

HPLC 同时测定扶正解毒颗粒中 5 种成分的含量

王娟¹, 沈孝丽¹, 陈同强¹, ADILBEKOV J.^{1,2}, 封士兰^{1,3*}

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000; 2. 塔什干药物研究所, 乌兹别克斯坦塔什干;
3. 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 建立一种高效液相色谱分析方法, 同时测定扶正解毒颗粒中丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸 B 和芒柄花素的含量。方法: 迪马 ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇和 0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱, 280 nm 波长测定丹参素、原儿茶醛和丹酚酸 B, 316 nm 波长测定阿魏酸, 248 nm 波长测定芒柄花素。结果: 5 个化合物在一定范围内线性关系良好 ($r > 0.999$), 平均回收率为 98% ~ 101%, RSD < 3.55%。结论: 该法简便、灵敏、准确、重复性好, 可用于同时测定该制剂中 5 种成分的含量, 为该制剂质量控制提供了基础。

[关键词] 丹参素; 原儿茶醛; 阿魏酸; 丹酚酸 B; 芒柄花素; 高效液相色谱; 含量测定; 扶正解毒颗粒

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0074-04

Simultaneous Determination of Five Components in Compound Preparation of Fuzheng Jiedu Keli by HPLC

WANG Juan¹, SHEN Xiao-li¹, CHEN Tong-qiang¹, ADILBEKOV J.^{1,2}, FENG Shi-lan^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Tashkent Pharmaceutical Institute, Tashkent, Uzbekistan; 3. Gansu Province Key Laboratory of Preclinical Study for New Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for determination of tanshinol, protocatechuic aldehyde, ferulic acid, salvianolic acid B, formononetin in compound preparation of Fuzheng Jiedu Keli. **Method:** The chromatographic separation was performed on a Dikmal ODS-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) maintaining at 30 °C during the whole process. The mobile phase consisted of methanol and 0.05% H₃PO₄ aqueous solution at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 280 nm for tanshinol, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B, 316 nm for ferulic acid, 248 nm for formononetin. **Result:** All the compounds were linear ($r > 0.999$) in the range of the test concentrations, and the average recovery of the method was between 98% and 101%, RSD < 3.55%. **Conclusion:** The method is proved to be credible, sensitive, accurate and repeatable. It can be applied to determine tanshinol, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B, ferulic acid, formononetin in compound preparation of Fuzheng Jiedu Keli simultaneously and provide a basal method of quality control to this preparation and other relative preparations.

[Key words] tanshinol; protocatechuic aldehyde; salvianolic acid B; ferulic acid; formononetin; HPLC; content determination; Fuzheng Jiedu Keli

[收稿日期] 20110322(010)

[基金项目] 兰州市科技计划项目(2010-1-153)

[第一作者] 王娟, 硕士研究生, 从事药物分析研究, Tel: 15193106223, E-mail: 2440311137@qq.com

[通讯作者] * 封士兰, 博士, 教授, 从事中草药和中药制剂化学成分分离分析研究, Tel: 0931-8915686, E-mail: fengshl@lzu.edu.cn

扶正解毒颗粒(FJK)主要由红芪、茯苓、丹参、枸杞、当归、连翘、莪术等组成,具补气养血、活血化瘀、利湿解毒之功效,对镍致睾丸细胞的损伤具有一定的防治作用^[1-4]。FJK 可降低血清镍含量,恢复心肌酶的活性,从而改善患者临床症状及心电图的异常^[5-6]。扶正解毒方是由兰州大学中西医结合研究所所长赵健雄教授根据自己多年的临床经验拟定的,多年的临床使用证实具有很好的治疗慢性镍毒损伤的作用。扶正解毒方对长期接触镍的肝病、冠心病等患者疗效显著,可改善疲乏,增加食欲,降低过高的血镍,对肝功、心肌酶和心电图的恢复优于单用西药者,且未发现毒副作用。扶正解毒颗粒 2007 年经甘肃省食品药品监督管理局批准为医院制剂,尚未见扶正解毒颗粒中化学成分含量测定的相关报道。本研究选择红芪中的芒柄花素,丹参中的丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛,当归中的阿魏酸作为指标成分,用 HPLC 同时测定该制剂中此 5 种成分的含量,为该制剂质量控制提供了基础。

1 仪器与试药

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 Alliance 四元梯度泵,717 自动进样器,2996 二极管阵列检测器;Millennium 32 色谱管理站;BP211D 型电子分析天平($d = 0.000\ 01\ \text{g}$,德国 Sartorius 赛多利斯),BS224S 型电子分析天平($d = 0.000\ 1\ \text{g}$,德国 Sartorius 赛多利斯)。

丹参素(批号 110855-200508);原儿茶醛(批号 110810-200506);阿魏酸(批号 1107732200611);丹酚酸 B(批号 11562-200807)均由中国药品生物制品检定所提供;芒柄花素(中药固体制剂制造技术国家工程中心,批号 1054-090402,纯度 98%);甲醇(山东禹王集团化工分公司生产,色谱纯);甲醇(天津市博迪化工有限公司生产,分析纯);磷酸(西安化学试剂厂,分析纯),扶正解毒颗粒由兰州太保制药有限公司提供(批号 090308,090725,091018),水为超纯水(MILLI-Q 超纯水系统,型号 ZMQS52001)。

2 方法与结果

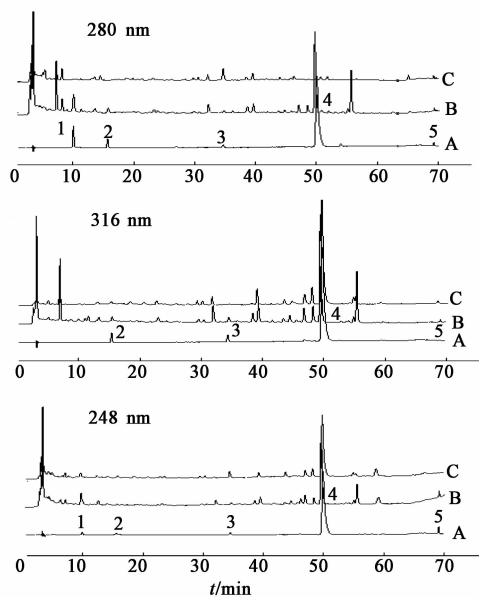
2.1 色谱条件

迪马 ODS- C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),迪马 ODS 保护柱(4.6 mm × 10 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱,流动相组成见表 1,流速 0.8 mL · min⁻¹;2695 二极管阵列检测器(DAD),280 nm 波长测定丹参素、原儿茶醛和丹酚酸 B,316 nm 波长测

定阿魏酸,248 nm 波长测定芒柄花素;柱温 30 °C,进样量 10 μL 。在该色谱条件下,样品中被测成分能够达到基线分离,阴性样品对测定无干扰,见图 1。

表 1 扶正解毒颗粒中 5 种成分梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	15	85
60	55	45
70	85	15
71	100	0



A. 对照品;B. 扶正解毒颗粒制剂;C. 阴性制剂

1. 丹参素;2. 原儿茶醛;3. 阿魏酸;4. 丹酚酸 B;5. 芒柄花素

280 nm 丹参阴性,316 nm 当归阴性,248 nm 红芪阴性

图 1 扶正解毒颗粒 HPLC

2.2 对照品溶液的制备

精密称取丹参素 2.65 mg,原儿茶醛 1.80 mg,阿魏酸 4.45 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,浓度分别为 53,36,89 mg · L⁻¹。精密称取丹酚酸 B 2.72 mg 于 5 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,质量浓度为 544 mg · L⁻¹。精密称取芒柄花素 2.01 mg 于 100 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,质量浓度为 20.1 mg · L⁻¹。上述溶液作为储备液置于冰箱中备用。

2.3 供试品溶液及阴性样品溶液制备

取扶正解毒颗粒粉末,准确称取约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,准确量取甲醇溶液 30 mL,精密称定。超声提取(150 W,40 kHz) 30 min,静置、放冷。用甲醇补足减失质量,摇匀,静置。上清液用 0.45 μm 滤膜过滤即得供

试品溶液,进样 10 μL 。见图 1。

按制剂的制备方法制备缺丹参、缺当归、缺红芪的阴性制剂样品,按上述供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。见图 1。

2.4 线性关系考察 将上述对照品储备液稀释后混合,制备混合对照品溶液。丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸 B 和 芒柄花素质量浓度分别为 1.06, 0.72, 1.78, 108.8, 0.04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。精密吸取混合对照品溶液 0, 5, 10, 20, 30, 40 μL 依次进样,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分为纵坐标 (Y),对照品进样量 (μL) 为横坐标 (X), 绘制标准曲线。

回归方程见表 2。上述回归方程均过原点,可用一点法计算化合物含量。

表 2 扶正解毒颗粒中 5 种成分回归方程与线性范围 ($n = 6$)

测定成分	回归方程	R^2	线性范围/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
丹参素钠	$Y = 24\ 088X - 4\ 539.8$	0.999 8	0 ~ 0.042
原儿茶醛	$Y = 21\ 271X - 218.4$	1	0 ~ 0.028
阿魏酸	$Y = 8\ 030.4X - 519.46$	0.999 8	0 ~ 0.071
丹酚酸 B	$Y = 213\ 339X - 50\ 394$	0.999 8	0 ~ 43.44
芒柄花素	$Y = 5\ 737.5X + 1\ 319.6$	0.999 8	0 ~ 0.001 6

表 3 扶正解毒颗粒加样回收率

成分	称样量/g	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
丹参素	0.253 1	19.06	19.08	38.91	104.04	99.08	1.65
	0.259 1	19.51	19.08	38.1	97.43		
	0.252 1	18.98	19.08	37.56	97.38		
	0.255 4	19.23	19.08	38.6	101.52		
	0.256 3	19.30	19.08	37.25	94.08		
	0.248 7	18.73	19.08	37.82	100.05		
原儿茶醛	0.253 1	3.03	3.24	6.41	104.32	100.72	2.68
	0.259 1	3.10	3.24	6.19	98.46		
	0.252 1	3.01	3.24	6.37	103.70		
	0.255 4	3.06	3.24	6.43	104.01		
	0.256 3	3.07	3.24	6.16	98.46		
	0.248 7	2.98	3.24	6.27	101.54		
阿魏酸	0.253 1	19.48	19.58	39.39	101.69	98.13	2.91
	0.259 1	19.95	19.58	38.67	95.61		
	0.252 1	19.41	19.58	38.91	99.59		
	0.255 4	19.66	19.58	38.69	97.19		
	0.256 3	19.73	19.58	38.21	94.38		
	0.248 7	19.15	19.58	38.79	100.31		
丹酚酸 B	0.253 1	1 154.165	1 140.30	2 299.65	100.45	99.05	2.90
	0.259 1	1 179.353	1 140.30	2 365.05	103.98		
	0.252 1	1 149.605	1 140.30	2 249.67	96.47		
	0.255 4	1 164.653	1 140.30	2 296.87	99.29		
	0.256 3	1 168.757	1 140.30	2 280.25	97.47		
	0.248 7	1 134.100	1 140.30	2 235.98	96.63		
芒柄花素	0.253 1	0.64	0.603	1.24	99.50	99.78	3.55
	0.259 1	0.65	0.603	1.28	104.48		
	0.252 1	0.63	0.603	1.2	94.53		
	0.255 4	0.64	0.603	1.23	97.84		
	0.256 3	0.64	0.603	1.26	102.82		
	0.248 7	0.63	0.6	1.23	99.50		

2.5 稳定性考察 取扶正解毒颗粒供试品溶液分别在 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h, 进样 10 μL , 记录峰面

积,丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸 B 和 芒柄花素的 RSD 分别为 0.78% , 1.20% , 0.68% , 0.43% ,

0.75%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 精密度试验 精密吸取一定浓度的混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD。丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸 B 和 芒柄花素的日内精密度分别为 0.56%, 0.49%, 0.82%, 0.67%, 0.37%; 每天进样 1 次, 连续测定 3 d, 记录峰面积, 测得各个化合物的日间精密度分别为 0.79%, 1.6%, 2.1%, 1.0%, 0.81%。

2.7 重复性试验 取同一批扶正解毒颗粒粉末 6 份, 按样品测定方法测定 5 个化合物的含量, 并计算各成分含量的 RSD。供试品中丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸 B 和 芒柄花素的 RSD 分别为 1.8%, 2.3%, 1.2%, 1.0%, 2.4%。

2.8 回收率试验 准确称取已知含量的扶正解毒颗粒 6 份, 每份 0.25 g 左右, 置具塞锥形瓶中, 精密量取 53 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丹参素 0.36 mL, 36 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的原儿茶醛 0.09 mL, 89 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿魏酸 0.22 mL, 3 258 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丹酚酸 B 0.35 mL, 20.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芒柄花素 0.03 mL。其余操作同 2.3 项下供试品溶液的制备方法。扶正解毒颗粒 5 个化合物的回收率, 见表 3。

2.9 样品测定 精密吸取 2.3 项下供试品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1 项下的色谱条件测定, 每个样品重复测定 3 次, 记录峰面积, 计算样品含量, 见表 4。

表 4 样品中 5 种化合物的测定 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

批次	丹参素	原儿茶醛	阿魏酸	丹酚酸 B	芒柄花素
090308	75.32	11.98	77.00	4 560.11	2.53
090725	67.21	13.36	62.0	3 276.20	2.80
091018	63.86	8.98	60.9	4 210.68	2.10

3 讨论

本试验测定的 5 个化合物都有一定的酸性, 比较了不同浓度甲醇醋酸、甲醇磷酸水溶液, 发现磷酸水溶液作为流动相时可有效抑制拖尾, 综合考虑峰

型和酸性对柱子的影响, 选择 0.05% 磷酸水溶液作为流动相。

通过分别对 5 种成分进行全波长扫描, 丹参素和原儿茶醛在 280 nm 附近有最大吸收, 丹酚酸 B 在 286 nm 有最大吸收, 阿魏酸在 316 nm 有最大吸收, 芒柄花素在 248 nm 有最大吸收。在 280 nm 时阿魏酸和芒柄花素吸收较弱。故选择分别在波长 280 nm 处测定丹参素、原儿茶醛和丹酚酸 B, 在 316 nm 处测定阿魏酸, 在 248 nm 处测定芒柄花素。

本试验选用 HPLC-PDA 首次建立了一次进样, 不同波长检测, 同时测定扶正解毒颗粒中 5 种指标成分含量的方法, 该方法简便快速, 灵敏度高, 重复性好, 结果准确可靠, 可用来全面评价扶正解毒颗粒的质量。

[参考文献]

- [1] 吴红梅, 赵健雄. 中药防治硫酸镍致大鼠睾丸组织损伤的实验研究[J]. 西北国防医学杂志, 2004, 25(3): 176.
- [2] 朱玉真, 赵健雄, 宁守斌, 等. 中医药防治硫酸镍的生殖毒性的实验研究[J]. 中国职业医学, 2000, 27(5): 25.
- [3] 孙应彪, 陈建华, 赵健雄, 等. 中药扶正解毒颗粒对镍致睾丸细胞损伤的拮抗作用研究[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 262.
- [4] 卢文艳, 孙应彪, 常旭红, 等. 扶正解毒颗粒对硫酸镍致大鼠睾丸细胞 ATP 酶活力的影响[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(2): 134.
- [5] 魏自太, 赵健雄. 扶正解毒颗粒治疗长期接触镍的冠心病患者的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(5): 418.
- [6] 魏自太, 赵健雄. 扶正解毒颗粒与西药结合治疗 60 例长期接触镍的冠心病患者的临床研究[J]. 中成药, 2008, 30(2): 167.

[责任编辑 蔡仲德]