

# 改进HPLC法测定注射用丹参多酚酸盐中丹酚酸B的含量<sup>Δ</sup>

吴妍\*,耿魁魁,邓晓媚,马旖旎,陈辰,刘圣<sup>#</sup>(安徽省立医院药剂科,合肥 230001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5135-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.30

**摘要** 目的:改进注射用丹参多酚酸盐中丹酚酸B含量的测定方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59, V/V/V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为286 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:丹酚酸B检测质量浓度线性范围为0.1~3.2 mg/ml( $r=0.999\ 6$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为98.15%~100.23%(RSD=0.58%, $n=9$ )。结论:改进的方法灵敏度更高、重复性更好,适用于测定注射用丹参多酚酸盐中丹酚酸B的含量。

**关键词** 高效液相色谱法;注射用丹参多酚酸盐;丹酚酸B;含量测定

## Content Determination of Salvianolic Acid B in Salvianolate Injection by Improved HPLC

WU Yan, GENG Kuikui, DENG Xiaomei, MA Yini, CHEN Chen, LIU Sheng (Dept. of Pharmacy, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To improve the method of content determination of salvianolic acid B in Salvianolate injection. METHODS: HPLC method performed on the column of Hypersil ODS C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol-acetonitrile-methanoic acid-water (30:10:1:59, V/V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 286 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of salvianolic acid B was 0.1-3.2 mg/ml( $r=0.999\ 6$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 98.15%-100.23% (RSD=0.58%, $n=9$ ). CONCLUSIONS: The improved method is more sensitive and reproducible, and suitable for the content determination of salvianolic acid B in Salvianolate injection.

**KEYWORDS** HPLC; Salvianolate injection; Salvianolic acid B; Content determination

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎<sup>[1]</sup>,注射用丹参多酚酸盐是由丹参提取的以丹酚酸B为主要活性成分的水溶性化合物<sup>[2-4]</sup>。该化合物有活血、化瘀、通脉的功效,可用于冠心病稳定型心绞痛症见胸痛、胸闷、心悸者。目前,对丹参多酚酸盐、丹参药材及其制剂中相关成分的研究较多,且方法均较复杂<sup>[5-7]</sup>。因此,本课题组在前期正交试验的基础上<sup>[8]</sup>,改进了流动相,建立了以高效液相色谱法(HPLC)测定注射用丹参多酚酸盐中丹酚酸B含量的方法,以期对注射用丹参多酚酸盐的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010A HT型HPLC仪,包括紫外检测器、四元低压泵、自动进样器、LabSolutions Version 5.51 色谱工作站(日本Shimadzu公司);PHS-3C型电子pH计(上海雷磁仪器厂);FA2004B型万分之一电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司);KJ-202型振荡器(江苏康健医疗用品有限公司);TGL-16B型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司,批号:1507132、1603091,规格:100 mg/支);0.9%氯化钠注射液(安徽丰原药业股份有限公司,批号:14072395,规格:250 ml/袋);

Δ 基金项目:安徽省卫生计生委中医药科研课题(No.2014zy20)

\* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0551-62284181。

E-mail: aydwy@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:主任中药师。研究方向:临床药学与药剂学。电话:0551-62284029。E-mail: lsclchl@163.com

丹酚酸B对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:115939-25-8,纯度≥98%);甲醇、乙腈为色谱纯,甲酸为分析纯,水为灭菌注射用水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59, V/V/V/V);流速: 1.0 ml/min;检测波长: 286 nm;柱温: 25 ℃;进样量: 10 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取丹酚酸B对照品适量,置于1.5 ml离心管中,加75%甲醇溶液1.0 ml,以1 000 r/min振荡4 min后,以半径为5.9 cm、转速为1 000 r/min离心1 min,即得质量浓度为32 mg/ml的对照品贮备液。精密吸取上述贮备液100 μl,置于1.5 ml离心管中,加75%甲醇溶液溶解并稀释至1.0 ml,混匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品100 mg,置于125 ml量瓶中,加0.9%氯化钠注射液溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取0.9%氯化钠注射液作为阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。在此色谱条件下,丹酚酸B与其他成分分离较好,理论板数按丹酚酸B峰计≥2 000,且阴性对照在对照品主峰相应的保留时间处(7.48 min)无色谱峰出现,表明对测定无干扰。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 ml,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分

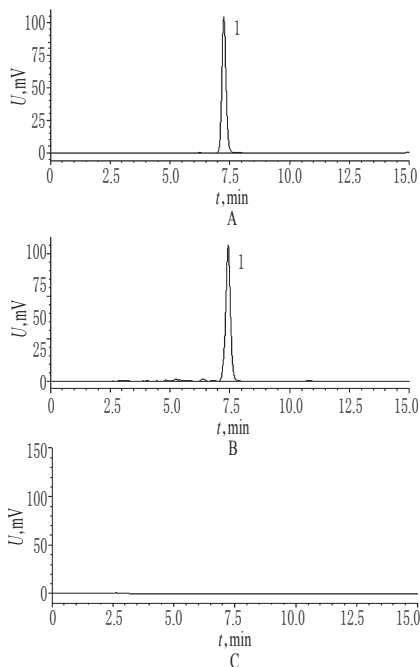


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. salvianolic acid B

质量浓度( $x$ , mg/ml)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得丹酚酸B的回归方程为 $y=7\ 202\ 620x+30\ 990$  ( $r=0.999\ 6$ )。结果表明,丹酚酸B检测质量浓度线性范围为 $0.1\sim 3.2$  mg/ml。

### 2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD=0.91% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1507132)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD=0.42% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置8 h内稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

取同一批样品(批号:1507132)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,丹酚酸B的平均含量为78%,RSD=1.35% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:1507132)10 mg,精密称定,共9份,各置于10 ml量瓶中,分别加入低、中、高质量的丹酚酸B对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

### 2.9 样品含量测定

取2批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算丹酚酸B的含量。结果,2批样品(批号:1507132、1603091)中丹酚酸B的平均含量分别为77.73%、79.21%,RSD分别为1.33%、1.43% ( $n=3$ )。

## 3 讨论

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery test ( $n=9$ )

取样量, g	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.010 5	8 155.34	800.00	8 940.54	98.15		
0.010 1	7 844.66	800.00	8 638.58	99.24		
0.010 4	8 077.67	800.00	8 872.63	99.37		
0.010 2	7 922.33	1 600.00	9 505.21	98.93		
0.010 1	7 844.66	1 600.00	9 434.10	99.34	99.12	0.58
0.010 3	8 000.00	1 600.00	9 577.76	98.61		
0.010 6	8 233.01	3 200.00	11 401.97	99.03		
0.010 9	8 466.02	3 200.00	11 639.14	99.16		
0.010 8	8 388.35	3 200.00	11 595.71	100.23		

### 3.1 流动相的选择

本课题组在预试验时分别采用甲醇-5 mmol/L 磷酸二氢钾<sup>[9]</sup>、乙腈-0.03% 磷酸<sup>[10]</sup>、甲醇-乙腈-水为流动相。结果,前两种溶液作为流动相时丹酚酸B峰存在拖尾现象,理论板数较低,且保留时间相对较短;而甲醇-乙腈-水作为流动相时丹酚酸B峰稍有拖尾。笔者在后者基础上进行改进,加入甲酸,结果丹酚酸B峰形改善。因此,本试验最终选择甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59,  $V/V/V/V$ )作为流动相。

### 3.2 对含量测定结果的分析

丹酚酸B又称丹酚乙酸(Salivanic acid B)<sup>[10]</sup>,按照注射用丹参多酚酸盐的质量标准(YBZ09012005-2010Z-2013)丹参乙酸镁含量应达80.0%~90.0%,因丹参乙酸镁为丹酚酸B的镁盐存在形式,且丹参乙酸镁含量=丹酚酸B含量 $\times 1.03$ <sup>[3]</sup>,故注射用丹参多酚酸盐中丹酚酸B含量应达到77.67%~87.38%。从本研究结果来看,各批次样品中丹酚酸B含量的检测结果均符合质量标准,但含量还是相对较低。

综上所述,改进的方法灵敏度更高、重复性更好,适用于测定注射用丹参多酚酸盐中丹酚酸B的含量。

## 参考文献

- [1] 高元峰,陈虎,王银辉,等.丹酚酸B对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国药房,2013,24(43):4 047.
- [2] 赵业清,朱慧娟,文九芳.丹参多酚酸盐注射液治疗冠心病心绞痛的系统评价[J].现代中西医结合杂志,2012,21(16):1 722.
- [3] 赵琼,任大伟,杨瑞花,等.丹参不同产地加工方法对丹参多酚酸盐质量的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(3):645.
- [4] 吴笛,叶秋雄,李楚源.一测多评法测定复方丹参片中5种酚酸类成分的含量[J].中国新药杂志,2013,22(18):2 130.
- [5] 李安平,杨锡,丁永辉,等.HPLC法同时测定丹参注射液中8种成分[J].兰州大学学报:医学版,2012,38(3):34.
- [6] 薛静,叶正良,李德坤,等.HPLC同时测定丹参多酚酸盐中丹酚酸D、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):70.
- [7] 厉瑶,郭正泰,龚行楚,等.丹参红花混煎液中丹参素、羟基红花黄色素A、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸B的HPLC测定方法[J].中国中药杂志,2013,38(11):1 653.
- [8] 耿魁魁,刘圣,吴妍.正交实验法优选注射用丹参多酚酸盐调配技术[J].中成药,2015,37(1):220.

# 呼吸通口服液的质量标准提高研究<sup>△</sup>

景霞\*,许静#,湛雯,孙芳(南京医科大学附属南京儿童医院,南京 210008)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5137-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.31

**摘要** 目的:提高呼吸通口服液的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中百部、黄芩、牛蒡子进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中黄芩苷的含量;色谱柱为Agilent Eclipse Plus-C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(48:52,V/V),流速为0.8 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μl。结果:百部、黄芩、牛蒡子的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。黄芩苷检测进样量线性范围为0.378 0~3.779 5 μg( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为96.52%~104.95%(RSD=1.28%, $n=9$ )。结论:提高的标准能更加有效地控制呼吸通口服液的质量。

**关键词** 呼吸通口服液;质量标准;百部;黄芩;牛蒡子;薄层色谱法;黄芩苷;高效液相色谱法

## Study on the Quality Standard of Huxitong Oral Solution

JING Xia, XU Jing, ZHAN Wen, SUN Fang (Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard for Huxitong oral solution. METHODS: TLC was conducted for the qualitative identification of *Stemona japonica*, *Scutellaria baicalensis* and *Fructus arctii*; HPLC was adopted for the content determination of baicalin: the column was Agilent Eclipse Plus-C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (48:52, V/V) at a flow rate of 0.8 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 25 ℃, injection volume was 20 μl. RESULTS: TLC spots of *S. japonica*, *S. baicalensis* and *F. arctii* were clear and well separated, with no interference in negative control. The linear range of baicalin was 0.378 0-3.779 5 μg ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 96.52%-104.95% (RSD=1.28%, $n=9$ ). CONCLUSIONS: The improved standard can more effectively control the quality of Huxitong oral solution.

**KEYWORDS** Huxitong oral solution; Quality standard; *Stemona japonica*; *Scutellaria baicalensis*; *Fructus arctii*; TLC; Baicalin; HPLC

呼吸通口服液(批准文号:苏药制字Z04001263)由百部、黄芩、牛蒡子、天花粉、芫花、桔梗6味药材共制而成。方中黄芩具有清热燥湿、泻火解毒之功效;百部具有润肺下气、止咳之功效;牛蒡子可疏散风热、宣肺利咽<sup>[1-2]</sup>。诸药共奏清热解毒、止咳化痰之功,临床广泛用于上呼吸道感染、支气管炎、低热、咳嗽等症的治疗。原呼吸通口服液质量标准(BJ-ZJ5-06)通过盐酸镁粉反应和碘化铋钾反应对其中的黄酮类和生物碱类成分进行化学鉴别,不符合现代中药制剂质量控制的要求。近年有对其中成分进行高效液相色谱(HPLC)检测的报道<sup>[3-5]</sup>,但对其主要药味的薄层色谱(TLC)鉴别未见报道。由此可见,本制剂质量标准亟待提高与完善。本研究中,笔者通过对呼吸通口服液的主要药味进行TLC鉴别,并对其中君药黄芩有效成分黄芩苷进行含量测定,旨在更加有效地控制其质量。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括二元泵、二极管阵列检测器(美国Agilent公司);MS205DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KH3200V型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:40 W,频率:150 kHz);TH-II型数控薄层显色加热器(上海科哲生化科技有限公司);ZF-20C型暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

呼吸通口服液(本院自制,批号:140326-1、140326-2、140326-3、140423-3、140425-3、141013-1、141013-2、141013-3,规格:10 ml/支;本院委托江苏康缘药业股份有限公司生产,批号:141201,规格:10 ml/支);黄芩苷对照品(批号:110715-201117,纯度:91.7%)、对叶百部对照药材(批号:121221-201003)、直立百部对照药材(批号:121588-201101)、黄芩对照药材(批号:120955-201309)、牛蒡子对照药材(批号:120903-201109)均购于中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,

[9] 赵琼,孙仁弟,杨瑞花,等.不同产地丹参药材对丹参多酚

△基金项目:南京医科大学科技发展基金项目(No.2012NJMU068)  
\*主管药师。研究方向:医院制剂检验与质量标准。E-mail:jing\_xiaxia@163.com

#通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:025-83117221

酸盐质量的影响[J].上海医药,2014,35(9):53.

[10] 黄铁英,石苏英,周黎琴.注射用丹参多酚酸盐的稳定性再评价[J].中国生化药物杂志,2016,36(3):157.

(收稿日期:2016-01-15 修回日期:2016-08-19)

(编辑:刘柳)