

HPLC 同时测定益心舒片中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 的含量

秦建平^{1,2,3}, 吴建雄^{1,2,3}, 毕宇安^{1,2,3}, 林夏^{1,2,3}, 赵宾江^{1,2,3}, 王振中^{1,2,3}, 萧伟^{1,2,3*}
(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;
3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定益心舒片中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 的含量。
方法:采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱,以乙腈-水梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 250 nm。结果:五味子醇甲在 21.56 ~ 215.6 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$),五味子酯甲在 6.500 ~ 65.00 mg·L⁻¹ ($r=1$),五味子甲素在 3.460 ~ 34.60 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$),五味子乙素在 6.920 ~ 69.20 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$),丹参酮Ⅱ_A 在 2.400 ~ 24.00 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) 呈良好的线性关系,平均回收率五味子醇甲为 97.92%, RSD 2.34% ($n=6$);五味子酯甲为 100.28%, RSD 2.57% ($n=6$);五味子甲素为 98.34%, RSD 2.73% ($n=6$);五味子乙素为 98.06%, RSD 1.61% ($n=6$);丹参酮Ⅱ_A 为 99.13%, RSD 1.42% ($n=6$);结论:本法简便、灵敏度高、重复性好,可用于益心舒片的质量控制。
[关键词] 益心舒片; 五味子醇甲; 五味子酯甲; 五味子甲素; 五味子乙素; 丹参酮Ⅱ_A; 高效液相色谱法
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)02-0077-04

Determination of Schizandrin, Schisantherin A, Deoxyschizandrin, γ-Schishandrin and Tanshinone II_A in Yixinshu Tablet by HPLC

QIN Jian-ping^{1,2,3}, WU Jian-xiong^{1,2,3}, BI Yu-an^{1,2,3}, LIN Xia^{1,2,3},
ZHAO Bin-jiang^{1,2,3} WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3*}
(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China;
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;
3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] Objective: To establish a HPLC method for the determination of schizandrin, schisantherin A, deoxyschizandrin, γ-schishandrin and tanshinone II_A in Yixinshu tablet. Method: The Phenomenex Kinetex C₁₈ column was used with a mobile phase of acetonitrile-water by gradient elution, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was at 250 nm. Result: The linear ranges of schizandrin, schisantherin A, deoxyschizandrin, γ-schishandrin and tanshinone II_A were 21.56-215.6 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 6.500-65.00 mg·L⁻¹ ($r=1$), 3.460-34.60 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 6.920-69.20 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) and 2.400-24.00 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) respectively. The average recoveries of five components were 97.92% with RSD 2.34%, 100.28% with RSD 2.57%, 98.34% with RSD 2.73%, 98.06% with RSD 1.61% and 99.13% with RSD 1.42%. Conclusion: The method is simple, sensitive and repeatable. It can be a method for quality control of Yixinshu tablet.

[收稿日期] 20110712(003)
[基金项目] 国家科技部重大新药创制(2011ZX09401-097)
[第一作者] 秦建平, 本科, 工程师, 从事中药质量标准研究, Tel: 13861436436, E-mail: jianpingqin@ gmail. com
[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员, 高级工程师, 从事中药新剂型的研究与开发, Tel: 0518-85521956, E-mail: wzhhz-nj@ tom. com

[**Key words**] Yixinshu tablet; schizandrin; schisantherin A; deoxyschizandrin; γ -schishandrin; tanshinone II_A; HPLC

益心舒片处方由人参、丹参、五味子、黄芪、川芎和麦冬等药组成,其中五味子和丹参为益心舒片处方中主要药味。五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素为五味子中的主要有效成分,丹参酮 II_A 是丹参的主要有效成分。为了更好的控制产品质量,保证临床疗效,本文参照《中国药典》^[1] 及文献^[2-3],建立了 HPLC 测定益心舒片制剂中五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II_A 的含量测定方法。

1 仪器和试药

Waters 2695 高效液相色谱仪,Waters 2996 检测器;五味子醇甲(批号 110857-200709),五味子酯甲(批号 111529-200803),五味子甲素(批号 110764-200609),五味子乙素(批号 110765-200508),丹参酮 II_A(批号 110766-200616),对照品均购自中国药品生物制品检定所。乙腈(色谱纯),水(超纯水),其余试剂均为分析纯。益心舒片(江苏康缘药业股份有限公司生产,批号 090501,090502,090503)。

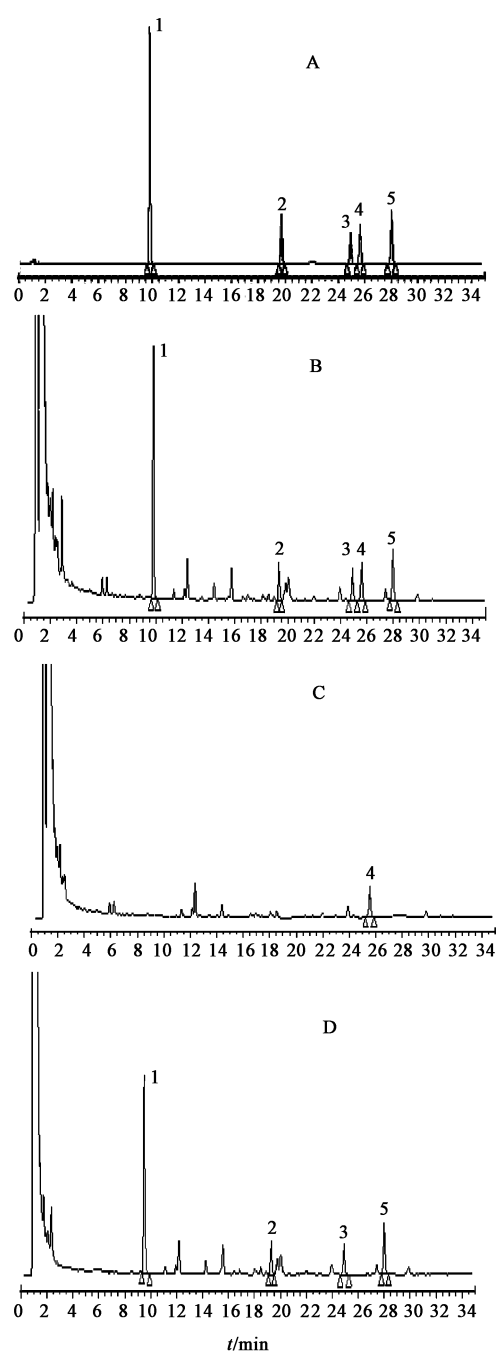
2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Phenomenex Kinetex C₁₈ 100A(4.6 mm × 100 mm, 2.6 μm);流动相乙腈(A)-水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 35 min, 30% ~ 70% A),流速 1 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃,测定波长 250 nm,进样量 10 μL,理论塔板数以五味子醇甲峰计,不得低于4 000。对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II_A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成含五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II_A 分别为 44,15,15,8,6 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 10 片,除去薄膜衣,研细,取约 1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)提取 40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.4 定量限 按上述色谱条件用对照品溶液稀释进行试验,结果五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮 II_A 的定量限分别为 22.86 ng(S/N = 11.3),14.32 ng(S/N = 10.8),8.06 ng(S/N = 11.6),15.25 ng(S/N = 11.9),6.488 ng(S/N = 10.5),检测限分别为 5.715 ng(S/N = 3.2),



A. 混合对照品;B. 样品;C. 五味子阴性样品;D. 丹参阴性样品
1. 五味子醇甲;2. 五味子酯甲;3. 五味子甲素;
4. 丹参酮 II_A;5. 五味子乙素

图 1 益心舒片色谱

4.773 ng(S/N = 3.9),2.687 ng(S/N = 3.4),5.083 ng(S/N = 4.1),2.595 ng(S/N = 3.8)。

2.5 线性关系的考察 精密称取对照品五味子醇甲 21.56 mg、五味子酯甲 6.50 mg、五味子甲素 3.46

mg、五味子乙素 6.92 mg 和丹参酮Ⅱ_A 2.40 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 质量浓度分别为 431.20,130.00,69.20,138.40,48.00 mg·L⁻¹的对照品溶液。分别精密量取上述溶液 0.5,1.0,2.0,4.0,5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准曲线。结果见表 1。

表 1 线性范围、回归方程和相关系数				
成分	线性范围 /mg·L ⁻¹	回归方程	<i>r</i>	
五味子醇甲	21.56 ~ 215.6	<i>Y</i> = 33 328 <i>X</i> + 1 289	0.999 9	
五味子酯甲	6.500 ~ 65.00	<i>Y</i> = 24 524 <i>X</i> - 1 209	1	
五味子甲素	3.460 ~ 34.60	<i>Y</i> = 40 977 <i>X</i> - 1 103	0.999 9	
五味子乙素	6.920 ~ 69.20	<i>Y</i> = 32 190 <i>X</i> - 2 408	0.999 9	
丹参酮Ⅱ _A	2.400 ~ 24.00	<i>Y</i> = 70 100 <i>X</i> - 4 294	0.999 9	

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液(五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 质量浓度分别为 43.12,13.00,6.92,13.84,4.80 mg·L⁻¹) 10 μL,注入液相色谱仪,重复进样 6 次,测得峰面积。五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 峰面积的 RSD 分别为 1.41%,1.48%,1.23%,1.34%,1.47%。结果表明精密度良好。

2.7 稳定性试验 取本品(批号 090501)10 片,除去包衣,研细,取约 1 g,精密称定。按供试品溶液制备项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 10 μL,分别于第 0,2,4,6,9,12 h 注入液相色谱仪,测得峰面积。五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 峰面积的 RSD 分别为 1.10%,1.36%,0.99%,1.54%,1.24%。结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取本品(批号 090501)10 片,除去包衣,研细,取约 1 g,精密称定。按供试品溶液制备项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,测定,计算含量,结果五味子醇甲平均含量为 0.15 mg/片,RSD 1.03%;五味子酯甲平均含量为 0.036 mg/片,RSD 2.96%;五味子甲素平均含量为 0.019 mg/片,RSD 2.88%;五味子乙素平均含量为 0.043 mg/片,RSD 2.96%;丹参酮Ⅱ_A 平均含量为 0.014 mg/片,RSD 2.66%。结果表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验 取本品(批号 090501,含量五味子醇甲为 0.15 mg/片,五味子酯甲为 0.036 mg/片,五味子甲素为 0.019 mg/片,五味子乙素为 0.043 mg/片,丹参酮Ⅱ_A 为 0.014 mg/片。),除去包衣,研细,取 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别精密加入含五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 为 215.6,51.2,27.6,61.4,22 mg·L⁻¹的混合对照品溶液 1 mL,然后精密加入甲醇 9 mL,按供试品溶液制备项下方法制备供试品溶液,进行含量测定,并计算回收率。结果见表 2。

表 2 益心舒片加样回收率测定(<i>n</i> = 6)			%
成分	平均回收率	RSD	
五味子醇甲	97.92	2.34	
五味子酯甲	100.28	2.57	
五味子甲素	98.34	2.73	
五味子乙素	98.06	1.61	
丹参酮Ⅱ _A	99.13	1.42	

2.10 样品含量的测定 取 3 批益心舒片样品,制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,计算,结果见表 3。

表 3 益心舒中 5 种成分测定(<i>n</i> = 3)						mg/片
成分	五味子醇甲	五味子酯甲	五味子甲素	五味子乙素	丹参酮Ⅱ _A	
090501	0.15	0.036	0.019	0.043	0.014	
090502	0.16	0.042	0.021	0.046	0.017	
090503	0.16	0.037	0.022	0.047	0.015	

3 讨论

在供试品溶液的制备时,考虑到指标成分的提取率,以及其他成分对含量测定的影响,考察了提取溶媒乙醇、甲醇、80% 甲醇、70% 乙醇、50% 甲醇和 50% 乙醇,比较了超声提取和回流提取的效果。结果表明采用甲醇超声处理提取效果较好。

本文采用 HPLC 进行五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和丹参酮Ⅱ_A 的含量测定,比较了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1% 磷酸溶液^[4] 3 种流动相系统的分离效果,结果采用乙腈-水溶液分离效果较好。比较了不同检测波长^[4-5] 及采用 PDA 检测器在 190 ~ 400 nm 扫描,结果表明 250 nm 处,各峰峰形良好,基线平稳,分离度高。比较了 Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱、Phenomenex Luna C₁₈ 柱和 Kromasil C₁₈ 柱,结果 Phenomenex Luna C₁₈ 柱和

白茅根多糖 IC1 的分离及其相对分子质量和单糖组成的测定

邹一可, 张明月, 王彩云, 王东*
(辽宁中医药大学研究生院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:分离纯化白茅根多糖,建立白茅根多糖相对分子质量的测定方法,并通过高效液相色谱法测定其单糖组成和摩尔比。方法:通过多次醇沉的方法对白茅根多糖进行分离纯化,得到白茅根多糖 IC1;采用高效液相色谱法,以右旋糖酐为标样,绘制多糖分子量的标准曲线,测定白茅根多糖 IC1 的相对分子质量;通过酸水解,使 IC1 水解成单糖,分析这些单糖的组成及其摩尔比。结果:经测定,白茅根多糖 IC1 的相对分子质量为8 292. 2;白茅根多糖 IC1 由鼠李糖,木糖,果糖,甘露糖,葡萄糖 5 种单糖组成,其摩尔比为 1:11. 45:1. 26:1. 02:59. 23。结论:多次醇沉的方法对白茅根多糖进行分离,效果良好,操作简便。高效液相法测定白茅根多糖分子质量及单糖组成灵敏度高,重复性好。

[关键词] 白茅根;多糖;分离纯化;高效液相色谱法;相对分子质量;单糖组成;摩尔比

[中图分类号] R284. 1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2012) 02-0080-03

Determination of Molecular Weight and Analysis of Monosaccharide Composition in Isolation of Polysaccharide from Imperata Cylindrica

ZOU Yi-ke, ZHANG Ming-yue, WANG Cai-yun, WANG Dong*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] Objective:To study on isolation the polysaccharide from Imperata cylindrica and to establish a method for the determination of the molecular weight of the polysaccharides in Imperata cylindrica, and to measure its composition and mole ratio through HPLC. Method:The polysaccharide in Imperata cylindrica was Isolated and

[收稿日期] 20110809(007)
[基金项目] 国家科技部重大创制候选药物项目(2009ZX09103-354)
[第一作者] 邹一可,硕士,从事中药制剂分析,Tel:15042401012,E-mail:zouyike_3399@163.com
[通讯作者] *王东,博士,教授,从事中药药效物质基础和质量标准研究,Tel:13842099959,E-mail:wdtem@163.com

Kromasil C₁₈柱未能使本文中所检测的 5 个成分均达到基线分离,快速分离柱 Phenomenex Kinetex C₁₈柱能较好的分离本品中上述 5 个成分。在本文所确定的检测条件下,所测定的 5 个成分与相邻色谱峰的分离度>1. 5。

本文采用 PDA 检测器对样品中所检测的 5 个成分进行了峰纯度验证,结果表明在本文所确定的检测条件下,样品中所测定的 5 个成分不含其他干扰成分。

针对所采用的色谱条件考察了不同柱温、不同流速、不同进样量和不同仪器,结果表明本文所采用的色谱条件耐用性良好。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:61, 70.

[2] 杨孝容,向清祥,熊俊如,等. HPLC 测定柏子养心丸中五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(11):1558.

[3] 冯华,张超云,邹孔强. HPLC 色谱法测定枣仁安神片中五味子醇甲的含量[J]. 中医药导报,2009,15(1):82.

[4] 杨孝容,向清祥,陈稼轩. 高效液相色谱法测定五味子和含五味子的制剂中五味子乙素及多种活性成分时流动相体系的选择[J]. 色谱,2009,3:313.

[5] 张延妮,岳宣峰,王喆之. 反相高效液相色谱同时测定五味子中五味子醇甲、五味子酯甲和五味子乙素的含量[J]. 分析科学学报,2007,23(1):41.