

HPLC 测定益心通脉合剂中丹参素钠 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量

李圆圆¹, 宋英^{2*}, 方芳¹, 谈静²

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定益心通脉合剂中丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的方法。方法:丹参素钠的 HPLC 色谱条件为 Welchrom-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.5% 乙酸(12:88), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 检测波长 280 nm; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的色谱条件为流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~13 min, 13%~15% A; 13~23 min, 15%~20% A; 23~30 min, 20%~40% A; 30~40 min, 40% A), 检测波长 260 nm, 其他条件同丹参素钠。结果:丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性范围分别为 0.213 44~5.336, 0.078 72~2.361 6 μg, 平均加样回收率分别为 100.17% (RSD 2.02%), 101.79% (RSD 1.40%)。结论:建立的 HPLC 检测快速、定量准确、重复性较好, 可用于益心通脉合剂的质量控制。

[关键词] 益心通脉合剂; 丹参素钠; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 高效液相色谱; 方法学考察

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0064-04

[doi] 10.11653/syjf2013220064

Determination of Sodium Danshensu and Calycosin-7-Glucoside in Yixin Tongmai Mixtures by HPLC

LI Yuan-yuan¹, SONG Ying^{2*}, FANG Fang¹, TAN Jing²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determining sodium danshensu and calycosin-7-glucoside in Yixin Tongmai mixtures. **Method:** HPLC conditions of sodium danshensu were as follows: Welchrom-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-0.5% acetic acid (12:88), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature 30 ℃, injection volume 10 μL, detection wavelength 280 nm. But conditions of calycosin-7-glucoside were: mobile phase of acetonitrile (A) -0.2% formic acid solution (B) with gradient elution program (0-13 min, 13%-15% A; 13-23 min, 15%-20% A; 23-30 min, 20%-40% A; 30-40 min, 40% A), detection wavelength at 260 nm; Other conditions were the same as sodium danshensu. **Result:** Linear ranges of sodium danshensu and calycosin-7-glucoside were 0.213 44-5.336 and 0.078 72-2.361 6 μg, respectively; Average recoveries of them were 100.17% (RSD 2.02%) and 101.79% (RSD 1.40%), respectively. **Conclusion:** This established HPLC method was rapid, accurate and reproducible, it could be used for quality control of Yixin Tongmai mixtures.

[Key words] Yixin Tongmai mixtures; sodium danshensu; calycosin-7-glucoside; HPLC; methodological study

[收稿日期] 20130422(012)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(2012SZ0188);成都中医药大学附属医院基金项目(2012-PP-24)

[第一作者] 李圆圆, 硕士, 从事中药制剂研究, Tel:028-87783257, E-mail:liyuan2908@qq.com

[通讯作者] * 宋英, 教授, 主任中药师, 从事中药学研究, Tel:028-87783735, E-mail:806380106@qq.com

益心通脉合剂为我院多年临床经验方,由黄芪、丹参、薤白、川芎等组成,主治胸痹心痛、气虚血瘀、痰浊阻滞证。丹参为方中君药,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈作用,丹参素为其主要活性成分^[1-3];黄芪为方中臣药,具有补气固表、利水退肿等功效,主要活性成分为黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等^[4-5]。该制剂的初步拟定标准仅限于黄芪甲苷含量测定,且样品处理过程繁琐、测定方法复杂。为了更简便有效地控制益心通脉合剂质量,本实验拟采用HPLC测定该制剂中丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量。

1 材料

AS10200型超声清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),BP211D型电子分析天平(南京智拓仪器仪表有限公司),HP-1100型高效液相色谱仪(美国惠普公司)。毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号MUST-11042915纯度98%,成都曼斯特生物科技有限公司提供),丹参素钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号110855-200809),甲醇,乙腈均为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 丹参素钠 Welchrom-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5%乙酸(12:88),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量10 μL,检测波长280 nm。理论板数按丹参素钠峰计算应不低于5 000。

2.1.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 Welchrom-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~13 min, 13%~15% A; 13~23 min, 15%~20% A; 23~30 min, 20%~40% A; 30~40 min, 40% A),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量10 μL,检测波长260 nm。理论板数以毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算应不低于3 000。

2.2 对照品溶液的制备

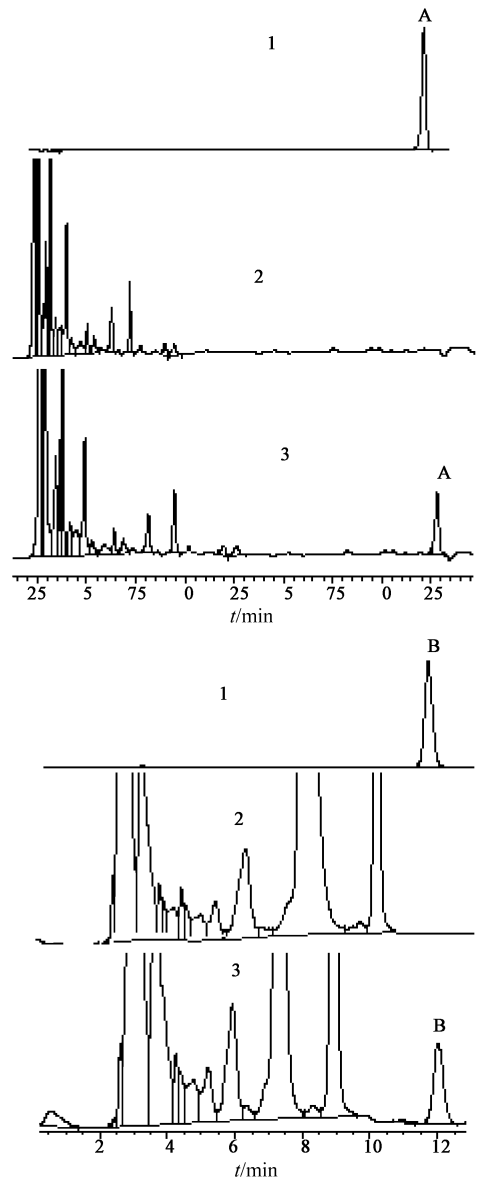
2.2.1 丹参素钠 精密称取丹参素钠对照品3.48, 14.67 mg,分别置于25 mL量瓶中,加20%甲醇定容,即得质量浓度分别为0.139 2, 0.586 8 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品2.21 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇定容,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密量取样品溶液

5 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 分别按处方比例称取缺丹参处方药材、缺黄芪处方药材,按工艺方法制备缺丹参阴性、缺黄芪样品,按2.3项下方法制备阴性对照溶液。分别量取适量对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,按2.1项下色谱条件测定,结果阴性对照溶液在与对照品色谱峰相同保留时间处均无色谱峰,表明阴性无干扰,见图1。



A. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; B. 丹参素钠;

1. 对照品; 2. 阴性样品; 3. 供试品

图1 益心通脉合剂HPLC

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察 精密称取丹参素钠对照品13.34 mg,置25 mL量瓶,加20%甲醇至刻度,摇

匀,精密吸取 1 mL 置 25 mL 量瓶,得对照品贮备液。分别精密吸取贮备液 2,3,5,10 mL 置 10 mL 量瓶中,加 20% 甲醇定容,摇匀,得系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,以丹参素钠峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 645.16X + 2.1358$ ($r=0.9999$),表明丹参素钠在 0.21344 ~ 5.336 μg 与峰面积呈良好线性关系。精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 20.08 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密吸取 0.5,1,3,5,15 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按 2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 2357.15X + 10.929$ ($r=0.9998$),表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.07872 ~ 2.3616 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.5.2 精密度试验 分别精密吸取丹参素钠 (0.1392 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (0.08663 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对照品溶液适量,按 2.1 项下相应色谱条件分别连续进样 6 次,结果丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.84%,0.62%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10 h 进样,按 2.1 项下相应色谱条件测定,记录峰面积,结果样品中丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均质量浓度分别为 0.8895 (RSD 1.06%),0.08448 (RSD 1.54%) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,表明供试品溶液于室温放置 10 h 稳定。

2.5.4 重复性试验 精密量取样品溶液适量,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,各 6 份,按 2.1 项下相应色谱条件测定,记录峰面积,结果样品中丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均质量浓度分别为 0.8904 (RSD 1.28%),0.08380 (RSD 1.15%) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密吸取样品溶液 (0.8904 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 mL,共 6 份,分别精密加入丹参素钠对照品溶液 (0.5868 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液;精密量取已知含量的样品溶液 (0.0838 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 mL,共 6 份,分别精密加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 (0.08663 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 mL,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表 1。

2.6 样品测定 取 3 批样品,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下相应色谱条件测定,记录峰面积,结果样品中丹参素钠质量浓度分别为

表 1 益心通脉合剂中丹参素钠、毛蕊异黄酮葡萄糖苷加样回收率试验

成分	测得量	加样回收率	平均加样	RSD
	/mg	/%	回收率/%	/%
丹参素钠	3.5508	100.55	100.17	2.02
	3.4944	97.34		
	3.5887	102.70		
	3.5596	101.05		
	3.5632	101.25		
	3.5090	98.17		
毛蕊异黄酮	0.3406	99.85	101.79	1.41
葡萄糖苷	0.3418	100.54		
	0.3437	101.64		
	0.3448	102.27		
	0.3475	103.83		
	0.3454	102.62		

0.8864,0.8905,0.8782 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度分别为 0.08546,0.08410,0.08472 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,说明建立的含量测定方法稳定可靠。

3 讨论

筛选了 4 种丹参素钠含量测定色谱条件^[6-10],分别为 Hypersil BDS 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5% 乙酸 (17:83);Hypersil BDS 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5% 乙酸 (7:93);Welchrom-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5% 乙酸 (17:83);Welchrom-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5% 乙酸 (12:88),结果显示长柱较短柱分离效果理想,试验所采用色谱条件的分离效果较其他 3 种方法好,且峰形对称性好。考察了乙腈-0.2% 甲酸 (20:80),乙腈-0.2 甲酸梯度洗脱等毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定流动相体系,结果发现乙腈-0.2 甲酸梯度洗脱体系的主峰峰形好,且分离度较好^[11-12]。

考察了 50% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、95% 乙醇等提取溶媒,结果不同溶媒提取测得的丹参素钠含量差别不大,但甲醇溶液提取所得毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量较高,且杂质峰较少,主峰分离度好,故选择甲醇作为提取溶媒。

[参考文献]

[1] 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,2010:70.

目舒丸质量标准

张颖, 崔文, 亢泽峰*

(中国中医科学院眼科医院, 北京 100040)

[摘要] 目的: 建立目舒丸的定性定量方法。方法: 采用 TLC 对目舒丸中白芍、延胡索进行定性鉴别; 采用 HPLC 对目舒丸中芍药苷进行含量测定, 色谱条件为 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水(15:85), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 230 nm, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。结果: 白芍、延胡索乙素的 TLC 鉴别简便可靠。芍药苷在 37.8 ~ 756 ng 呈良好线性关系, 平均回收率 98.2%, RSD 1.4%。结论: 建立的方法准确、可靠、专属性强, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 目舒丸; 白芍; 延胡索; 芍药苷; 薄层色谱鉴别; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0067-04

[doi] 10.11653/syfyj2013220067

Quality Standards of Mushu Pills

ZHANG Ying, CUI Wen, KANG Ze-feng*

(Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the qualitative and quantitative methods for quality control of Mushu pills. **Method:** TLC were used as qualitative identifications of Paeoniae Radix Alba and Corydalis Rhizoma in Mushu pills; And to develop a HPLC method for determination of paeoniflorin in Mushu pills, separation was performed on ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (15:85) as mobile phase, flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, detection wavelength was at 230 nm, injection volume 10

[收稿日期] 20130830(191)

[基金项目] 中国中医科学院眼科医院院内课题(2011109)

[第一作者] 张颖, 副主任药师, 硕士, 从事临床药学研究, Tel:010-68663392, E-mail: zhangying3392@126.com

[通讯作者] * 亢泽峰, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合眼科研究, Tel:010-68684229, E-mail: zefeng2531@163.com

[2] 许继文, 付春梅. 丹参的药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12(23): 1467.

[3] 赵娜, 郭治昕, 赵雪, 等. 丹参的化学成分与药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(4): 155.

[4] 王晓菊. 黄芪有效成分的提取分离及活性研究[J]. 太原: 山西大学, 2005.

[5] 蔡莉, 朱江. 黄芪多糖研究现状与进展[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(15): 896.

[6] 李朝霞, 王地. 丹参水溶性成分的研究进展[J]. 北京中医, 2004, 23(3): 176.

[7] 朱璐璐, 宋英, 袁强华, 等. 咽灵合剂提取工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(11): 54.

[8] 张英丰, 朱黎霞, 梁东辉. HPLC 同时检测丹参提取物中 5 种水溶性和脂溶性成分含量[J]. 中国实验方

剂学杂志, 2012, 18(11): 76.

[9] 李井涛, 杨晓腾, 郭美玲. HPLC 法测定止痛化症片和胶囊中丹参素钠的含量[J]. 中国药事, 2011, 25(6): 600.

[10] 黄衍民, 黄炳亮, 张亚斌, 等. 高效液相色谱法测定丹红注射液中丹参素钠的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(11): 1618.

[11] 阮佳佳, 林灵超. HPLC 法测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量[J]. 广州化工, 2012, 40(12): 142.

[12] 黄志勤, 李洪亮, 程齐来. HPLC 测定黄芪药材中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷[J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 2736.

[责任编辑 全燕]