

丹酚酸 A 中有关物质含量的测定方法

于翠翠^{1,2}, 刘军锋², 车鑫¹, 刘珂^{1,2*}

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 山东靶点药物研究有限公司, 山东 烟台 264006)

[摘要] 目的: 建立一种测定丹酚酸 A 中有关物质含量的方法。方法: 用外标法测定丹酚酸 C 的含量, 采用 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.2% 磷酸水溶液(30:70)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 285 nm, 柱温 30 °C, 以主成分自身对照法控制其他杂质的总含量。结果: 丹酚酸 C 的含量均 < 1.0%, 其他杂质峰面积和 < 3.0%。结论: 该方法专属性强, 灵敏度高, 简单准确, 能有效控制丹酚酸 A 中有关物质的含量。

[关键词] 高效液相色谱法; 主成分自身对照法; 丹酚酸 C; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0094-04

Study for Determination of Related Substances in Salvianolic Acid A

YU Cui-cui¹, LIU Jun-feng¹, CHE Xin¹, LIU Ke^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China;
2. Shandong Target Drug Research Co., Ltd, Yantai 264006, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for the determination of reference substances in salvianolic acid A. **Method:** Diamonsil C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution(30:70) as mobile phase, flow rate 1 mL·min⁻¹, detection wavelength 285 nm, column temperature 30 °C, other relative substances were controlled by main component self-compare method. **Result:** The content of salvianolic acid C was less than 1.0%, and the others were less than 3.0%. **Conclusion:** This method is specific, sensitive, simple, accurate, and can effectively detect salvianolic acid C.

[Key words] HPLC; main component self-compare method; salvianolic acid C; determination

丹酚酸 A 为活性最强的酚酸, 可以清除氧自由基, 抑制脂质过氧化, 对心脑血管系统、神经系统、肝肾及肺损伤均有保护作用^[1]。由于丹参中丹酚酸 A 含量极低, 因此以丹参提取物(含丹酚酸 B > 50%)为起始原料, 经高温高压, 使丹酚酸 B 转化成丹酚酸 A, 再经色谱纯化, 得丹酚酸 A 原料。经过有关物质的分离与确证, 丹酚酸 A 原料中有关物质为丹酚酸 C、紫草酸及丹酚酸 A 异构体, 此类化合物与丹酚酸 A 结构相近, 性质相似, 因此本文采用 HPLC 对有关

物质进行分析并建立相应的含量测定及质量控制方法, 并进行了方法学研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 乙腈(色谱纯); 甲醇(色谱纯); 丹酚酸 C、紫草酸对照品(>98.0%, 批号 20080122, 上海融禾科技有限公司); 丹酚酸 A(批号 20071220, 山东靶点药物研究有限公司药化室提供)。以乙腈-0.2% 磷酸水(30:70)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。

2 方法

2.1 检测波长的选择 取丹酚酸 C、丹酚酸 A、紫草酸对照品适量, 加乙腈制成每 1 mL 含 40 μg 的溶液, 以乙腈为空白试剂, 在 200 ~ 400 nm 扫描, 最大吸收波长分别为丹酚酸 C 288.0, 丹酚酸 A 285.0

[收稿日期] 20110307(002)

[第一作者] 于翠翠, 硕士, 主要从事新药研发, E-mail: yccj1@163.com, Tel: 15854569158

[通讯作者] * 刘珂, 教授, 博士生导师, E-mail: liuke@ytu.edu.cn, Tel: 0535-6372066

nm,紫草酸 289.6 4 个化合物在 285 nm 处均有强紫外吸收,故采用 285 nm 作为检测波长。

2.2 专属性考察 取本品适量,加水 4 mL 使溶解,取 2 mL 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸进行破坏,另 2 mL 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液进行碱破坏,静置,分别调 pH 至中性,过滤,取滤液注入液相色谱仪,记录色谱图。另取本品适量,加水 2 mL 使溶解,加入 30% 过氧化氢,放置 1 h,过滤,取滤液注入液相色谱仪,记录色谱图。取本品适量,置 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置 4 h,加流动相适量使溶解,稀释,注入液相色谱仪,记录色谱图。取本品适量,置 RH 92.5% 湿度条件下放置 3 d,加流动相适量使溶解,并稀释,注入液相色谱仪,记录色谱图。取本品适量,置光照强度为 $(4\ 500 \pm 500) \text{ LX}$ 条件下放置 3 d,加流动相适量使溶解,并稀释,注入液相色谱仪,记录色谱图(图 1~7)。

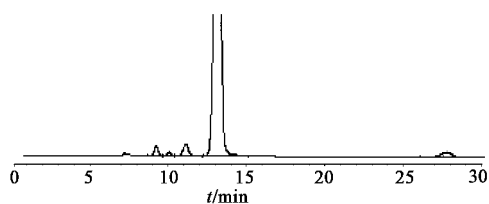


图 1 丹酚酸 A 破坏前色谱

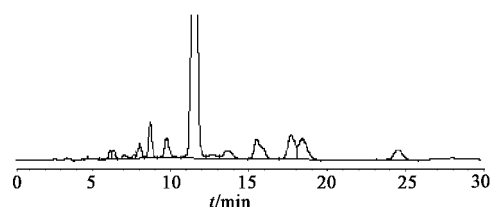


图 2 丹酚酸 A 碱破坏后色谱

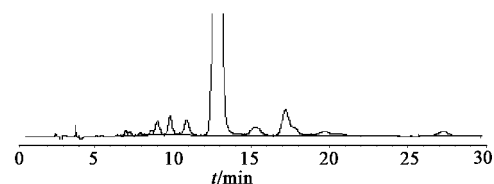


图 3 丹酚酸 A 酸破坏后色谱

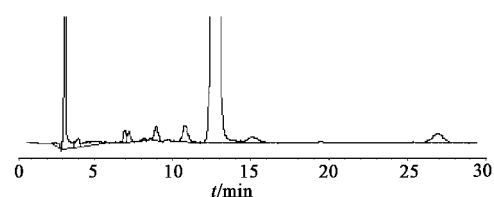


图 4 丹酚酸 A 氧化破坏后色谱

降解样品的丹酚酸 C 与相邻杂质峰的分离度均 > 1.5 ,丹酚酸 A 经破坏后,丹酚酸 C 与降解产物

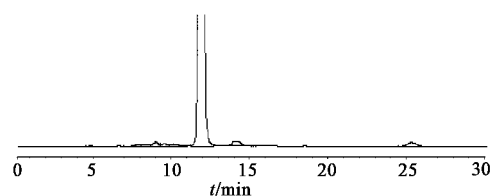


图 5 丹酚酸 A 高湿破坏色谱

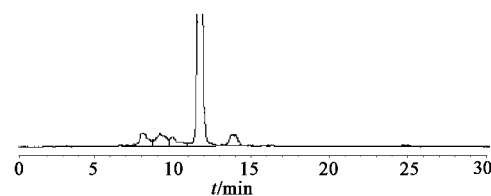


图 6 丹酚酸 A 高温破坏色谱

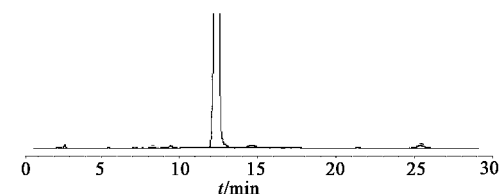


图 7 丹酚酸 A 强光破坏色谱

可以达到良好的分离,此方法专属性良好。

2.3 丹酚酸 C 的定量研究

2.3.1 检测限与定量限的确定 取丹酚酸 C 对照品适量,精密称定,加流动相使溶解并逐级稀释后进样测定,记录信噪比 $S/N = 3$ 时的色谱图,检测限为 $67 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。记录记录信噪比 $S/N = 10$ 时的色谱图,定量限为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取丹酚酸 C 对照品适量,精密称定,加流动相溶解配制 6 份浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,分别注入液相色谱仪检测,记录主峰保留时间及峰面积。在最低定量限浓度下,保留时间 RSD 0.76%,峰面积 RSD 2.24%,符合要求。

2.3.2 仪器精密度试验 取丹酚酸 A 适量,加流动相制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,作为供试品溶液,注入液相色谱仪,连续进样 5 次,结果丹酚酸 C 峰面积 RSD 1.51%,表明仪器具有良好的精密度。

2.3.3 溶液稳定性试验 配制供试品溶液,每隔一定时间进样,记录丹酚酸 C 峰面积,计算 5 h 内峰面积 RSD 1.54%,表明溶液在 5 h 内稳定,可以满足试验要求。

2.3.4 丹酚酸 C 线性范围考察 取丹酚酸 C 对照品适量,加制成每 1 mL 含 $10 \mu\text{g}$ 的溶液,作为母液。精密量取母液 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得

系列标准溶液。精密吸取标准溶液注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积。对丹酚酸 C 质量浓度及峰面积进行线性回归,得方程 $Y = 53.75X + 0.0167$ ($r = 0.9996$)。在 $0.600 \sim 2.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹酚酸 C 质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 重复性试验 照样品测定项下方法配制对照品溶液及 6 份供试品溶液。精密吸取上述对照品溶液及供试品溶液注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积,以外标法计算丹酚酸 C 含量,其 RSD 2.23%,符合有关物质含量测定方法学验证可接受范围的要求,说明本法具有良好的重复性。

2.3.6 中间精密度试验 照样品测定项下方法配制对照品溶液及供试品溶液。精密吸取上述溶液各 $20 \mu\text{L}$,分别注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积,照外标法计算丹酚酸 C 含量。比较以上由不同人员操作得的数据,得丹酚酸 C 的平均含量为 0.67%,RSD 3.01%,符合要求。

2.3.7 加样回收率试验 取丹酚酸 C 对照品适量,加流动相制成每 1 mL 含 $1 \mu\text{g}$ 的溶液,得含量测定用对照品溶液。取丹酚酸 C 对照品适量,加流动相制成每 1 mL 含 $10 \mu\text{g}$ 的溶液,得加样用丹酚酸 C 对照品溶液。取已知丹酚酸 C 含量的丹酚酸 A 9 份,配制 3 个浓度的溶液各 3 份,分别称取 10,12.5,15 mg,各置 25 mL 量瓶中,加流动相使溶解,定容,摇匀;分别精密量取 1 mL,各置 10 mL 量瓶中,分别加加样用丹酚酸 C 对照品溶液 0.25,0.35,0.45 mL,加流动相定容,得供试品溶液。

精密吸取供试品溶液及供含量测定用丹酚酸 C 对照品溶液各 $20 \mu\text{L}$,分注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积,计算回收率。计算得各浓度下的回收率均在 97%~103%,各回收率相对标准偏差为 2.17%,符合有关物质含量测定方法学验证可接受范围的要求。

2.3.8 耐用性试验 取丹酚酸 C 对照品适量,加流动相制成每 1 mL 含 $1 \mu\text{g}$ 的溶液,得对照品溶液。取丹酚酸 A 供试品适量,加流动相制成每 1 mL 含 $100 \mu\text{g}$ 的溶液,得供试品溶液。

分别考察流动相 pH 变化 (± 0.2)、柱温变化 ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$)、流速变化 ($\pm 10\%$)、检测波长变化 ($\pm 5 \text{ nm}$)、不同色谱柱等仪器色谱行为的变化对含量测定结果的影响。计算得各条件下丹酚酸 C 含量的绝对值均在 $\pm 0.1\%$ 以内,符合要求。

2.3.9 方法的确定 根据上述试验结果,对照品外标法可以有效准确的测定丹酚酸 C 的含量。参考国家标准已有类似药物的有关物质的控制方法,采用主成分自身对照法控制其他杂质的总含量。丹酚酸 A 原料有关物质的测定方法如下:

称取丹酚酸 A 适量,加流动相制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,得供试品溶液。取供试品溶液,加流动相稀释 100 倍,作为对照溶液。称取丹酚酸 C 对照品适量,加流动相制成每 1 mL 含 $1 \mu\text{g}$ 的溶液,得对照品溶液。

取上述供试品溶液、对照溶液及对照品溶液各 $20 \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,见图 8~10。

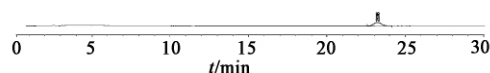


图 8 丹酚酸 C 对照品色谱

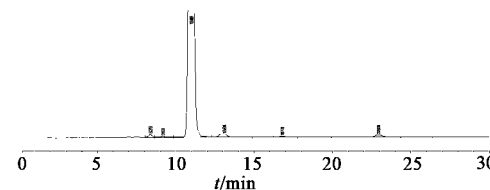


图 9 供试品色谱

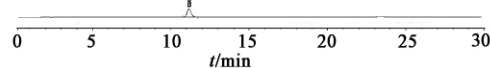


图 10 对照液色谱

3 批中试样品测定结果见表 1。

表 1 3 批样品有关物质测定

批号	其他杂质峰 面积和	对照液 主峰面积	丹酚酸 C /%
20080407	65.2	52.6	0.78
20080509	88.0	55.0	0.88
20080422	70.3	60.3	0.82

3 讨论

本文采用主成分自身对照法控制其他杂质的总含量,因此仅对丹酚酸 C 的分离度进行了测定,对其他杂质的分离度未做要求。

因丹酚酸 C 为已分离并确证的有关物质,且含量最高,因此首选对照品外标法测定含量,并进行了方法学验证,实验证明本方法专属性强、灵敏度高、精密度良好,可以有效地控制丹酚酸 C 的含量。由测定结果可以看出,3 批中试样品中丹酚酸 C 的含

陕西山阳野生五灵脂挥发性成分 GC-MS 研究

程明, 王宏洁, 杨连菊*, 冯学锋, 杨立新, 张永欣, 格小光, 张小波
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 分析陕西山阳野生五灵脂的挥发性成分组成, 研究野生状态下复齿鼯鼠取食情况。方法: 水蒸气蒸馏法提取五灵脂挥发性成分进行 GC-MS 分析。结果: 共鉴定出全反式角鲨烯(12.14%)、棕榈酸(8.27%)、单(2-乙基己基)邻苯二甲酸酯(8.25%)、苯二甲酸二丁酯(3.80%)、十四烷酸(3.04%)等 66 个成分。结论: 陕西商洛市山阳县产野生五灵脂中挥发性成分多为来自主要食料中的成分或者主体结构相同的物质。野生五灵脂采集时期的主要食料为青麸杨叶。

[关键词] 复齿鼯鼠; 五灵脂; 挥发性成分; 陕西山阳; 气质联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0097-04

GC-MS Analysis on Volatile Components of Wild Troglodytes Feces from Shanyang County of Shaanxi Province

CHENG Ming, WANG Hong-jie, YANG Lian-ju*, FENG Xue-feng,
YANG Li-xin, ZHANG Yong-xin, GE Xiao-guang, ZHANG Xiao-bo

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the volatile components of Feces Troglodytes. **Method:** The volatile components of Feces Troglodytes were extracted by steam distillation and analyzed by GC-MS. **Result:** Sixty-six components of Feces Troglodytes were identified and the main components are all-trans-squalene (12.14%), hexadecanoic acid (8.27%), mono(2-ethylhexyl) phthalate (8.25%), dibutyl phthalate (3.80%), tetradecanoic acid (3.04%). **Conclusion:** The volatile components of the sample are the ingredients with same basic structure and chemical compositions of the foods. The main food of the animal is Rhus leaf at gathering time.

[Key words] *Troglodytes xanthipes*; feces; volatile components; Shanyang county of shanxi province; GC-MS

[收稿日期] 2011-05-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873382)

[第一作者] 程明, 副研究员, 从事中药鉴定研究, Tel: 010-64014411-2983, E-mail: goodoctor@163.com

[通讯作者] * 杨连菊, 副研究员, 研究方向: 中药资源与质量标准, Tel: 010-64014411-2983, E-mail: ylj0705@yahoo.com.cn

量均 < 1.0%。

根据化学药品杂质研究指导原则的要求, 需对含量大于 0.10% 的杂质进行限量, 丹酚酸 A 中有关物质为酚酸类化合物, 紫外吸收与丹酚酸 A 相近, 因此本文用不加校正因子的主成分自身对照法对其他杂质进行限量。由测定结果可以看出, 3 批中试样品其他杂质的峰面积和均 < 对照液主峰面积的 3 倍

(3.0%)。

[参考文献]

- [1] 杜冠华, 张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报, 2004, 23(6): 355.

[责任编辑 蔡仲德]