

HPLC-ELSD法同时测定地奥心血康胶囊中 3种有效成分

冉薇¹, 王铁杰², 梁丽娟¹, 张庆华², 李军², 陈晓辉¹, 毕开顺^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016 2 深圳市药品检验所, 深圳 518029)

摘要 目的: 建立同时测定地奥心血康胶囊中原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷 3种成分含量的 HPLC-ELSD 分析方法。方法: 采用 Shim-pack VP- ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) - 水 (B) (0~15 min B 75% → 71%; 15~25 min B 71%; 25~45 min B 71% → 65%; 45~65 min B 65% → 40%; 66 min B 30%; 66~75 min B 30% → 0%) 为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 35℃。采用蒸发光散射检测器, 漂移管的温度为 105℃, 气体 (空气) 流速为 2.7 L·min⁻¹。结果: 原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷的线性范围分别为 1.021~10.21 μg ($r=0.9999$), 1.029~10.29 μg ($r=0.9995$) 和 1.074~10.74 μg ($r=0.9998$), 平均回收率 ($n=9$) 依次为 99.2% (RSD=2.0%), 101.9% (RSD=1.5%) 和 100.7% (RSD=2.0%)。结论: 本方法简便、准确、重现性好, 可用于地奥心血康胶囊中原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷的含量测定。

关键词: HPLC-ELSD; 地奥心血康胶囊; 原薯蓣皂苷; 甲基原薯蓣皂苷; 薯蓣皂苷; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0420-03

HPLC-ELSD simultaneous determination of 3 components in Diaoxinxuekang capsules

RAN Wei¹, WANG Tie-jie², LIANG Li-juan¹, ZHANG Qing-hua²,

LI Jun², CHEN Xiao-hui¹, BIKai-shun^{1*}

(1. College of Pharmacy Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China

2. Shenzhen Institute for Drug Control Shenzhen 518029, China)

Abstract Objective To develop a new quantitative analysis method for the simultaneous determination of protodioscin, methylprotodioscin and dioscin in Diaoxinxuekang capsules by HPLC-ELSD. **Methods** A Waters Alliance 2695 HPLC (Empower workstation) was used with Alltech 2000 ELSD as detector. The samples were separated with a Shim-pack VP- ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile (A) and water (B) under gradient conditions (0-15 min B 75% → 71%; 15-25 min B 71%; 25-45 min B 71% → 65%; 45-65 min B 65% → 40%; 66 min B 30%; 66-75 min B 30% → 0%). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ and the column temperature was 35℃. The drift tube temperature of the evaporative light-scattering detector was 105℃ and carrier air flow rate 2.7 L·min⁻¹. **Results** The linear ranges of protodioscin, methylprotodioscin and dioscin were 1.021-10.21 μg ($r=0.9999$), 1.029-10.29 μg ($r=0.9995$) and 1.074-10.74 μg ($r=0.9998$), respectively. The average recoveries ($n=9$) of protodioscin, methylprotodioscin and dioscin were 99.2% (RSD=2.0%), 101.9% (RSD=1.5%) and 100.7% (RSD=2.0%), respectively. **Conclusion** Protodioscin, methylprotodioscin and dioscin in Diaoxinxuekang capsules can be simultaneously determined by this method established which is simple, accurate and reproducible. **Key words** HPLC-ELSD, Diaoxinxuekang capsules, protodioscin, methylprotodioscin, dioscin, determination of content

地奥心血康胶囊为薯蓣科植物黄山药 *Dioscorea panthaica* et Burkill 穿龙薯蓣 *Dioscorea niponica* Makino 的根茎提取物经加工制成的胶囊。为《中国

药典》2005年版所收载的中成药制剂。具有活血化瘀, 行气止痛, 扩张冠脉血管, 改善心肌缺血的作用。主要用于预防和治疗冠心病、心绞痛以及淤血内阻

* 通讯作者 Tel: (024) 23986016 E-mail address: bikaishun@yahoo.com

之胸痹、眩晕、气短、心悸、胸闷或痛等病症^[1]。其主要活性成分为甾体皂苷类。甾体皂苷类成分分子式中没有共轭结构,所以采用紫外检测法效果较差。故本文采用蒸发光散射检测器作为检测手段,建立地奥心血康胶囊中原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷 3 种成分的高效液相-蒸发光散射同时检测方法^[2-3]。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:美国 Waters Alliance 2695 四元梯度泵, Alltech-2000 蒸发光散射检测器; Empower 色谱工作站; 深圳波达 PTS-1002 超声仪; Millipore 纯水器; METTLE TOLEDO AG285 电子天平。

原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷对照品:自制,经 UV, IR, HNMR 测试鉴定, HPLC 检测为单峰,归一化法计算纯度达 98% 以上。地奥心血康胶囊样品均为市售,批号:0702035, 0703007, 0704017, 0704060, 0704069, 乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈 (A)-水 (B) (0~15 min B: 75% → 71%; 15~25 min B: 71%; 25~45 min B: 71% → 65%; 45~65 min B: 65% → 40%; 66~75 min B: 30%; 66~75 min B: 30% → 0%); 流速:0.8 mL·min⁻¹; 气体 (空气) 流速:2.7 L·min⁻¹; 雾化温度:105 °C; 柱温:35 °C; 进样体积:10 μL。

在该色谱条件下,原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷色谱峰与相邻色谱峰分离度大于 1.5, 理论塔板数按原薯蓣皂苷计算不低于 20000。

3 溶液的制备

3.1 对照品混合溶液 精密称取原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷对照品适量,加甲醇制成浓度分别为 1.021, 1.029, 1.074 mg·mL⁻¹ 的对照品混合溶液,冰箱内保存,备用。

3.2 供试品溶液 称取地奥心血康胶囊内容物 0.2 g 精密称定,置具塞三角瓶中,加 10 倍量的甲醇超声 (功率:120 W, 超声频率:40 KHz) 处理 30 min, 取出,滤过,减压挥干溶剂,残渣加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,摇匀后过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

4 干扰性试验

依地奥心血康胶囊处方制备不含黄山药和穿龙薯蓣的阴性样品,按“3.2”项下方法制备阴性样品溶液,结果表明处方中辅料对原薯蓣皂苷、甲基原薯

蓣皂苷和薯蓣皂苷的测定无干扰^[4]。阴性样品、对照品和样品色谱图见图 1。

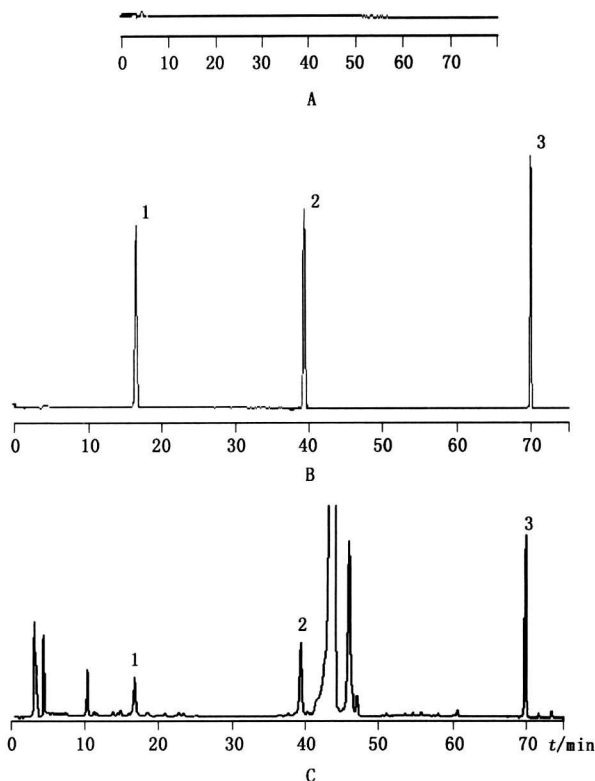


图 1 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 阴性样品 (negative sample without *Dioscorea Panthaica* et Burkill and

Dioscorea niponica Makino) B. 对照品 (chemical reference substances)

C. 样品 (sample)

1. 原薯蓣皂苷 (protodioscin) 2. 甲基原薯蓣皂苷 (methylprotodioscin) 3. 薯蓣皂苷 (dioscin)

5 线性关系考察

分别精密量取上述对照品混合溶液 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.5, 10 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,分别进样 10 μL,以峰面积的自然对数为纵坐标,进样量 (μg) 的自然对数为横坐标,回归计算,原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷的线性方程分别为:

$$Y = 1.6160X + 8.3847 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 1.8974X + 8.1821 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 1.9946X + 9.9665 \quad r = 0.9998$$

实验结果表明,原薯蓣皂苷进样量在 1.021~10.21 μg,甲基原薯蓣皂苷进样量在 1.029~10.29 μg,薯蓣皂苷进样量在 1.074~10.74 μg 范围内分别具有良好的线性关系。

6 精密度试验

称取批号为 0702035 的样品 0.2 g 精密称定,按“3.2”项制备供试品溶液,进样 10 μL,重复进样

6次,测定原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷峰面积值, RSD分别为 0.8% ($n=6$)、1.2% ($n=6$)和 1.6% ($n=6$),表明精密度较好。

7 重复性试验

称取批号为 0702035 的样品 0.2 g(平均粒重 0.1967 g),共 6份,精密称定,按“3.2”项制备供试品溶液,进样 10 μ L测定,分别测得峰面积值,测得原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷的平均含量分别为 5.98 6.47 36.53 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$, RSD分别为 1.4%, 0.8%和 1.7%。说明本实验方法重复性良好。

8 稳定性试验

称取批号为 0702035 的样品 0.2 g共 5份,精

密称定,按“3.2”项制备供试品溶液,分别于 Q 2 4 8 12 24后进样,每次 10 μ L,测定原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷峰面积值,结果表明,供试品溶液在 24 h内稳定,原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷 RSD分别为 1.3%, 1.7%和 1.1%。

9 回收率试验

称取已知原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷含量的批号为 0702035的样品 0.1 g(平均粒重 0.1967 g),共 9份,精密称定,3份为一组,每组按低、中、高浓度分别精密加入原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷对照品,依“3.2”项下方法操作,进样 10 μ L测定。结果见表 1。

表 1 HPLC方法的回收率 ($n=3$)

Tab 1 Recovery of the HPLC method

成分 (component)	样品含量 (content) /mg	加入量 (added) /mg	测得量 (determined) /mg	回收率 (recovery) %	平均回收率 (mean recovery) %	RSD %
原薯蓣皂苷 (protodioscin)	3.14	2.53	5.61	97.4	99.2	1.4
	3.15	3.15	6.33	101.2		2.1
	3.15	3.77	6.89	99.1		1.2
甲基原薯蓣皂苷 (methylprotodioscin)	3.40	2.82	6.23	100.5	101.9	0.9
	3.40	3.48	7.01	103.6		1.0
	3.42	4.11	7.59	101.7		2.3
薯蓣皂苷 (dioscin)	19.21	15.42	34.44	98.8	100.7	2.1
	19.23	19.18	38.87	102.4		1.8
	19.24	23.10	42.55	100.9		1.7

10 样品测定

按所拟定“3.2”项操作,处理 5批样品,制备所需的供试品溶液,在上述色谱条件下进行原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷含量测定,结果见表 2。

表 2 5批地奥心血康胶囊中各成分的含量 ($\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$, $n=3$)

Tab 2 Content of different compounds for 5 batches
Diàoxinxuekang capsules (mg per capsule, $n=3$)

批号 (Lot No.)	原薯蓣皂苷 (protodioscin)	甲基原薯蓣皂苷 (methylprotodioscin)	薯蓣皂苷 (dioscin)
0702035	5.98 (1.0)	6.47 (1.4)	36.53 (0.7)
0703007	6.77 (1.3)	7.87 (1.5)	34.29 (1.1)
0704017	5.69 (1.7)	8.40 (2.0)	37.78 (1.5)
0704060	7.02 (1.3)	7.57 (0.8)	39.49 (2.1)
0704069	6.90 (2.0)	8.63 (1.1)	39.56 (1.9)

注:括号内为 RSD 值 (%)

Note: RSD (%) in the parenthesis

11 讨论

11.1 通过实验比较了集中不同的流动相: a 甲醇-水; b 乙腈-水; c 乙腈-0.1% 醋酸水溶液; d 乙腈-0.1% 氨水溶液,结果表明,选用乙腈-水为流动相进行梯度洗脱效果最好。

11.2 ELSD是一种质量型检测器,尤其适用于没有紫外吸收的皂苷类化合物,本实验采用 HPLC-ELSD 法同时测定地奥心血康胶囊中原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷的含量,方法灵敏准确,可以为地奥心血康胶囊质量控制提供参考。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. Vol 1(一部): 429
2 MA Yuan-tao(马远涛), ZHAO Wan(赵婉), TUO Lei(拓磊), et al. HPLC-ELSD determination of dioscin in DiàoXīnxuēkàng capsules(HPLC-ELSD 法测定地奥心血康胶囊中薯蓣皂苷的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(6): 823
3 LIU Chun-Zhao, ZHOU Hua-Ying, YAN Qiong. Fingerprint analysis of *Dioscorea nipponica* by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 582: 61
4 LIU Zhong-rong(刘忠荣), HUANG Huang(黄璜). Use of diosgenin for producing a medicine for treating myocardial ischemia myocardial infarction and angina pectoris(薯蓣皂苷元在制备治疗心肌梗血、心绞痛和心肌梗死的药物中的用途), CN 1187055C, 2005-02-02

(本文于 2008年 1月 2日收到)