 40 kHz) 30 min, 取出放冷后再称重, 补足减失质量, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 4 °C 冷藏备用。

2.4 阴性对照溶液的配制 按双丹胶囊的生产工艺^[8]制备缺牡丹皮、缺丹参的阴性制剂, 并按照 2.3 项下方法制备阴性供试品溶液。

2.5 线性关系考察 分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 于 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度。按 2.1 项下色谱条件进样分析, 以对照品溶液质量浓度(X, mg·L⁻¹)对峰面积(Y)回归, 得线性回归方程, 标准曲线、相关系数和线性范围见表 1。

2.6 精密度试验 精密吸取 2.2 项下混合对照品

表 1 7 种成分的线性关系考察

Table 1 Linear relationship of 7 kinds of ingredients

成分	标准曲线	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
丹参素	Y=7.734 1X-27.448	0.999 7	54.43~544.3
原儿茶醛	Y=162.39X-0.519 2	0.999 6	0.96~9.6
芍药苷	Y=33.247X-15.981	0.999 5	2.68~26.8
迷迭香酸	Y=47.963X-3.935 9	0.999 3	0.92~9.2
紫草酸	Y=21.976X-6.648 2	0.999 2	2.16~21.6
丹酚酸 B	Y=23.084X-9.365 2	0.999 7	9.36~93.6
丹皮酚	Y=51.909X-15.62 5	0.999 5	9.16~91.6

溶液 20 μL,按照 2.1 项下色谱条件连续测定 6 次,结果丹参素、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹皮酚 7 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.4%,1.2%,1.3%,1.6%,1.9%,0.8%,1.1%,表明液相色谱仪的精密度良好。

2.7 重复性试验 取双丹胶囊样品(批号 130301) 6 份,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,并进行测定,结果丹参素、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹皮酚 7 种成分峰面积 RSD 分别为 1.9%,2.5%,2.3%,2.7%,2.9%,1.8%,2.2%,表明样品的重复性良好。

2.8 稳定性试验 取 2.7 项下供试品溶液 1 份,室温下放置 0,2,4,8,12,24 h 后分别进样 20 μL 测定,结果丹参素、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹皮酚 7 种成分峰面积 RSD 分别为 1.8%,0.8%,2.3%,2.7%,2.1%,2.5%,1.7%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收试验 称取已知含量的双丹胶囊内容物 0.5 g(批号 130301),平行 6 份,分别置于 50 mL 量瓶中,精密加入丹参素钠 711 mg·L⁻¹(相当于含丹参素 640 mg·L⁻¹),原儿茶醛 7.8 mg·L⁻¹,芍药苷 26.1 mg·L⁻¹,迷迭香酸 9.4 mg·L⁻¹,紫草酸 18.3 mg·L⁻¹,丹酚酸 B 105 mg·L⁻¹,丹皮酚 112 mg·L⁻¹的对照品溶液 10 mL,按 2.3 项下方法操作制备供试品溶液,分别进样测定,采用外标法计算上述 7 种成分的平均回收率及 RSD,结果见表 2。

2.10 样品测定 按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进样分析,每批样品平行测定 3 次,记录峰面积,按照外标法计算 7 种成分的含量,结果见表 3。

表 2 7 种成分加样回收试验

Table 2 7 kinds of ingredients and recovery test

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
丹参素	6.492	6.400	12.905	100.2	98.6
	6.463	6.400	12.761	98.4	(1.8)
	6.419	6.400	12.870	100.8	
	6.634	6.400	12.849	97.1	
	6.571	6.400	12.728	96.2	
	6.306	6.400	12.661	99.3	
	6.075	6.078	0.154	101.6	100.2
原儿茶醛	0.073	0.078	0.151	100.3	(1.9)
	0.073	0.078	0.153	102.9	
	0.076	0.078	0.154	99.2	
	0.076	0.078	0.152	97.3	
	0.071	0.078	0.149	100.1	
	0.265	0.261	0.525	99.4	100.4
	0.260	0.261	0.521	99.9	(2.0)
芍药苷	0.257	0.261	0.520	100.6	
	0.273	0.261	0.543	103.4	
	0.270	0.261	0.524	97.5	
	0.257	0.261	0.521	101.3	
	0.094	0.094	0.187	98.3	99.1
	0.093	0.094	0.187	99.6	(2.5)
	0.093	0.094	0.187	100.3	
迷迭香酸	0.097	0.094	0.186	95.4	
	0.095	0.094	0.187	97.9	
	0.091	0.094	0.187	102.8	
	0.179	0.183	0.356	96.8	98.8
	0.178	0.183	0.365	102.3	(2.3)
	0.176	0.183	0.352	96.3	
	0.187	0.183	0.369	99.4	
紫草酸	0.183	0.183	0.367	100.2	
	0.174	0.183	0.352	97.5	
	1.056	1.050	2.115	100.8	100.6
	1.050	1.050	2.081	98.2	(1.9)
	1.043	1.050	2.095	100.2	
	1.084	1.050	2.125	99.1	
	1.073	1.050	2.161	103.6	
丹酚酸 B	1.030	1.050	2.096	101.5	
	1.148	1.120	2.288	101.8	99.1
	1.142	1.120	2.263	100.1	(1.8)
	1.136	1.120	2.228	97.5	
	1.185	1.120	2.270	96.9	
	1.153	1.120	2.269	99.6	
	1.127	1.120	2.231	98.5	

表 3 双丹胶囊样品中 7 种成分含量测定 ($n=3$)

Table 3 The 7 Content determination of Shuangdan capsules ($n=3$)

批号	丹参素	原儿茶醛	芍药苷	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	丹皮酚
130301	12.963 1	0.149 4	0.529 2	0.187 0	0.359 1	2.112 2	2.295 1
130502	13.423 2	0.161 5	0.564 5	0.233 2	0.412 2	2.237 2	2.398 2
130602	13.167 1	0.154 8	0.542 1	0.209 3	0.386 6	2.161 5	2.323 4

3 讨论

3.1 检测波长的选择 本实验采用二极管阵列检测器,分别对对照品溶液在 200~400 nm 进行了全波长扫描,结果丹参素、原儿茶醛、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹皮酚的最大吸收波长分别为 281, 282, 230, 329, 285, 286, 274 nm, 为兼顾各组分的检测信号强度及保证基线的平稳,选择 235 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择 为了保证双丹胶囊组成药材丹参中有效成分多种酚酸类物质的酚羟基和羧基的解离被有效抑制,因此在流动相水中加入了适量的甲酸。预实验曾比较甲醇-0.1% 甲酸溶液及乙腈-0.1% 甲酸溶液作为流动相,结果表明以乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱可以使色谱图中各成分的色谱峰达到较好的分离,且峰形较好。

3.3 样品处理方法的选择 分别考察了加热回流法和超声提取法的,二者对于 7 种成分的提取效率差别无统计学意义,考虑操作的简便,确定采用超声提取方法;实验同时对不同比例提取溶剂(水,30% 甲醇,50% 甲醇,70% 甲醇,甲醇等)及提取时间(15,30,40,60 min)进行考察。结果表明,50% 甲醇超声提取 30 min 对 7 种成分提取效果较好,且提取率较高。

本实验利用 HPLC 法对双丹胶囊中 7 种成分

进行同时测定,分析方法灵敏、准确、分析效率高,可为全面控制双丹胶囊的质量提供新的手段,并为进一步研究双丹胶囊的药代动力学及药效学提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 刘胜敏,杨志宏,孙晓波. LC-MS/MS 测定 6 种丹参主要有效成分及其靶向分布研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9):1704-1707.
- [2] 王玥,杜守颖,袁航,等. 组织破碎法提取牡丹皮中有效成分的研究[J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2529-2531.
- [3] 王瑞利. 双丹胶囊联合瑞舒伐他汀钙片治疗冠心病的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(14):5-6.
- [4] 刘斌. 双丹胶囊治疗围绝经期功能失调性子宫出血的疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(14): 150-151.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:610.
- [6] 毕琳琳,缪珊,李穆琼,等. 双丹胶囊质量标准的建立[J]. 中国药师, 2014, 17(7):1237-1239.
- [7] 潘坚扬. 双丹方入血成分分析及药物动力学研究[D]. 杭州:浙江大学, 2006.
- [8] 霍清,孔令旭. 双丹颗粒剂制备工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7):1784-1785.

[责任编辑 顾雪竹]