

高效液相色谱法测定冠心宁冻干粉针剂中 9 个酚性成分的含量

郭小瑞¹ 李里² 李学涛¹ 毕开顺³ 孟宪生¹ 包永睿¹

(1. 辽宁中医药大学药学院, 大连 116600; 2. 沈阳军区总医院, 沈阳 110016; 3. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法同时测定冠心宁冻干粉针剂中 9 个酚性成分(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸 B) 的含量。方法: 采用 Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-磷酸水溶液为流动相系统进行梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温 35 °C。结果: 待测组分在各自浓度范围内与峰面积呈良好线性关系, R^2 均大于 0.99, 平均回收率($n=9$) 分别在 96.3% ~ 104.3% 之间。结论: 测定方法准确、灵敏, 重复性好, 为全面评价冠心宁冻干粉针剂质量提供了可靠方法。

关键词: 冠心宁; 中药; 注射剂; 丹参素; 原儿茶酸; 绿原酸; 咖啡酸; 阿魏酸; 异阿魏酸; 迷迭香酸; 丹酚酸 B; 高效液相色谱法
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)10-1894-05

HPLC determination of nine phenolic components in Guanxinling lyophilized powder for injection

GUO Xiao-rui¹, LI Li², LI Xue-tao¹, BI Kai-shun³, MENG Xian-sheng¹, BAO Yong-rui¹

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China;

3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective: An effective, accurate and reliable method for the determination of nine phenolic components (danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, isoferulic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B) in Chinese medicine Guanxinling lyophilized powder for injection was developed. **Methods:** The separation using reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), was performed on a Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm with 5 μm particle size) with a gradient elution programme when the wavelength was 280 nm and the column temperature was 35 °C. **Results:** Excellent linear behaviors over the investigated concentration ranges were observed with the value of R^2 higher than 0.99 for all the analytes. The recoveries, measured at three concentration levels, varied from 96.3% to 104.3%. **Conclusion:** The method is accurate, reliable and effective for the simultaneous determination of nine phenolic components in Guanxinling lyophilized powder for injection.

Key words: Guanxinling; Chinese traditional medicine; injection; danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, isoferulic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B; HPLC

中医药在中国及一些东方国家具有悠久的历史, 并常以复方形式进行使用, 在治病防病方面起着极其重要的作用。根据中医理论指导而研发的中药, 尤其是复方制剂的功效是药品内含成分整体作用的体现, 是多种成分、多种机制的综合作用结果。于是凭借某一种化学成分定性和定量的中药质量控

制方法的有效性受到质疑, 从分解式的单一成分的“微观分析”模式向群体成分的“宏观分析”模式发展成为必然趋势^[1]。因此, 建立方便快捷的多组分定量测定方法对明确中成药中的有效组分并控制其质量是十分必要的。

冠心宁注射液由丹参、川芎提取而得, 收载于

第一作者 Tel: (0411) 87406496; E-mail: guoxiaoruiqq@163.com

《卫生部药品标准》中药成方制剂第十七分册^[2]中,临床上广泛用于治疗冠心病、心绞痛等症。注射液虽然起效快,但不便运输,有效成分易降解,贮存时易沉淀。为解决上述问题,作者在冠心宁注射液成方基础上将其工艺进行改进,精致而得冠心宁冻干粉针剂。

研究表明,丹参和川芎中的水溶性酚类成分(包括丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 等)为治疗冠心病、心绞痛等心血管疾病的主要有效成分。有文献对中药复方及药材中的其中某些酚性成分进行了定量测定,多采用反相高效液相色谱(HPLC)法^[3-5],但对上述酚性成分同时定量测定的方法,作者未见文献报道。作者曾对粉针剂中丹酚酸 B、阿魏酸、丹参素等成分分别进行过定量测定^[6,7],但由于指标成分选取较少,最多同时测定了 3 个化合物,具有局限性,无法满足日益增长的现代中药质量控制方法的要求。

因此,本文在前期工作基础上,对冠心宁冻干粉针剂中主要酚性成分(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸 B)的含量进行同时测定,方法准确、灵敏、可靠,弥补了已有方法的不足,为复杂体系的多组分同时定量测定及其全面质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

LC2010A 高效液相色谱 HPLC 仪及 CLASS-VP 色谱工作站(日本岛津公司),AGBP210S 电子天平(德国 Satorius 公司),ABI135-S 电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器(天津市金洲科学仪器有限公司),pHS-2TC(0.01 级)精密数显酸度剂(上海之信仪器有限公司)。

甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(天津康科德科技有限公司),冰乙酸、磷酸均为色谱纯(天津市科密欧化学试剂开发中心),水为二次蒸馏水。

对照品丹参素(批号:110855-200405)、原儿茶酸(批号:110809-200503)、原儿茶醛(批号:110810-200506)、绿原酸(批号:110753-200413)、咖啡酸(批号:885-200001)、阿魏酸(批号:0773-9910)和丹酚酸 B(批号:111562-200504)均购自中国药品生物制品检定所,迷迭香酸对照品(质量分数>98%)购自成都曼斯特生物科技有限公司,异阿魏酸对照品购自 Acros Organics

公司(批号:00050310)。冠心宁冻干粉针剂为辽宁中医药大学药学院自制。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液

精密称取对照品丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 适量,分别置于量瓶中,用流动相溶解制成含丹参素(A) $546.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,原儿茶酸(B) $25.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,原儿茶醛(C) $40.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,绿原酸(D) $39.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,咖啡酸(E) $15.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,阿魏酸(F) $227.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,异阿魏酸(G) $15.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,迷迭香酸(H) $1.082 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,丹酚酸 B(I) $2.164 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液。

分别精密量取上述各对照品的储备溶液适量,置于量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度,得到各指标成分对照品混合溶液,浓度范围为:A $5.467 \sim 218.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,B $0.3180 \sim 12.72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,C $0.5054 \sim 20.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,D $0.1968 \sim 7.872 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,E $0.3960 \sim 15.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,F $0.5694 \sim 22.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,G $0.03840 \sim 1.536 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,H $2.706 \sim 108.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,I $5.410 \sim 216.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 供试品溶液 取冠心宁冻干粉针剂约 12.5 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度。经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后取续滤液进样分析。

2.3 阴性溶液 按处方比例及冠心宁冻干粉针剂制备工艺制备不含丹参、不含川芎及不含丹参与川芎的阴性样品,依“2.2”项下方法操作,得阴性溶液,备用。

3 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Luna C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm $5 \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈(A) - pH 2.59 的磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 30 min, 2% A \rightarrow 18% A; 30 ~ 54 min, 18% A \rightarrow 34% A),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 280 nm,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。在上述色谱条件下进样分析,理论塔板数按各指标峰计算均不低于 8000。各峰与各自相邻色谱峰之间分离度均大于 1.5,拖尾因子均在 0.95 ~ 1.05 之间。测得对照品和冠心宁冻干粉针剂及阴性样品色谱图见图 1。

4 方法与结果

4.1 线性关系考察 分别精密吸取各混合对照品

溶液注入高效液相色谱仪,记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标(Y),对照品溶液的浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标(X),绘制标准工作曲线,计算回归方程。

待测组分的回归方程及最低检测限(LOD, $S/N = 3$)和最低定量限(LOQ, $S/N = 10$)见表1。结果表明,待测组分在各自浓度范围内具有良好的线性关系。

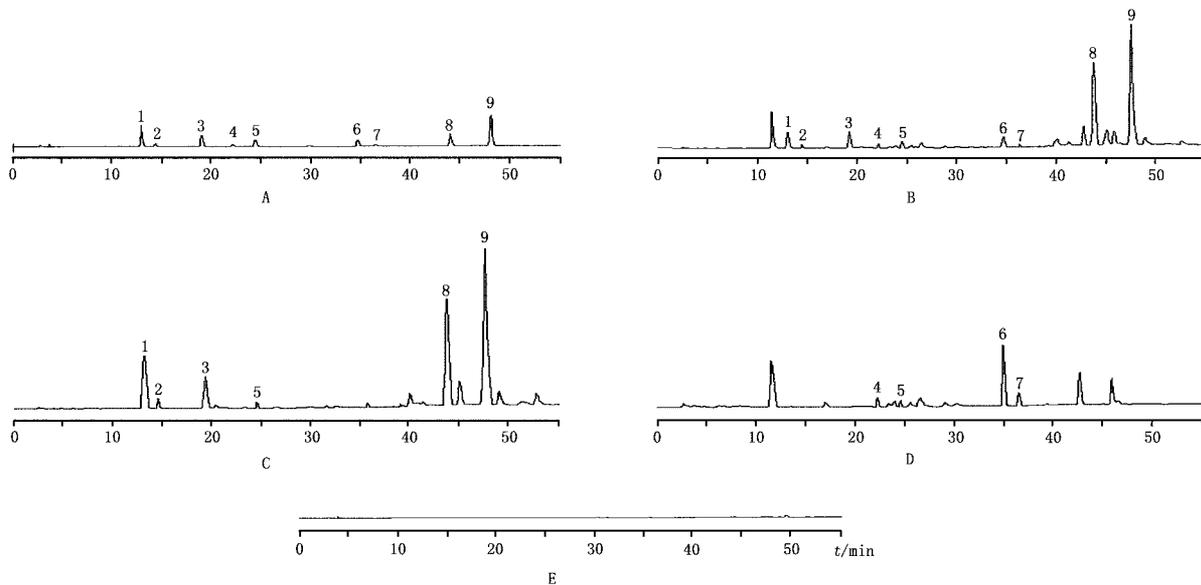


图1 对照品(A)、粉针剂样品(B)、缺川芎阴性样品(C)、缺丹参阴性样品(D)及缺丹参与川芎阴性样品(E)色谱图

Fig 1 Typical chromatograms of reference substance (A), lyophilized powder for injection sample (B), negative sample without the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. (C), negative sample without the radix and rhizome of *Salvia multiorrhiza* Bge. (D) and negative sample without the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. and the radix and rhizome of *Salvia multiorrhiza* Bge. (E)

1. 丹参素(danshensu) 2. 原儿茶酸(protocatechuic acid) 3. 原儿茶醛(protocatechuic aldehyde) 4. 绿原酸(chlorogenic acid) 5. 咖啡酸(caffeic acid) 6. 阿魏酸(ferulic acid) 7. 异阿魏酸(isoferulic acid) 8. 迷迭香酸(rosmarinic acid) 9. 丹酚酸B(salvianolic acid B)

表1 线性关系实验结果

Tab 1 Results of regression analysis on calibration curves and detection limits

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	R^2	浓度范围 (linear range) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	LOD $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	LOQ $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
丹参素(danshensu)	$Y = 5.369 \times 10^3 X - 1.004 \times 10^4$	0.9990	5.467 ~ 218.7	0.042	0.140
原儿茶酸(protocatechuic acid)	$Y = 1.418 \times 10^4 X - 3.698 \times 10^3$	0.9989	0.3180 ~ 12.72	0.026	0.087
原儿茶醛(protocatechuic aldehyde)	$Y = 4.258 \times 10^4 X - 8.01 \times 10^3$	0.9993	0.5054 ~ 20.22	0.005	0.017
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 1.370 \times 10^4 X - 2.108 \times 10^3$	0.9988	0.1968 ~ 7.872	0.016	0.053
咖啡酸(caffeic acid)	$Y = 3.114 \times 10^4 X - 3.981 \times 10^3$	0.9994	0.3960 ~ 15.84	0.002	0.008
阿魏酸(ferulic acid)	$Y = 2.225 \times 10^4 X - 2.916 \times 10^3$	0.9996	0.5694 ~ 22.78	0.008	0.026
异阿魏酸(isoferulic acid)	$Y = 3.691 \times 10^4 X - 6.795 \times 10^2$	0.9991	0.03840 ~ 1.536	0.008	0.027
迷迭香酸(rosmarinic acid)	$Y = 1.044 \times 10^4 X - 6.312 \times 10^3$	0.9992	2.706 ~ 108.2	0.025	0.081
丹酚酸B(salvianolic acid B)	$Y = 9.79 \times 10^3 X - 1.582 \times 10^4$	0.9991	5.410 ~ 216.4	0.017	0.055

4.2 精密性试验 取含被测组分浓度分别为 A 54.67, B 3.180, C 5.054, D 1.968, E 3.960, F 5.694, G 0.384, H 27.06, I 54.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,连续进样3d,每天6次,计算日内精密性为 2.4%, 2.5%, 0.8%, 2.5%, 1.7%, 1.8%, 0.3%, 0.4%, 0.6%; 日间精密性为 0.8%, 2.6%,

1.0%, 2.6%, 0.8%, 1.8%, 1.2%, 1.8%, 1.5%。

4.3 重复性试验 取已知浓度同一批粉针剂样品约12.5 mg 6份,分别精密称定,依“2.2”项下方法操作,得供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析。计算重复性RSD分别为 1.8%, 2.7%, 1.8%, 1.3%, 2.0%, 2.2%, 2.7%, 1.2%, 0.5%。

4.4 回收率试验 取已知含量的冠心宁冻干粉剂 9 份,精密称定 3 份为一组,每组分别精密加入一定量的对照品溶液,依“供试品溶液制备”项下方法操作,得高、中、低浓度供试溶液,在上述色谱条件下进行分析测定,测得各有效成分的量。计算回收率,结果见表 2。各化合物平均回收率为 96.3% ~ 104.3%,表明该方法具有较好的准确度。

表 2 回收率实验结果 (n=3)
Tab 2 Recoveries of the developed method

化合物 (compound)	加入量 (added) /μg	测得量 (found) /μg	回收率 (recovery) /%	RSD /%
丹参素(danshensu)	328.0	328.2	100.1	1.2
	656.0	660.8	100.7	1.2
	984.1	980.0	99.6	1.0
原儿茶酸(protocatechuic acid)	10.18	9.799	96.3	2.2
	20.35	19.91	97.8	2.4
	30.53	29.91	98.0	1.8
原儿茶醛(protocatechuic aldehyde)	24.26	24.15	99.5	1.9
	48.53	49.26	101.5	1.8
	72.79	75.91	104.3	2.1
绿原酸(chlorogenic acid)	11.81	11.83	100.2	2.7
	23.62	22.97	97.3	1.3
	35.42	34.86	98.4	2.3
咖啡酸(caffeic acid)	3.168	3.190	100.7	2.8
	6.336	6.333	100.0	2.3
	9.504	9.463	99.6	2.3
阿魏酸(ferulic acid)	68.34	67.27	98.4	1.8
	136.7	138.5	101.3	0.9
	205.0	204.1	99.6	1.1
异阿魏酸(isoferulic acid)	4.608	4.692	101.8	2.2
	9.216	9.433	102.4	2.5
	13.82	13.88	100.4	2.3
迷迭香酸(rosmarinic acid)	649.2	667.4	102.8	1.0
	1298	1319	101.6	1.2
	1948	1941	99.7	1.4
丹酚酸 B(salvianolic acid B)	1082	1095	101.2	1.2
	2164	2229	103.0	1.6
	3246	3308	101.9	1.4

4.5 稳定性考察 取已知含量的冠心宁冻干粉剂

剂样品,精密称定,依“2.2”项下方法操作,得供试品溶液,室温放置,在上述色谱条件下,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h 进样分析。计算各被测组分色谱峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 1.3%, 1.1%, 2.5%, 2.8%, 2.0%, 2.9%, 1.3%, 0.5%。

4.6 样品测定 取不同批号样品各约 12.5 mg,精密称定,依“2.2”项下方法操作,得供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,按外标法以峰面积计算丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量,结果见表 3。

表 3 冠心宁冻干粉剂样品中 9 种化合物的含量 (mg·支⁻¹ n=3)

Tab 3 The mean contents of nine components in Guanxinling lyophilized powder for injection

化合物(compound)	1	2	3
丹参素(danshensu)	12.47	14.01	13.33
原儿茶酸(protocatechuic acid)	0.3717	0.3905	0.3836
原儿茶醛(protocatechuic aldehyde)	1.128	0.9654	1.227
绿原酸(chlorogenic acid)	0.4091	0.4263	0.4885
咖啡酸(caffeic acid)	0.1997	0.1324	0.1529
阿魏酸(ferulic acid)	3.612	3.257	3.529
异阿魏酸(isoferulic acid)	0.1807	0.1899	0.1699
迷迭香酸(rosmarinic acid)	23.95	26.12	27.70
丹酚酸 B(salvianolic acid B)	49.78	43.02	47.22

5 讨论

5.1 色谱条件优化

5.1.1 流动相系统的选择 本文曾考察甲醇-水、甲醇-甲酸水、甲醇-冰乙酸水、甲醇-磷酸水、乙腈-水、乙腈-甲酸水、乙腈-冰乙酸水、乙腈-磷酸水等不同的流动相系统,结果表明以乙腈-磷酸水为流动相系统,洗脱色谱峰峰形锐,各峰之间分离度好,基线平稳,故选择乙腈-磷酸水作为流动相系统。

5.1.2 色谱柱的选择 曾考察 Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm)、Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm)和 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm)对色谱峰的分离效果,结果表明 Luna C₁₈ 色谱柱对各指标成分分离度好,保留时间适宜,故选择 Luna C₁₈ 色谱柱进行测定。

5.1.3 检测波长的选择 取各指标成分对照品溶液,在二极管阵列检测器下检测,结果表明,280 nm 处各色谱峰之间分离度好,基线平稳,故选择 280 nm 为检测波长。

5.1.4 柱温的选择 本文曾考察室温、30 °C 以及 35 °C 等不同柱温,结果表明,柱温设定为 35 °C 时,色谱峰峰形锐,各峰之间分离度好,基线平稳,故选择 35 °C 为测定柱温。

5.2 多成分同时定量方法建立的必要性 中药是中医防病治病的最重要物质手段。而中药的质量控制和评价是中药现代化的关键问题之一,也是中药研究的难点和热点^[8,9]。中药质量控制的目的是保证中药的有效性和安全性。仅仅通过鉴别(显微鉴别、理化鉴别与薄层色谱鉴别)和定量测定(提取物总量或少数指标成分含量测定)未能反映中药的复杂性和整体性。根据中医理论的指导而研发的中药,尤其是复方制剂的功效是药品内含成分整体作用的体现,是多种成分、多种机制的综合作用结果。因此现阶段复方制剂的定量测定方法更偏于多个有效成分同时测定,以全面控制制剂质量。

5.3 结论 本文建立了同时测定丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、迷迭香酸及丹酚酸 B 含量的分析方法,并将上述方法首次用于冠心宁冻干粉针剂定量测定中,方法准确、灵敏、可靠,可作为粉针剂质量控制方法,并为其组方药材以及相关制剂的质量控制提供依据。

参考文献

- LI Fa - mei(李发美), XIONG Zhi - li(熊志立), LU Xiu - mei(鹿秀梅) *et al.* Advance in the quality control and evaluation of traditional Chinese medicines and the role of systems biology(中药质量控制和评价模式的发展及系统生物学对其的作用). *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术 - 中医药现代化) 2009, 11(1): 120
- Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China. Prescription Preparations of Chinese Medicine, Vol. 17(卫生部药品标准中药成方制剂第十七分册). 1998. 174
- MA Bin - xia(马彬峡), CHEN Heng - chong(陈恒冲), WU Chun - gao(吴春高), *et al.* RP - HPLC simultaneous determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, paeoniflorin and ferulic acid in Lemai granules(RP - HPLC 法同时测定乐脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、芍药苷和阿魏酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2009, 29(7): 1122
- CHEN Bin(陈斌), YE Jun(叶隽), JI Feng(纪峰) *et al.* HPLC determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, paeoniflorin, ferulic acid and salvianolic acid B in Naoxueshuan tablets(高效液相色谱法同时测定脑血栓片中丹参素、原儿茶醛、芍药苷、阿魏酸和丹酚酸 B 的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007, 27(12): 1891
- ZENG Ling - jie(曾令杰), LIN Wen - xiong(林文雄), LIANG Hui(梁晖) *et al.* Simultaneous determination and correlation study on the active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bge. (丹参中活性成分的同时定量分析及其相关性研究). *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2008, 30(6): 892
- GUO Xiao - rui(郭小瑞), CHEN Xiao - hui(陈晓辉), BI Kai - shun(毕开顺). RP - HPLC determination of salvianolic acid B and ferulic acid in Guanxinling powder for injection(RP - HPLC 法同时测定冠心宁冻干粉针剂中丹酚酸 B 和阿魏酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007, 27(2): 219
- GUO Xiao - rui(郭小瑞), SUN Zhe(孙哲), WANG Lin - dong(王临东) *et al.* RP - HPLC determination of danshensu, protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde in Guanxinling lyophilized powder for injection(RP - HPLC 法测定冠心宁冻干粉针中丹参素、原儿茶酸和原儿茶醛). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2007, 38(11): 1663
- XIAO Pei - gen(肖培根), XIAO Xiao - he(肖小河). Modernization of traditional Chinese medicine in the 21st century(21 世纪与中药现代化). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2000, 25(2): 67
- Stone R. Biochemistry: lifting the veil on traditional Chinese medicine. *Science* 2008, 319: 709

(本文于 2010 年 10 月 26 日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告