HPLC 同时测定病窦灵口服液中淫羊藿苷和丹酚酸 B 的含量

陈晶[1],马丹[1],赵陆华[1*],王淑云[2](1. 中国药科大学分析测试中心,南京 210009;2. 江苏省中医院,南京 210029)

摘要:目的 建立一种反相高效液相色谱法,同时测定病窦灵口服液中的 2 种有效成分。**方法** 采用 Alltech C_{18}柱,乙腈(A)-0.2% 冰醋酸(B)溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min^{-1},检测波长 270 nm,柱温 30 ℃。**结果** 采用 HPLC 检测制剂中丹酚酸 B 和淫羊藿苷的含量,其线性关系良好,线性范围分别为:25.81 ~ 413.0 μg·mL^{-1},2.97 ~ 59.36 μg·mL^{-1},丹酚酸 B 回收率为 99.77%,RSD 为 0.5%;淫羊藿苷回收率为 100.1%,RSD 为 2.3%。**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:高效液相色谱法;病窦灵口服液;丹酚酸 B;淫羊藿苷

中图分类号:R917.101;R917.792 **文献标识码:**B **文章编号:**1007-7693(2009)04-0302-03

Simultaneous Determination of Salvianolic Acid B, Icariin in Bindouling Oral Liquid by HPLC

CHEN Jing[1], MA Dan[1], ZHAO Luhua[1*], WANG Shuyun[2] (1. *Center for Instrumental Analysis of China Pharmaceutical University, Nanjing* 210009, *China*; 2. *Jiangsu Provincial TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of TCM, Nanjing* 210029, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneously determining effective components in Bindouling oral liquid by RP-HPLC. **METHODS** HPLC analysis was performed on Alltech C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mixture of acetonitrile (A) and 0.2% acetic acid-water (B) as mobile phase in gradient mode. The column temperature was set at 30 ℃ and the flow rate was 1.0 mL·min^{-1} with the wavelength at 270 nm. **RESULTS** The two effective components could be detected by this method, and their contents could be determined. A good linearity of salvianolic acid B, icariin was in the range of 25.81 – 413.0 μg·mL^{-1}, 2.97 – 59.36 μg·mL^{-1}, respectively. The average recoveries were 99.77% and 100.1% with RSD of 0.5% and 2.3%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, feasible and reliable. It can be used for the quality control of Bindouling oral liquid.

KEY WORDS: HPLC; Bindouling oral liquid; salvianolic acid B; icariin

病窦灵口服液由淫羊藿、丹参、黄芪、熟地黄、红参、甘草等 7 味中药精制而成,具有益气温阳、养血通

作者简介:陈晶,女,硕士生 ***通信作者:**赵陆华,女,副研究员 Tel:(025)83271185 E-mail:zhaoluhua@hotmail.com

脉等作用,用于病态窦房结综合征。临床应用近 10 年,效果明显。淫羊藿和丹参为其中君药,淫羊藿苷(icariin)和丹酚酸 B(salvianolic acid B)分别是淫羊藿和丹参的主要成分。淫羊藿苷属于黄酮类化合物,具有抗氧化、保护血管内皮细胞、促进人成骨细胞增殖和分化及提高性机能等药理作用;丹参水溶性成分丹酚酸 B 具有改善冠状循环、抑制血栓性疾病和抗氧化损伤之功效。因此,制剂中淫羊藿苷和丹酚酸 B 的含量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,但同时测定这两种成分的方法未见报道。为了快速、简便地的测定中药复方中的活性成分,笔者建立了高效液相色谱法同时测定病窦灵口服液中淫羊藿苷、丹酚酸 B 的含量。

1 仪器与试药

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、冰醋酸为分析纯(南京化学试剂一厂),乙腈为色谱纯(tedia),水为纯净水。淫羊藿苷(0737-200111)、丹酚酸 B(111562-200403)标准品购自于中国药品生物制品检定所。所用药材购于南京先声药业,经中国药科大学宋学华教授鉴定。病窦灵口服液(购于江苏省中医院,批号:051214-051216-051218)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Alltech C_{18}色谱柱(4.6 mm ×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2% 冰醋酸溶液(B),梯度洗脱 A 相 0 ~ 15 min(10% ~20%),15 ~40 min(20% ~ 35%),40 ~50 min(35% ~55%);柱温:30 ℃;检测波长:270 nm;流速 1.0 mL · min^{-1}。灵敏度 0.02 AUFS;理论板数按淫羊藿苷计算不低于 4 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取淫羊藿苷、丹酚酸 B 对照品,加甲醇溶解,配制成含淫羊藿苷 118.72 μg · mL^{-1},丹酚酸 B 413 μg · mL^{-1}的对照品储备溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取病窦灵口服液 10 mL,至 25 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL,超声 10 min,放置至室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,弃初滤液,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方及生产工艺分别模拟制备不含淫羊藿和丹参的阴性样品,按“2.2.2”项下操作,制得阴性样品溶液。

2.3 专属性考察

取上述样品溶液、阴性样品溶液和对照品贮备液的稀释液,用 0.45 μm 滤膜滤过,按上述色谱条件进样,测绘 HPLC 图谱,结果见图 1。由图可见,样品中的淫羊藿苷、丹酚酸 B 与其他组分可达到基线分离,阴性样品在淫羊藿苷、丹酚酸 B 相应的保留时间出峰处无干扰。

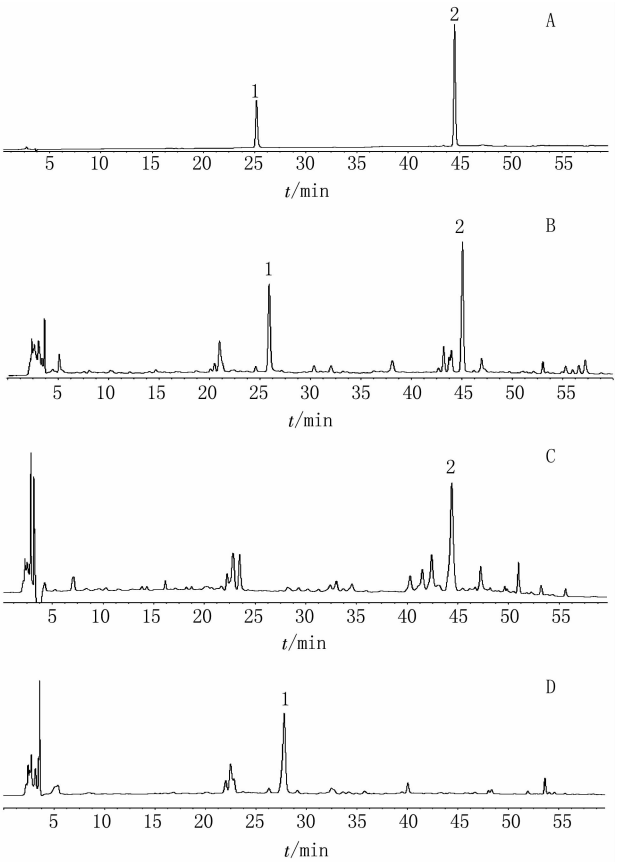

图 1 HPLC 色谱图

A - 对照品混合物;B - 病窦灵口服液;C - 缺丹参阴性样品;D - 缺淫羊藿阴性样品;1 - 丹酚酸 B;2 - 淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A - standard samples; B - Bindouling oral liquid; C - blank sample (salvia miltiorrhiza); D - blank sample(Herba Epimedii); 1 - salvianolic acid B; 2 - icariin

2.4 标准曲线的制备及线性关系考察

精密量取上述对照品贮备液,配制成含淫羊藿苷 2.97,7.42,14.84,29.68,59.36 μg · mL^{-1},丹酚酸 B 25.81,51.62,103.2,206.5,413.0 μg · mL^{-1}的混合对照品溶液,摇匀。分别取上述溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以淫羊藿苷、丹酚酸 B 浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,得回归方程。淫羊藿苷的回归方程为 $Y = 65\,011X + 29\,975$,$r = 0.999\,1$;丹酚酸 B 的回归方程为 $Y = 16\,883X - 41\,644$,$r = 0.999\,8$。结果表明,淫羊藿苷在 2.97 ~ 59.36 μg · mL^{-1},丹酚酸 B 在 25.81 ~

413.0 μg·mL^{-1},呈良好的线性关系。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取同一对照品溶液,重复进样6次,以峰面积值计算RSD,淫羊藿苷、丹酚酸B分别为0.94%,0.71%。表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品10 mL,精密量取,共6份进行测定,以含量测定结果计算RSD,淫羊藿苷、丹酚酸B分别为1.75%,1.43%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

将同一供试品溶液,分别于制备后2,4,6,8,24,48 h依法测定,结果以峰面积值计算RSD,淫羊藿苷、丹酚酸B分别为0.26%,0.57%,表明供试品溶液在48 h内基本稳定。

2.8 回收率试验

精密称取已知含量的同一批号的样品5 mL,共9份,加入适量丹酚酸B及淫羊藿苷对照品,按"2.2.2"项下制备方法制备,依所述方法测定含量,计算回收率,结果见表1、2。

表1 丹酚酸B加样回收试验结果(n=9)

Tab 1 Revcovery of salvianolic acid B(n=9)

序号	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	1.458	0.708	2.162	99.44		
2	1.458	0.708	2.158	98.87		
3	1.458	0.708	2.173	100.99		
4	1.458	1.416	2.866	99.44		
5	1.458	1.416	2.879	100.4	99.68	0.6
6	1.458	1.416	2.863	99.22		
7	1.458	2.124	3.572	99.53		
8	1.458	2.124	3.580	99.91		
9	1.458	2.124	3.568	99.34		

表2 淫羊藿苷加样回收试验结果(n=9)

Tab 2 Revcovery of icariin(n=9)

序号	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.500	0.238	0.736	99.15		
2	0.500	0.238	0.739	100.42		
3	0.500	0.238	0.737	99.57		
4	0.500	0.475	0.980	101.05		
5	0.500	0.475	0.978	100.63	99.98	0.7
6	0.500	0.475	0.971	99.16		
7	0.500	0.713	1.208	99.30		
8	0.500	0.713	1.218	100.70		
9	0.500	0.713	1.212	99.86		

2.9 样品测定

取3批样品,按上述方法处理,并测定以峰面积外标法计算含量,结果见表3。

表3 病窦灵口服液中丹酚酸B、淫羊藿苷的含量(n=3)

Tab 3 Determination of salvianolic acid B and icariin in samples(n=3)

批号	丹酚酸B/mg·瓶$^{-1}$	淫羊藿苷/mg·瓶$^{-1}$
051214	2.916	1.000
051216	2.956	1.001
051218	2.993	0.976

3 讨论

3.1 样品的提取方法选用了甲醇超声提取,这样可以沉淀样品中多余的糖及部分杂质,经考察,超声10 min后进样,样品峰无杂质干扰,方法简便,适用于该制剂的含量测定。

3.2 参考相关文献[1-3],本试验曾试用甲醇-醋酸,乙腈-醋酸,乙腈-甲酸等系统,最终以乙腈-0.2%冰醋酸溶液系统分离效果最好。因丹酚酸B与淫羊藿苷极性差别较大,故考虑应用梯度洗脱,分离效果理想,重复性好,因此本测定方法可用于病窦灵口服液中有效成分的含量测定。

3.3 多指标成分的分离测定对于复方中药的质量控制具有重要意义。在该方中,淫羊藿强心温肾,对心肌细胞有明显的保护作用[4],丹参养血、活血,共同起温补心肾气血阴阳、通脉作用。本试验建立了HPLC同时测定病窦灵口服液中的淫羊藿与丹参的2种指标成分,相对于单指标的测定,该法可以直接表征病窦灵口服液的质量。

REFERENCES

[1] Ch. P(2005) Vol Ⅰ(中国药典2005年版.一部)[S]. 2005:52,229.

[2] ZHAO L H, HUANG C Y, SHAN Z, et al. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS[J]. J Chromatogr B, 2005,821(1):67-68.

[3] JIANG L H, XU T S, CHEN X X, et al. A study on the HPLC method for salvianolic acid B in Radix Salviae Miltiorrhizae[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2007,18(6):1395-1396.

[4] PAN Z W, WANG Q J, LIU R M, et al. Protective effects of preconditioning of icariin on neonatal rat cardiomyocytes[J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报),2007,38(1):73-76

收稿日期:2007-08-01