

HPLC 同时测定冠心康颗粒中芍药苷、丹酚酸 B 和羟基红花黄色素 A 的含量

喻录容, 何先元*, 黄英如(重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331)

摘要: 目的 建立同时测定冠心康颗粒中芍药苷、丹酚酸 B 和羟基红花黄色素 A 含量的方法。方法 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.1%磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 230 nm。结果 芍药苷在 7.02~52.64 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系($r=0.999\ 7$), 平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.2%; 丹酚酸 B 在 23.19~173.90 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系($r=0.999\ 7$), 平均回收率为 98.2%, RSD 为 1.1%; 羟基红花黄色素 A 在 4.47~33.50 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系($r=0.999\ 3$), 平均回收率为 98.0%, RSD 为 1.0%。结论 本法简便、灵敏、准确、重复性好, 可用于冠心康颗粒的质量控制。

关键词: 冠心康颗粒; 芍药苷; 丹酚酸 B; 羟基红花黄色素 A; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2015)05-0561-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.010

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Salvianolic Acid B and Hydroxysafflor Yellow A in Guanxinkang Granules by HPLC

YU Lurong, HE Xianyuan*, HUANG Yingru(Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a simultaneous determination method for paeoniflorin, salvianolic acid B and hydroxysafflor yellow A in Guanxinkang granules. **METHODS** The determination was performed on a Welchrom C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile(A)-0.1% phosphoric acid(B) as the mobile phase in gradient elution mode at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 230 nm. **RESULTS** Paeoniflor presented a good linearity in the concentration range of 7.02~52.64 μg·mL⁻¹. The average rate of recovery was 99.3 % with RSD of 1.2%. Salvianolic acid B presented a good linearity in the concentration range of 23.19~173.90 μg·mL⁻¹. The average rate of recovery was 98.2% with RSD of 1.1%. Hydroxysafflor yellow A presented a good linearity in the concentration range of 4.47~33.50 μg·mL⁻¹. The average rate of recovery was 98.0% with RSD of 1.0%. **CONCLUSION** This method was simple, accurate and reproducible, it can be used as the basis for quality control of Guanxinkang granules.

KEY WORDS: Guanxinkang granules; paeoniflorin; salvianolic acid B; hydroxysafflor yellow A; HPLC

冠心康颗粒收载于中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十九册, 由赤芍、丹参、降香、红花、川芎组成, 具有活血行气, 化瘀止痛的功效, 临床用于治疗血瘀气滞、心脉痹阻所致冠心病、心绞痛。原标准中无鉴别及含量测定项^[1], 无法有效控制其质量。对于冠心康颗粒质量标准或含量控制的研究多有报道^[2-3], 多以芍药苷或丹酚酸 B 作为单一质控成分。本实验参考有关文献^[4-9], 对样品处理方法和色谱分离系统进行优化, 同时对方中 3 味主药的特征性活性成分芍药苷、丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A 的含量进行测

定, 从而在简化检测步骤、节约检测资源的情况下, 更好地控制该药品的质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配四元梯度泵, G1314F 紫外检测器); BP-211D 电子天平(德国赛多利斯); KQ-300DE 型数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司)。

冠心康颗粒(市售)。芍药苷对照品(批号: 110736-201035, 含量: 96.5%)、丹酚酸 B 对照品(批号: 111562-201110, 含量: 98.0%)、羟基红花黄色素 A(批号: 111637-200905, 含量: 91.8%)均购

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373668); 重庆市卫生局科技项目(2012-2-144)

作者简介: 喻录容, 女, 硕士, 讲师 Tel: 13350383721 E-mail: 136817118@qq.com *通信作者: 何先元, 男, 硕士, 教授 Tel: 13647653516 E-mail: yulurong1976@163.com

自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯, Welch Materials Inc.);磷酸(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welchrom C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸(B), 梯度洗脱(0~12 min, 12%A, 12~20 min, 12A%→34%A, 20~30 min, 34%A, 30~35 min, 34A%→12%A); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 ℃; 进样量: 10 μL。理论板数按羟基红花黄色素 A 峰计算应≥4 000, 各峰之间分离度应符合要求。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 18.18 mg、羟基红花黄色素 A 对照品 12.16 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 75%甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密称取丹酚酸 B 对照品 23.66 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加上述溶液使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液(浓度: 芍药苷 0.350 9 mg·mL⁻¹, 羟基红花黄色素 A 0.223 3 mg·mL⁻¹, 丹酚酸 B 1.159 3 mg·mL⁻¹), 精

密度量取 3 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加 75%甲醇至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量, 研细, 精密称取 0.25 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75%甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 75%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按“2.2.2”项下方法按药品处方分别制备不含赤芍、丹参、红花的阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件分别进样, 结果供试品色谱中, 在与芍药苷、丹酚酸 B 和羟基红花黄色素 A 对照品色谱相同的保留时间处有色谱峰, 与其他组分能达到有效分离, 分离度均>1.5, 理论板数分别为 6 215, 9 387, 11 251, 阴性对照色谱中, 在与芍药苷、丹酚酸 B 和羟基红花黄色素 A 对照品色谱峰相应的位置上无干扰峰, 说明供试品溶液中的其他成分对测定结果无影响, 见图 1。

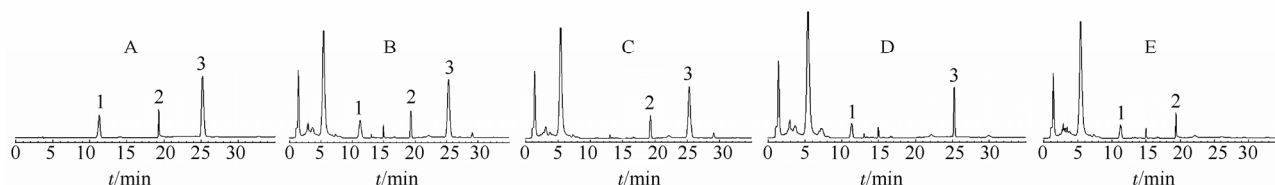


图 1 对照品(A)、供试品(B)、缺红花阴性对照(C)、缺赤芍阴性对照(D)、缺丹参阴性对照(E)高效液相色谱图
1-羟基红花黄色素 A; 2-芍药苷; 3-丹酚酸 B。

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances(A), sample(B), negative sample without Carthami Flos(C), negative sample without Paeoniae Radix Rubra(D) and negative sample without Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma(E)
1-hydroxysafflor yellow A; 2-paeoniflorin; 3-salvianolic acid B.

2.4 线性关系的考察

精密量取“2.2.1”项下的对照品储备液 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 75%甲醇至刻度, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件测定, 以浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标, 测得的 3 种成分的峰面积为纵坐标, 分别绘制标准曲线, 求得芍药苷回归方程为 $Y=12.515\ 6X-2.779\ 7$, $r=0.999\ 7(n=6)$, 丹酚酸 B 回归方程为 $Y=10.069\ 7X+1.573\ 9$, $r=0.999\ 7(n=6)$, 羟基红花黄色素 A 回归方程为 $Y=16.383\ 7X-8.101\ 8$, $r=0.999\ 3(n=6)$, 结果表明, 芍药苷、丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A 分别在 7.02~52.64, 23.19~173.90, 4.47~33.50 μg·mL⁻¹

内呈良好的线性关系。

2.5 仪器精密度试验

取“2.2.1”项下的对照品溶液, 进样量 10 μL, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果芍药苷、丹酚酸 B 和羟基红花黄色素 A 的峰面积 RSD 分别为 0.8%, 1.5%, 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批号样品 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 以“2.1”项下色谱条件测定每份样品中 3 种成分的含量, 结果芍药苷、丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A 的含量 RSD 分别为 1.0%, 1.0%, 1.6%, 说明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别在 0，2，5，8，12 h 进样测定峰面积，结果其 3 种成分的峰面积 RSD 分别为 1.6%，1.2%，1.7%。表明制备的供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测得含量(芍药苷 2.835 mg·g⁻¹，丹酚酸 B 9.362 mg·g⁻¹，羟基红花黄色素 A 1.786 mg·g⁻¹)的冠心康颗粒 6 份，每份 0.125 g，分别精密加入“2.2.1”项下的对照品储备液各 1.0 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样 10 μL 测定，计算回收率，结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery tests(n=6)

成分	取样量/ g	含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	加样回 收率/%	RSD/ %
芍 药 苷	0.125 3	0.355 2	0.350 9	0.699 0	0.979 8	99.3	1.2
	0.124 1	0.351 8	0.350 9	0.704 5	1.005 1		
	0.125 9	0.356 9	0.350 9	0.706 2	0.995 4		
	0.123 8	0.351 0	0.350 9	0.694 5	0.978 9		
	0.126 2	0.357 8	0.350 9	0.705 6	0.991 2		
	0.125 5	0.355 8	0.350 9	0.708 8	1.006 0		
丹 酚 酸 B	0.125 3	1.173 1	1.159 3	2.318 4	0.987 9	98.2	1.1
	0.124 1	1.161 8	1.159 3	2.285 3	0.969 1		
	0.125 9	1.178 7	1.159 3	2.310 3	0.976 1		
	0.123 8	1.159 0	1.159 3	2.290 2	0.975 8		
	0.126 2	1.181 5	1.159 3	2.341 3	1.000 4		
	0.125 5	1.174 9	1.159 3	2.315 6	0.984 0		
羟 基 红 花 黄 色 素 A	0.125 3	0.223 8	0.223 3	0.442 2	0.978 1	98.0	1.0
	0.124 1	0.221 6	0.223 3	0.439 6	0.976 3		
	0.125 9	0.224 9	0.223 3	0.441 2	0.968 7		
	0.123 8	0.221 1	0.223 3	0.438 5	0.973 6		
	0.126 2	0.225 4	0.223 3	0.444 9	0.983 0		
	0.125 5	0.224 1	0.223 3	0.446 8	0.997 3		

2.9 样品测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件实验，测定了不同厂家共 9 批样品中 3 种成分的含量，结果见表 2。

从所测得的结果可以看到，9 批样品在 3 种成分的含量上都有所差别，但尤以羟基红花黄色素 A 的含量上差别较大，可能与红花在成药质量标准中较少被检测有关，所以很有必要对其合理定量从而监管该药品的质量。

表 2 不同批次样品中 3 种成分的含量测定结果(n=3)

Tab. 2 Determination results of the three components in Guanxinkang granules(n=3)

厂家	批号	mg·g ⁻¹		
		芍药苷 含量	丹酚酸 B 含量	羟基红花黄 色素 A 含量
A	20130519	2.611	8.249	0.523
A	20130622	2.326	9.157	0.685
A	20130806	2.715	7.766	0.592
B	20131016	2.846	9.370	1.773
B	20131125	2.981	9.064	1.605
B	20131222	3.134	8.790	1.377
C	20131209	2.305	9.238	1.760
C	20140310	2.569	8.792	1.464
C	20140328	2.213	8.251	1.479

3 讨论

在提取溶剂的选择上，根据 3 种成分的溶解性，本实验考察了 30%乙醇，甲醇，50%甲醇及 75%甲醇几种溶剂，结果以 75%甲醇提取所得可更好地兼顾 3 种成分的含量，遂确定以 75%甲醇为提取溶剂。因丹酚酸 B 对热不太稳定，故未采用回流而采用超声方式提取，实验发现超声提取 25 min 后，3 种成分的含量无明显增加，所以将提取时间定为 30 min。对比乙腈-0.5%甲酸溶液，乙腈-0.025 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液，甲醇-0.2%冰醋酸溶液及乙腈-0.1%磷酸溶液几种流动相，结果以乙腈-0.1%磷酸溶液在梯度洗脱条件下可获得更稳定的基线及更少的杂质峰，故将乙腈-0.1%磷酸溶液定为本实验流动相。

多成分同时检测中，很多需要采用转换波长的方式以期取得好的效果^[5-6]。本实验过程中发现，以芍药苷的最大吸收波长 230 nm 作为单一检测波长，其他 2 种成分亦吸收稳定，响应信号良好，线性范围满足实验需要，故放弃了繁琐的多波长转换，采用单波长检测，便于该方法更广泛地应用。

方中另一味药川芎所含的特征性成分阿魏酸，理论上亦可同时检测，但在实验过程中发现其含量太低，与其他几种成分悬殊太大，不宜准确定量。可能是由于阿魏酸在川芎中本身含量就偏低且性质不稳定^[10-11]，以致在成药中检测困难，难于定量，故最终舍弃了阿魏酸，仅做 3 种成分的检测。

REFERENCES

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十九册[S]. 1998: 108.

- [2] ZHENG J F, ZHENG A L, GAI K. Determination of paeoniflorin in Guanxinkang granules by HPLC [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2011, 25(4): 377-378, 381.
- [3] ZHANF X M, HE X Y. Study on quality standard for Guanxinkang granules [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2010, 24(4): 380-382.
- [4] WANG Z S, HAN G R, GAO F, et al. Rapid TLC identification and simultaneous determination of stilbene glucoside and salianolic acid B for Guidan Shaji capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(8): 886-889.
- [5] LI Y, GUO Z T, GONG X C, et al. Simultaneous determination of danshensu, hydroxysafflor yellow A, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B in water extract of mixed Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Carthami Flos by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(11): 1653-1656
- [6] YAN G Y, DONG J N, YANG Y, et al. Simultaneous determination of six components in Xinnaokang capsules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(8): 1672-1675.
- [7] JIA X. Determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and cryptotanshinone in Niasai Tong tablets by HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2014, 29(1): 77-79.
- [8] WANG Y Z. Simultaneous determination of paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A and ferulic acid in Xielong Liquor by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(10): 1925-1928.
- [9] 王彦英, 申玲玲, 杜光. 丹参舒心胶囊中丹酚酸 B 的含量测定[J]. 医药导报, 2013, 32 (3): 375-377.
- [10] XU Z S, ZAI B C, ZHANG X. Research of the stability of ferulic acid in Rhizoma Chuanxiong [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2004, 18(2): 25-27.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2010: 38, 124.

收稿日期: 2014-11-16

HPCE 与 HPLC 测定科博肽注射液含量的方法比较

胡亦沁¹, 李元圆², 徐骏军¹, 李范珠^{1*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省医药高等专科学校, 杭州 310053)

摘要: 目的 系统地比较高效毛细管电泳法(HPCE)和高效液相色谱法(HPLC)在测定科博肽注射液含量方面的差异。方法 HPCE 分离条件为: 未涂层毛细管柱(50 $\mu\text{m} \times 40 \text{ cm}$, 有效长度 30 cm), 运行缓冲液为 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 2.5), 分离电压 20 kV, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 200 nm; HPLC 分离条件为: Aeris PEPTIDE XB-C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.6 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 200 nm, 流动相 A: 0.1%三氟乙酸-水、流动相 B: 0.1%三氟乙酸-乙腈, 梯度洗脱。结果 科博肽在 HPLC 和 HPCE 各自的分离条件下进样浓度分别在 17.33~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1.08~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内表现出良好的线性关系(r 均为 0.999 7), 平均加样加收率分别为 100.3%和 99.3%, RSD 分别为 0.7%和 1.2%。结论 HPCE 与 HPLC 均可用于科博肽注射液的含量测定, 但 HPCE 在使用成本、分离时间、检出限等方面更具有优势。

关键词: 高效毛细管电泳法; 高效液相色谱法; 科博肽

中图分类号: R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)05-0564-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.011

Comparison of Determination of Cobratide Injection by HPCE and HPLC

HU Yiqin¹, LI Yuanyuan², XU Junjun¹, LI Fanzhu^{1*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare HPCE method and HPLC method for determining the content of Cobratide injection. **METHODS** In HPCE analysis, an uncoated fused silica capillary(50 $\mu\text{m} \times 40 \text{ cm}$, effective length 30 cm) was used, with 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer(pH=2.5) as the running buffer under the voltage of 20 kV at 25 $^{\circ}\text{C}$, and the detection wavelength was 200 nm. In HPLC method, the separation was performed on an Aeris PEPTIDE XB-C₁₈ column(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.6 μm) under the temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$ with 0.1% TFA-H₂O and 0.1% TFA-CH₃CN as the mobile phase at flow rate of 0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detection wavelength was set at 200 nm. **RESULTS** The linear range of HPLC and HPCE were 17.33~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 7$) and 1.08~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 7$), respectively. Their average recoveries were 100.3% and 99.3% with RSD of 0.7% and 1.2%, relatively. **CONCLUSION** Both methods can be applied to determine the content of Cobratide injection, but

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274089, 81473361)

作者简介: 胡亦沁, 女, 硕士生 Tel: (0571)86633030 E-mail: qqb702@163.com

*通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授 Tel:

(0571)86633030 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn