

香丹注射液中丹酚酸 B 的 HPLC 法测定

李红磊, 张忠义, 胡玉佳, 张守尧

(第一军医大学 珠江医院 药材科, 广东 广州 510282)

摘要: 建立了 1 种测定香丹注射液中丹酚酸 B 含量的反相高效液相色谱法; 色谱分析柱为 Hypersil ODS(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(体积比 27:9:1.1:62.9, 含 10 mmol/L 的四丁基溴化铵), 检测波长为 285 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 31 °C 时, 丹酚酸 B 得到较好的分离; 丹酚酸 B 进样量在 0.264~1.584 μg 范围内线性良好, $r=0.9998$, 方法平均回收率为 98%, 为香丹注射液质量控制提供了分析方法。

关键词: 丹酚酸 B; 含量测定; 香丹注射液; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.72; R972 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2005)06-0128-02

Determination of Salvianolic Acid B in Xiangdan Injection by HPLC

LI Hong_lei, ZHANG Zhong_yi, HU Yu_jia, ZHANG Shou_yao

(Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: A gradient reversed-phase high performance liquid chromatography(RP_HPLC) was developed for the separation of salvianolic acid B from Xiangdan injection. Chromatographic separation was performed with a Hypersil ODS column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 31 °C with a mobile phase consisting of methanol-acetonitrile-aminic acid-water(27:9:1.1:62.9 by volume, 10 mmol/L tetrabutylammonium bromide) at a flow rate of 1.0 mL/min, the mobile phase was monitored by a photodiode array detector at 285 nm. The linear range for the detection of salvianolic acid B was 0.264-1.584 μg ($r=0.9998$), and the average recovery of the method was 98%. This method can be used for the quantification of salvianolic acid B in Xiangdan injection.

Key words: Salvianolic acid B; Determination; HPLC

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血调经、清心除烦之功效, 在临床上广泛用于心脑血管系统疾病。丹参水溶性成分为丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 等, 具有抗血栓、改善血液循环、抗氧化等作用。近年来研究发现丹酚酸类成分的抗心肌缺血的活性比丹参素和原儿茶醛更强, 其中丹酚酸 B 具有强烈的抗氧化和清除氧自由基的活性, 其抗脂质过氧化作用约为维生素 E 的 1 000 倍, 对肾功能不全和肝损伤均有一定的保护作用^[1]。鉴于丹酚酸 B 的明显功效, 在 2005 年版药典修订标准中改用丹酚酸 B 作为复方丹参片的指标成分进行质量监控。香丹注射液是丹参常用临床制剂之一, 是由丹参和降香 2 种药材制备成的注射液。目前香丹注射液的质量控制标准仅将原儿茶醛作为质量控制的指标成分, 用高效液相色谱法测定其含量^[2], 并没有对丹酚酸类成分进行控制。本文建立了测定香丹注射液中丹酚酸 B 含量的高效液相色谱法, 该法简便、准确, 适用于常规分析。应用本方法测定了 5 个厂家生产的香丹注射液, 结果表明, 不同厂家的香丹注射液中, 丹酚酸 B 的含量差异很大, 从而说明了控制此类成分的重要性。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

LC_6A 高效液相色谱仪, SPD_6AV 检测器, C_R4A 数据处理仪(均为日本岛津)。

丹酚酸 B 对照品由中国生物制品检定所提供, 甲醇、乙腈为色谱纯(天津四友公司), 水为双蒸水, 甲酸、四丁基溴化铵为分析纯。

收稿日期: 2004-12-13; 修回日期: 2005-07-18

作者简介: 李红磊(1979-), 男, 河北保定人, 硕士研究生, Tel: 020-31875380, E-mail: lhl003@163.com

准确称取丹酚酸 B 对照品适量, 置于 25 mL 容量瓶中, 加水稀释到刻度, 即配制成质量浓度为 0.264 mg/mL 的对照品溶液, 摇匀, 低温避光保存。

1.2 样品制备

精密量取不同厂家的香丹注射液 5 mL 分别置于不同的 100 mL 容量瓶中, 加水稀释到刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 低温避光保存。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(体积比 27:9:1.1:62.9, 含 10 mmol/L 的四丁基溴化铵); 检测波长为 285 nm; 流速为 1.0 mL/min, 进样体积为 10 μL, 柱箱温度为 31 °C, 衰减(ATTN)为 4, 纸速(SPEED)为 2 mm/min。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的考察

丹酚酸 B 分子中含有多个酚羟基, 极性较大, 作者先后采用不同比例的甲醇-水、甲醇-水-乙酸、甲醇-水-甲酸、乙腈-水-甲酸、甲醇-乙腈-水-甲酸为流动相进行测试, 发现乙腈的洗脱效果优于甲醇, 流动相中存在有甲酸时的柱峰形明显优于流动相中存在有乙酸时的峰形。但是, 当流动相中未加入离子对试剂四丁基溴化铵时, 丹酚酸 B 的色谱峰存在明显的肩峰和严重的拖尾现象, 对此我们在流动相中加入不同量的离子对试剂四丁基溴化铵来调整流动相, 发现当流动相中加入四丁基溴化铵浓度达到 6 mmol/L 时, 丹酚酸 B 的峰形明显改善, 但仍存在明显拖尾现象, 当流动相中加入四丁基溴化铵浓度达到 10 mmol/L 时, 拖尾现象基本消失, 峰形基本对称(见图 1A、B)。同时还发现温度较

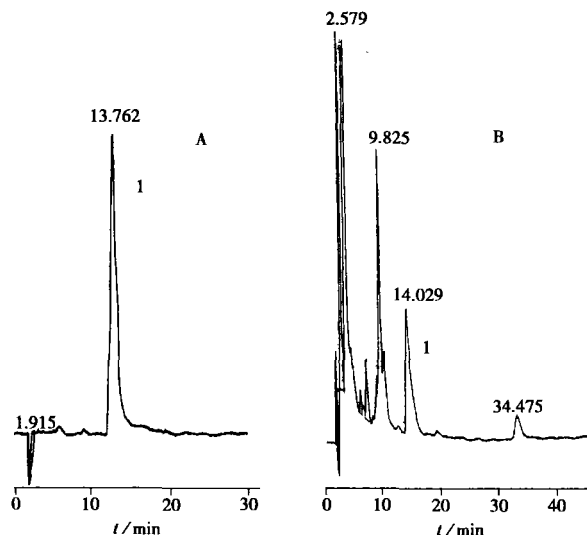


图 1 流动相中加入四丁基溴化铵(10 mmol/L)时丹酚酸 B 标准品(A)及香丹注射液(B)的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of salviolic acid B(A) and Xiangdan injection(B) with tetrabutylammonium bromide(10 mmol/L) in the mobile phase
1. salviolic acid

低时有利于各主要色谱峰的分离, 与文献报道基本一致^[3], 但灵敏度相对较低, 特别是当温度低于 28 °C 时, 基线呈明显波浪状。为此, 实验中柱箱温度采用 31 °C。

2.2 线性关系考察

用外标峰面积法考察线性关系。分别精密吸取对照品溶液 1、2、3、4、5、6 μL 进样测定, 所得丹酚酸 B 的峰面积对进样量(X , μL)进行线性回归, 回归方程为: $Y = 1.75 \times 10^5 X - 1.47 \times 10^4$, $r = 0.9998$, 结果表明进样量在 0.264~1.584 μg 范围内, 峰面积与进样量线性关系良好。

2.3 稳定性与精密度考察

取某厂家香丹注射液供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样, 测得丹酚酸 B 供试品峰面积 RSD 为 1.38%; 取其中某厂家香丹注射液供试品溶液, 按样品含量测定方法测定, 连续进样 6 针, 测得进样精密度 RSD 为 1.20%。

2.4 回收率实验

精密称取丹酚酸 B 对照品适量, 加水制成 0.1226 mg/mL 对照品溶液。同时量取已知含量的香丹注射液 1 mL 共 9 份, 每 3 份为一组, 置于 25 mL 的容量瓶中, 每组分别加入上述对照品溶液 5、10、15 mL, 加水稀释到刻度, 配成低、中、高 3 种浓度的溶液。按照样品测定法进行测定, 并计算回收率, 结果见表 1。

(下转第 132 页)

到纯度因子为 907, 说明峰纯度较高, 不受干扰; 并将得到的紫外光谱与竹红菌甲素的标准紫外光谱图对照而定性。

2.4 线性方程及检出限

配制竹红菌甲素标准溶液, 质量浓度分别为 25.2、50.4、100.8、201.6、252.0 mg/L, 在 1.2 色谱条件下得到竹红菌甲素的回归方程为: $A = -35.95 + 13.32 \rho$ (mg/L), $r = 0.999$, 线性范围 25.2~252 mg/L, 检出限 ($S/N = 3$) 为 1.2 ng。

2.5 竹红菌提取物样品的测定

取来自云南浦江县的竹红菌样品 3 批, 按 1.4 法经过前处理后, 对其中的竹红菌甲素含量进行分析, 得到其中的竹红菌甲素含量分别为 30.6、24.5、28.7 mg/g。

2.6 回收率实验与精密度实验

称取已测出竹红菌甲素含量的样品约 1 g 各 3 份, 分别添加准确称量的竹红菌甲素约 50 mg, 按上述供试品溶液制备方法处理后, 每个样品进样 5 次, 测定峰面积, 考察方法的回收率与精密度。得到回收率分别为 98%、98%、103% 以及相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.35%、0.36%、0.20%。

2.7 溶液稳定性

竹红菌甲素相对稳定, 但对光敏感, 实验过程中样品溶液要注意避光。

参考文献:

- [1] WAN Xiangyi, CHEN Yuanteng. [J]. China Science Bulletin (万象义, 陈远腾. [J]. 科学通报), 1980, 25(24): 1148-1149.
- [2] MARX J L. [J]. Science, 1987, 235(4788): 529-533.
- [3] LÜ Xiaogan, WANG Juying. [J]. China Journal of Pharmaceutical Analysis (吕效敢, 王菊英. [J]. 药物分析杂志), 1983, 3(1): 42-43.
- [4] LIN Haiping, CHEN Hong, YE Yong, et al. [J]. Journal of Zhejiang Forestry College (林海萍, 陈虹, 叶勇, 等. [J]. 浙江林学院学报), 2002, 19(2): 157-160.
- [5] LIU Guoquan, YU Zhaodou. Techniques of Chromatographic Columns [M]. Beijing: Chemical Industry Press (刘国诠, 余兆楼. 色谱柱技术 [M]. 北京: 化学工业出版社), 2001. 193-218.

(上接第 129 页)

表 1 丹酚酸 B 加样回收实验结果 ($n = 3$)
Table 1 Recovery of the method ($n = 3$)

No	Original m_0 /mg	Added m_A /mg	Total found m_T /mg	Recovery $R/\%$
1	1.213	0.613	1.838	102
2	1.213	1.226	2.343	92
3	1.213	1.839	3.065	101

2.5 样品测定

精密吸取上述供试品溶液 10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 按外标法计算含量, 结果 BL 厂家样品未检出丹酚酸 B, 而 YA 厂、SW 厂、SH 厂、XG 厂家样品中的丹酚酸 B 含量分别为 1.388、1.213、2.421、1.152 mg/mL, RSD ($n = 3$) 分别为 1.31%、0.93%、1.37%、2.00%。

参考文献:

- [1] PENG Sixun, ZHAO Shouxun, LIAO Qingjiang, et al. Advancement of Pharmaceutical Chemistry [M]. Beijing: China Medical Technology Press (彭司勋, 赵守训, 廖清江, 等. 药物化学进展 (第一卷) [M]. 北京: 中国医药科技出版社), 2000. 201-215.
- [2] Drug Standard of Ministry of Public Health of the People's Republic of China: Pharmacy of Chinese Raditional Patent Medicine [S] (中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂 [S]), 1998, V17: 200.
- [3] ZHANG Qiwei, ZHANG Ying, LI Jiping, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (张启伟, 张颖, 李计萍, 等. 中国中药杂志), 2001, 26(12): 848-849.