

复方丹参片中四种成分的高效液相色谱- 电化学检测-紫外检测法分析

索志荣¹, 秦海燕², 曹 炜¹, 刘文哲², 郑建斌¹

(1. 西北大学分析科学研究所 陕西省电分析化学重点实验室, 陕西 西安 710069;

2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要 :建立了电化学检测器与二极管阵列检测器联用的液相色谱(HPLC-ECD-DAD)同时分离和测定复方丹参片中原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 等 4 种成分的分析方法。采用 Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm i. d. 5.0 μm),以甲醇和 0.4% 磷酸为流动相(流速 1.0 mL/min)进行梯度洗脱;ECD 检测电压 0.7 V,DAD 检测波长 270 nm,柱温 30 ℃。实验结果表明,原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 质量浓度分别为 0.3 ~ 9.0 mg/L,1.1 ~ 54.0 mg/L,1.1 ~ 11.1 mg/L 和 5.2 ~ 52.0 mg/L 时与其峰面积呈良好的线性关系(线性相关系数均高于 0.999),原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 的平均回收率($n = 6$)分别为 97.8% (相对标准偏差(RSD)为 2.15%)、98.2% (RSD 为 2.07%)、97.6% (RSD 为 2.18%)和 97.2% (RSD 为 2.07%)。该法同时利用了 ECD 和 DAD 的优点,是一种快速、灵敏、准确的分析方法,可以为复方丹参片的质量控制提供科学依据。

关键词 :高效液相色谱-电化学检测-紫外检测法;原儿茶酸;原儿茶醛;咖啡酸;丹参酮 II A;复方丹参片
中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)06-0626-04

Analysis of Four Components in Fufang Danshen Tablets by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical and Ultraviolet Detections

SUO Zhirong¹, QIN Haiyan², CAO Wei¹, LIU Wenzhe², ZHENG Jianbin¹

(1. Shaanxi Provincial Key Lab of Electro-Analytical Chemistry, Institute of Analytical Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract : A rapid and accurate method for the simultaneous separation and determination of protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, caffeic acid and tanshinone II A in Fufang Danshen Tablets by high performance liquid chromatography has been established. The former three constituents were detected by electrochemical array detector (ECD) and the last one by ultraviolet diode array detector (DAD). The separation was performed on a Zorbax SB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm i. d., 5.0 μm) by gradient elution with methanol and 0.4% aqueous phosphoric acid as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The detections were done at 0.7 V, 270 nm and 30 ℃. The results showed that the linear ranges were 0.3 - 9.0 mg/L for protocatechuic acid, 1.1 - 54.0 mg/L for protocatechuic aldehyde, 1.1 - 11.1 mg/L for caffeic acid and 5.2 - 52.0 mg/L for tanshinone II A. The average recoveries ($n = 6$) were 97.8% with relative standard deviation (RSD) of 2.15% for protocatechuic acid, 98.2% with RSD of 2.07% for protocatechuic aldehyde, 97.6% with RSD of 2.18% for caffeic acid and 97.2% with RSD of 2.07% for tanshinone II A. These four components were separated successfully from each other. The sensitivities of detection of protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde and caffeic acid with ECD were 11.0 - 25.3 times greater than those with DAD. The study provides a scientific basis for the quality control of Fufang Danshen Tablets.

Key words : high performance liquid chromatography-electrochemical and ultraviolet detections; protocatechuic acid; protocatechuic aldehyde; caffeic acid; tanshinone II A; Fufang Danshen Tablets

收稿日期 2004-10-10

作者简介:索志荣,男,助理研究员,博士研究生,Tel (029)81191095,E-mail:suozhirong@163.com.

通讯联系人:郑建斌,男,教授,博士生导师,Tel (029)88302077,E-mail:zhengjb@nwu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金(No.20275030)、陕西省博士后科研基金(No.BX03003)和西北大学青年基金(No.03NW29)资助项目.

复方丹参片是由丹参、三七、冰片三味中药组成的常用中成药,具有活血化瘀、理气止痛的功效,主要用于胸口憋闷、心绞痛等症的治疗。丹参作为君药,是复方丹参片中唯一需要提取的药物,也是影响产品质量的关键。丹参的活性成分可分为脂溶性成分和水溶性成分;丹参酮ⅡA是其脂溶性代表成分之一,相对含量较高,有扩张冠脉、抗心肌缺血的作用^[1];原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸等酚类化合物为主要的水溶性成分^[2],不仅具有显著的抗氧化、抗自由基、抑制低密度脂蛋白的氧化以及预防心血管疾病的作用,而且具有抗癌、抗炎症和抗血小板凝聚等功能^[3,4]。对于复方丹参片的质量控制有采用薄层色谱法对三七进行定性鉴别,用高效液相色谱-紫外检测法测定丹参酮ⅡA和原儿茶醛含量及比色法测定三七总皂甙含量等^[5-8]。由于复方丹参片中的某些成分如原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸在紫外检测器上响应很小,因而紫外检测器对这些物质的检测灵敏度低,难以检出甚至不能检出。电化学检测器具有灵敏度高,可测到浓度低至 10^{-15} mol/L的物质,选择性好,只对电活性物质有响应,能提高分离分析效果等特点^[9]。本文采用电化学检测器与二极管阵列检测器联用的液相色谱法(HPLC-ECD-DAD)对复方丹参片中的原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮ⅡA等4种成分同时进行了测定,为复方丹参片的质量评价和控制提供了科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括四元梯度泵(G1311A)、电化学检测器(1049A)、二极管阵列检测器(G1315A);DL-180 型超声清洗器(浙江省象山县石浦天电子仪器厂);Milli-QG 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司)。

甲醇为色谱纯,水为超纯水,磷酸为分析纯。原儿茶酸和咖啡酸对照品购自 Sigma 公司,原儿茶醛和丹参酮ⅡA对照品购自中国药品生物制品检定所。复方丹参片:山西亚宝药业集团股份有限公司(批号:040401),云南通大生物药业有限公司(批号:030301),甘肃陇神戎发制药有限公司(批号:031201),西安颗粒药业有限公司(批号:040602),广州白云山制药股份有限公司广州白云山中药厂(批号:04041013)。

1.2 溶液的配制

供试品溶液的制备:取复方丹参片10片,去除糖衣,在研钵中研细,过100目筛后,准确称量350 mg,用80%(体积分数,下同)甲醇超声提取3次,每次用8.0 mL 溶剂提取20 min,合并滤液于25 mL 容量瓶中,再用80% 甲醇定容至刻度,摇匀,取适量用0.45 μ m 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

对照品溶液的配制:准确称取原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮ⅡA对照品适量,用甲醇溶解并定容,摇匀,配得原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮ⅡA质量浓度分别为0.25、0.27、0.22、0.26 g/L 的对照品溶液,作为储备液。其他不同浓度的各对照品溶液由各自的储备液经甲醇稀释得到。

1.3 色谱条件

Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 5.0 μ m)(美国 Agilent 公司);流动相:A液为甲醇,B液为0.4% 磷酸;梯度洗脱程序:10% A $\xrightarrow{8 \text{ min}}$ 42% A $\xrightarrow{4 \text{ min}}$ 95% A(8 min);流速:1.0 mL/min;DAD 检测波长为270 nm;ECD 为安培检测,工作电压为0.7 V;柱温为30 $^{\circ}$ C;进样量:10.0 μ L。原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮ⅡA的保留时间分别为5.87、7.09、8.80、15.4 min。色谱图见图1。

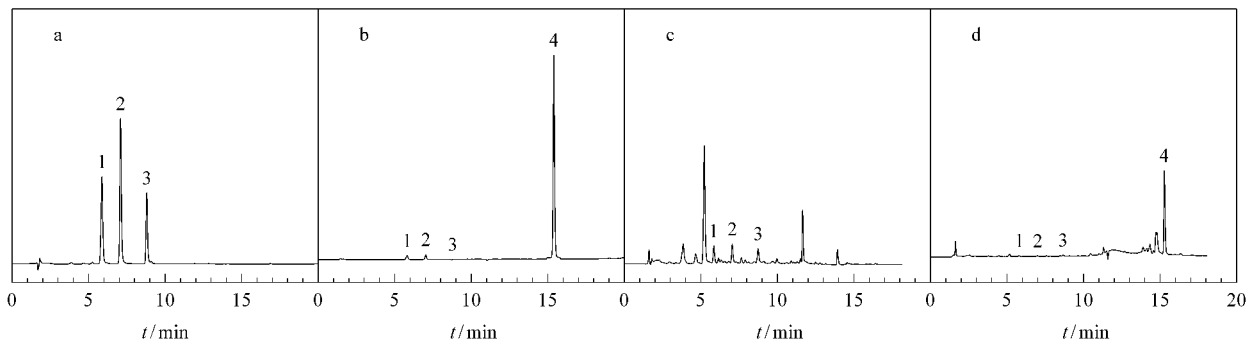


图1 对照品和样品的电化学检测及紫外检测的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances and samples detected by electrochemical detection (ECD) and ultraviolet (UV) detection

Reference substances detected by ECD (a) and UV detection at 270 nm (b); the sample detected by ECD (c) and UV detection at 270 nm (d).

1. protocatechuic acid; 2. protocatechuic aldehyde; 3. caffeic acid; 4. tanshinone II A.

2 结果与讨论

2.1 样品提取溶剂的选择

分别考察了水、20% 甲醇、40% 甲醇、60% 甲醇、80% 甲醇及甲醇对提取效率的影响。结果显示:用 80% 甲醇作为提取溶剂时,原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 的提取率最高,故本实验选择用 80% 甲醇作提取溶剂。

2.2 色谱洗脱条件的优化

考察了不同比例的甲醇-水-磷酸作流动相的等度洗脱以及各种梯度洗脱,对色谱条件进行了优化。结果表明:不加磷酸或磷酸浓度较低时,色谱峰出现不同程度的拖尾;加入磷酸后,随着其添加浓度的增加,色谱峰的对称性增强,各物质的保留时间变化不大,考虑到色谱柱的耐酸性,选 0.4% 磷酸溶液作为流动相中的一相。随着流动相中甲醇比例的增加,流动相的洗脱能力增强,但采用等度洗脱时 4 种物质很难完全分离,因此需采用梯度洗脱。经过优化实验,确定了“1.3”节中的梯度洗脱条件。

2.3 检测条件的优化

分别移取原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 储备液各 100 μL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释到刻度,摇匀。按“1.3”节色谱条件进样,考察电位范围为 0.2 ~ 1.0 V 时 4 种物质在电极上的电流响应,同时用 DAD 对 4 种物质在 190 ~ 400 nm 的紫外吸收进行扫描。结果表明:丹参酮 II A 在此色谱条件下,没有电化学活性,但在 270 nm 处有很强的紫外吸收。原儿茶酸、原儿茶醛和咖啡酸在 ECD 上的响应远大于在 DAD 上的响应,相同浓度下,它们在 ECD 上的响应峰面积分别是其在最大吸收波长下响应峰面积的 13.5、25.3 和 11.0 倍。故对于具有电化学活性的物质,ECD 的灵敏度高于 DAD,在 DAD 上响应很小或不能检出的物质在 ECD 上则有可能被很好地检测。以原儿茶酸、原儿茶醛和咖啡酸在 ECD 上的响应峰面积对电极的工作电压作图,分别得到 3 种物质的流体动力学伏安图(见图 2)。由图 2 可见:当工作电压高于 0.7 V 时,3 种物质的电化学响应出现一个平台。继续提高电压,虽然峰电流继续增加,但噪声明显增加。故选择工作电压为 0.7 V (*vs.* Ag/AgCl)。

2.4 线性关系考察

精密移取一定体积的原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 储备液于 5 mL 容量瓶中,用甲醇稀释,使原儿茶酸质量浓度分别为 0.3、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mg/L;原儿茶醛质量浓度分别为 1.1、5.4、10.8、21.6、32.4、54.0 mg/L;咖啡酸质量浓度

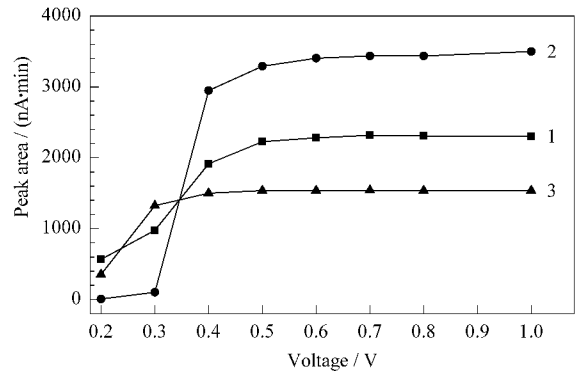


图 2 3 种化合物的流体动力学伏安图

Fig. 2 Hydrodynamic voltammograms for 3 compounds

1. protocatechuic acid; 2. protocatechuic aldehyde; 3. caffeic acid.

分别为 1.1、3.3、5.5、7.7、9.9、11.1 mg/L 及丹参酮 II A 质量浓度分别为 5.2、10.4、20.8、31.2、41.6、52.0 mg/L 的混合对照品溶液。将上述混合对照品溶液分别平行测定 3 次,以平均峰面积 Y 对被测物的质量浓度 C (mg/L) 进行线性回归,4 种被测物的回归方程和相关系数分别为:原儿茶酸, $Y = 56.04C + 49.26$ ($r = 0.9994$);原儿茶醛, $Y = 74.91C + 91.03$ ($r = 0.9993$);咖啡酸, $Y = 42.15C + 31.54$ ($r = 0.9995$);丹参酮 II A, $Y = 46.85C + 55.43$ ($r = 0.9993$)。

2.5 精密性、稳定性、重复性实验

精密吸取复方丹参片(批号:031201)的供试品溶液 10.0 μL ,重复进样 6 次进行测定,原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 峰面积积分值的相对标准偏差(RSD)分别为 2.13%、2.18%、1.59% 和 2.22%。

对复方丹参片(批号:031201)的供试品溶液在 8 h 之内每隔 1 h 进行 1 次测定,考察供试品溶液的稳定性,8 h 内原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 峰面积积分值的 RSD 分别为 2.38%、2.07%、2.17% 和 2.17%。

精密称量复方丹参片(批号:031201)粉末约 350 mg,共 6 份,按“1.2”节操作制备供试品溶液后进行测定,原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 含量的 RSD 分别为 2.13%、2.25%、2.12% 和 1.99%。

2.6 加标回收率试验

精密称量复方丹参片(批号:031201)粉末约 350 mg,共 6 份,每份分别准确加入原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 对照品储备液 200 μL 、1.0 mL、300 μL 和 1.5 mL,按“1.2”节下方法制备供试品溶液后进行测定。计算原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 的平均加标回收率(见表 1)。

表 1 4 种成分的加标回收率测定($n=6$)Table 1 Recoveries and RSDs of 4 components ($n=6$)

Compound	Back-ground/ μg	Added/ μg	Found/ μg	Recovery/%	RSD/%
Protocatechuic acid	73.3	50.0	122.2	97.8	2.15
Protocatechuic aldehyde	45.8	270.0	311.0	98.2	2.07
Caffeic acid	98.2	66.0	162.6	97.6	2.18
Tanshinone II A	460.5	390.0	839.5	97.2	2.07

2.7 样品测定

按“1.2”节下操作制备供试品溶液,进样 10.0 μL 进行检测,计算各样品中原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸和丹参酮 II A 的含量,结果见表 2。

表 2 样品的测定结果

Table 2 The determination results of samples $\mu\text{g/g}$

Lot No.	Protocatechuic acid	Protocatechuic aldehyde	Caffeic acid	Tanshinone II A
040401	199.2	2020.2	268.1	1601.2
030301	76.1	1029.5	273.9	1057.4
031201	209.5	130.9	280.6	1315.6
040602	98.5	895.6	209.8	1995.7
04041013	74.8	997.1	118.5	850.6

参考文献:

- [1] Wang Dechang. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (王德昌. 中国实验方剂学杂志), 2003, 9(3):49
- [2] Wu Zhijun, Ouyang Mingan, Yang Chongren. Acta Botanica Yunnanica (吴志军, 欧阳明安, 杨崇仁. 云南植物研究), 1999, 21(4):512
- [3] Cai Y Z, Luo Q, Sun M, Corke H. Life Sciences, 2004, 74(17):2157
- [4] Sroka Z, Cisowski W. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41(6):753
- [5] Zhang Chunli, Su Lijing. Journal of Anhui TCM College (张春丽, 苏丽静. 安徽中医学院学报), 2001, 20(5):56
- [6] Sun Shuzhou. Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy (孙树周. 广东药学院学报), 2002, 18(3):201
- [7] Sun Yikun, Di Feng, Zhou Furong. Chinese Pharmaceutical Affairs (孙毅坤, 邱峰, 周富荣. 中国药事), 2000, 14(6):383
- [8] Liu Chaohong, Feng Chunhua. Heilongjiang Medical Journal (刘朝宏, 逢春华. 黑龙江医药), 2002, 15(3):167
- [9] Zhang Xiaotong, Yun Zihou. Detection Method of Liquid Chromatography. Beijing: Chemical Industry Press (张晓彤, 云子厚. 液相色谱检测方法. 北京:化学工业出版社), 2000. 134

欢迎订购《色谱》全文检索光盘

为庆祝《色谱》杂志创刊 20 周年,本编辑部特别制作了《色谱》全文检索纪念光盘(DVD 1 张)。在该光盘中可以通过关键词(可以论文中出现的任意词作为关键词)、作者、作者单位、文题、卷号、期号、栏目等项目方便快捷地检索并阅读、下载 1984 年到 2004 年《色谱》发表的全部论文。需要者请直接与《色谱》编辑部联系。该光盘售价为 150 元/张(《色谱》作者购买:120 元/张)。

邮局汇款邮购:

地 址 大连市中山路 457 号

邮 编 116023

收款人《色谱》编辑部

银行汇款邮购:

户 名 中国科学院大连化学物理研究所

开户行 中国工商银行大连青泥洼桥支行

账 号 3400200309014415739

《色谱》编辑部联系方式:

Tel (0411)84379021, Fax (0411)84379600, E-mail: sepu@dicp.ac.cn

网址: www.chrom-China.com

联系人: 李美琴

《色谱》编辑部

2005 年 11 月