

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.010

高效液相色谱法测定清补通络丸中丹酚酸 B 含量*

邱远金¹, 王 林², 周卫刚³, 宋海龙¹, 李江涛³, 刘纪杉³, 李晓瑾¹, 高 辉³, 朱国强¹

(1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830054;
3. 新疆维吾尔自治区第六人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830013)

摘要:目的 建立测定清补通络丸中丹酚酸 B 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 ACE 5 Super C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸(22:78, V/V), 检测波长为 286 nm, 流速为 1.2 mL/min, 柱温为 25 °C。结果 丹酚酸 B 质量浓度在 30.62~306.20 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.9975$ ($n=6$); 平均加样回收率为 99.55%, RSD 为 1.31% ($n=6$); 供试品中丹酚酸 B 的平均含量为 11.030 5 mg/g。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 可用于检测清补通络丸中丹酚酸 B 的含量。

关键词: 布鲁氏杆菌病; 清补通络丸; 高效液相色谱法; 丹酚酸 B; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)23-0040-03

Content Determination of Salvianolic Acid B in Qingbutongluo Pills by HPLC

QIU Yuanjin¹, WANG Lin², ZHOU Weigang³, SONG Hailong¹, LI Jiangtao³, LIU Jishan³, LI Xiaojin¹, GAO Hui³, ZHU Guoqiang¹

(1. Xinjiang Institutes of Traditional Chinese Medicine and National Medicine, Urumqi, Xinjiang, China 830002; 2. Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830054; 3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Sixth People's Hospital, Urumqi, Xinjiang, China 830013)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of salvianolic acid B in Qingbutongluo Pills. **Methods** The content of salvianolic acid B in Qingbutongluo Pills was determined by the HPLC

*基金项目: 国家中药材产业技术体系试验站专项资金项目[CARS-21]; 新疆地产中药民族药新药研发培育项目[2016-02-07]。

第一作者: 邱远金, 男, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为天然药物化学与药物制剂, (电话)0991-8856353(电子信箱) exmqjy@189.cn。

醇类能增大药物的溶解度, 减小微乳颗粒, 乳化性能好, 常作为助表面活性剂使用^[15], 故本研究中选择无水乙醇作为助表面活性剂。

高温试验结果表明, 柚皮苷微乳在 60 °C 放置 5 d 后, 外观明显浑浊, 这可能与柚皮苷在热水中溶解度急剧升高, 柚皮苷从油相中转入水相, 破坏微乳结构有关, 表明柚皮苷微乳制剂应常温或低温贮藏。由常温留样考察试验结果可知, 柚皮苷微乳放置 6 个月后未见分层, 透光率和含量未见明显变化, 表明柚皮苷微乳在 25 °C 放置 6 个月稳定性良好。

综上所述, 本方法所制备的柚皮苷微乳可为扩大柚皮苷的应用奠定基础, 但能否满足临床需求, 提高药物疗效, 还需要通过后续试验考察和验证。

参考文献:

- [1] 李积东, 黄起壬. 柚皮苷的分离提取及药理作用研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(7): 67-68.
- [2] LIN SP, HOU YC, TSAI SY, et al. Tissue distribution of naringenin conjugated metabolites following repeated dosing of naringin to rats[J]. Bio Medicine, 2014, 4(3): 1-6.
- [3] TRIPOLI E, LA GM, GIAMMANCO S, et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review[J]. Food Chem, 2007, 104(2): 466-479.
- [4] DALMORA ME, DALMORA SL, OLIVEIRA AG. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in

cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect[J]. Int J Pharm, 2001, 222(1): 45-55.

- [5] 黄月纯, 魏 刚. 广陈皮 HPLC 指纹图谱的建立及在药材鉴定中的应用研究[J]. 中草药, 2008, 39(2): 275-277.
- [6] 郑国栋, 蒋 林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分[J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.
- [7] 张超洪, 肖维强, 赵 鹏, 等. 广东省化橘红中黄酮类物质的 HPLC 测定[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 483-486.
- [8] 兰小群, 沈 晓, 袁 娟, 等. 鸬鹚油微乳处方优化及稳定性研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(1): 38-41.
- [9] 李沛波, 王永刚, 吴 忠, 等. 以化橘红为基源的一类新药柚皮苷的临床前研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(6): 1-5.
- [10] 张 涵, 索绪斌, 宋雅芳, 等. 柚皮苷亲水凝胶骨架片制备及体外释放的研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1500-1503.
- [11] 朱宏平, 熊玉卿. 柚皮苷的药物代谢动力学研究概况与进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(11): 1297-1303.
- [12] 王红喜. 微乳制剂的研究进展[J]. 国外医学: 药学分册, 1996, 23(4): 206-211.
- [13] 吴顺芹, 李三鸣, 郎轶咏, 等. 水包油型微乳形成因素的考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 96-99.
- [14] 柯云玲, 潘金明, 席建军, 等. 青蒿琥酯自微乳的制备与质量评价[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 735-740.
- [15] 罗国平, 妙 苗, 白 杨, 等. 伪三元相图法优化复方丁香油微乳制备工艺[J]. 中国药业, 2020, 29(7): 87-89.

(收稿日期: 2020-03-29; 修回日期: 2020-06-21)

method. The chromatographic column was ACE 5 Super C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid (22 : 78, V/V), the detection wavelength was 286 nm, the flow rate was 1.2 mL/min, and the column temperature was 25 °C. **Results** The linear range of salvianolic acid B was 30.62 - 306.20 μg/mL ($r=0.9975$, $n=6$). The average recovery rate was 99.55%, and the RSD was 1.31% ($n=6$). The average content of salvianolic acid B in Qingbutongluo Pills was 11.030 5 mg/g.

Conclusion The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the content determination of salvianolic acid B in Qingbutongluo Pills.

Key words: Brucellosis; Qingbutongluo Pills; HPLC; salvianolic acid B; content determination

布鲁氏杆菌病(Bruecellosis)简称布病,是一种由革兰阴性杆菌[布鲁氏杆菌属细菌(*Brucella*)]侵入机体后引起的变态反应性传染病^[1],分为急性期和慢性期,急性期主要采用西药治疗,慢性期提倡中药治疗,中医针对病因病机辨证给予具有补气扶正、活血化瘀、清热祛湿、通络止痛等功效的中药治疗^[2-3]。清补通络丸由丹参、党参、黄芪、独活等15味中药组方,丹参为君药。丹参富含丹参酮II_A、丹酚酸B、丹参素等化学成分,其中丹酚酸B(Sal B)是标志性有效成分之一,含量较高($\geq 3.0\%$)^[4],且对照品易于获取,目前研究得最多;丹酚酸B具有改善缺血、缺氧所致的心肌细胞损伤,抑制心血管收缩、抗动脉粥样硬化等药理活性,故选择丹酚酸B作为含量测定的指标性成分^[5-10]。本研究采用高效液相色谱(HPLC)法测定清补通络丸中丹酚酸B含量,并进行方法学考察,旨在为有效控制药物的质量和保障用药安全提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SK5200HP型超声仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为140 W,频率为42 kHz);AB265-S型电子分析天平(梅特勒-托利多国际贸易<上海>有限公司,精度为十万分之一);Ultimate3000型高效液相色谱仪(赛默飞世尔公司)。

1.2 试药

丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院,批号为WKQ18042503);清补通络丸(新疆维吾尔自治区中药民族药研究所,自制,规格为每10丸重1.4 g,批号分别为20170321,20170322,20170323);甲醇、乙腈均为

色谱纯;磷酸为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACE 5 Super C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸(22 : 78, V/V);检测波长:286 nm;流速:1.2 mL/min;进样量:10 μL;柱温:25 °C。

2.2 溶液制备

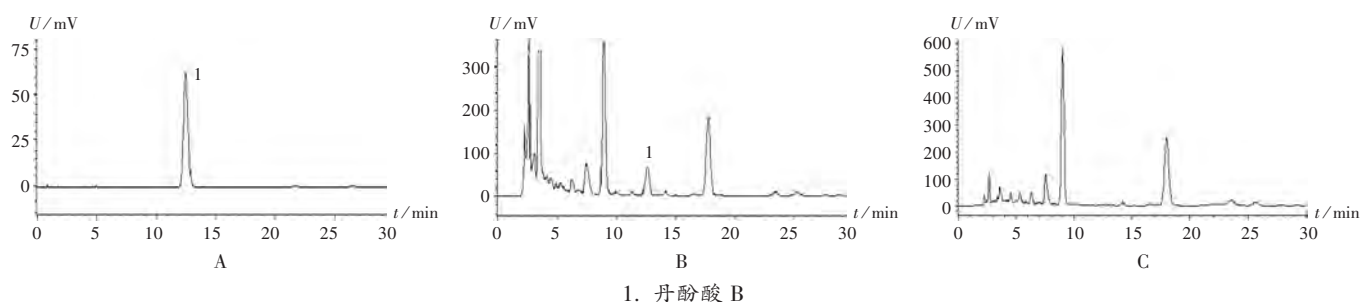
对照品溶液:取丹酚酸B对照品适量,置50 mL容量瓶中,加甲醇-水(8 : 2, V/V)溶液溶解,定容,得质量浓度为306.2 μg/mL(即0.306 2 mg/mL)的对照品溶液。

供试品溶液:取样品适量,粉碎,称取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇-水(8 : 2, V/V)混合溶液50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为140 W,频率为42 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇-水(8 : 2, V/V)混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:取缺丹参的阴性对照品0.5 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备溶液,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性及阴性干扰试验:分别取对照品溶液、供试品溶液、缺丹参的阴性对照品溶液10 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,见图1。结果丹酚酸B对照品峰与供试品溶液丹酚酸B峰的保留时间一致,阴性对照品溶液在相应位置处未出现丹酚酸B吸收峰,且丹酚酸B色谱峰与其他组分色谱峰分离完全,表明处方中其他药材对丹酚酸B的含量测定无干扰。



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

线性关系考察:分别精密吸取 2.2 项下对照品溶液 1, 2, 3, 5, 10 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇-水(8:2, V/V)溶液定容, 精密吸取 10 μ L, 注入色谱仪, 按拟订色谱条件测定, 以峰面积(Y)为纵坐标、丹酚酸 B 质量浓度(X)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.177X - 5.8561$, $r = 0.9975$ ($n = 6$)。结果表明, 丹酚酸 B 质量浓度线性范围为 30.62 ~ 360.20 μ g/mL。

精密度试验:吸取同一对照品溶液(306.20 μ g/mL) 10 μ L, 重复进样 6 次, 按拟订色谱条件测定峰面积。结果峰面积的 RSD 为 0.63% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 10 μ L, 按拟订色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 时测定丹酚酸 B 的峰面积。结果峰面积的 RSD 为 1.24% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:精密称取同一批(批号为 20170321)样品 6 份, 依法制备供试品溶液, 并测定丹酚酸 B 含量。结果平均含量为 10.7839 mg/g, RSD 为 1.70% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

耐用性试验:分别考察不同流速、不同柱温、不同流动相比、不同波长、不同型号色谱柱对丹酚酸 B 含量的影响。结果柱温、流速、流动相比、检测波长、色谱柱等条件微小变化时, 供试品中丹酚酸 B 含量的检测结果无明显差异, 表明该方法的色谱条件耐用性良好。

加样回收试验:称取同一批(批号为 20170321, 丹酚酸 B 含量为 10.7839 mg/g)样品 6 份, 各 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入 10 mL 对照品溶液(质量浓度为 0.3062 mg/mL)和 40 mL 甲醇-水(8:2, V/V)溶液, 依法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液, 按拟订色谱条件测定峰面积, 计算平均回收率和 RSD。结果见表 1。

表 1 丹酚酸 B 加样回收试验结果($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
2.5592	3.0620	5.6151	99.80	99.55	1.31
2.5708	3.0620	5.6450	100.40		
2.5484	3.0620	5.5675	98.60		
2.5009	3.0620	5.6119	101.60		
2.5221	3.0620	5.5259	98.10		
2.5127	3.0620	5.5380	98.80		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品(批号分别为 20170321, 20170322, 20170323), 按丹酚酸 B 含量测定方法进行测定。结果 3 批样品丹酚酸 B 的含量分别为 10.9767, 10.8527, 11.2620 mg/g, 平均含量为 11.0305 mg/g, RSD 为 1.90% ($n = 3$)。

3 讨论

丹酚酸 B 含量的测定方法有 HPLC 法、红外光谱法、毛细管电泳法^[11], 其中 HPLC 法较常用^[12-16]。清补通络丸是医院制剂, 临床反映疗效良好。本研究中参考 2015 年版《中国药典(一部)》, 建立了检测清补通络丸中丹酚酸 B 含量的 HPLC 法, 并进行方法学验证。本方法测定结果稳定, 分离效果较好, 阴性对照对试验结果无干扰, 可用于测定清补通络丸中丹酚酸 B 的含量。清补通络丸由多味中药组方, 成分复杂, 为更好控制其质量, 还需要建立其他有效成分含量检测方法。

参考文献:

- [1] 邢进, 王金峰, 赵宝华. 布鲁菌病及其诊断方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(3): 69-73.
- [2] 徐楠, 李娜. 布氏杆菌病流行病学及诊治研究进展[J]. 中国实用医药, 2010, 5(20): 46-47.
- [3] 李梦东, 王宇明. 实用传染病学(第2版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 480-487.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76.
- [5] 刘杰, 高秀梅, 王怡, 等. 丹酚酸 B 对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究[J]. 中草药, 2006, 37(3): 409-412.
- [6] 田霞, 王逸平. 丹酚酸 B 镁抑制 ATP 和 KCl 诱导大鼠主动脉平滑肌细胞内钙的升高[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(3): 311-316.
- [7] 吕炳强, 范英昌, 孙连胜. 丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对动脉粥样硬化家兔血清一氧化氮及甘油三酯的影响[J]. 天津中医学院学报, 2006, 25(1): 32-34.
- [8] TAN MK, ZHANG JT. Salvianolic acid B inhibits fibrin formation and neurotoxicity of amyloid β protein invitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(4): 380-384.
- [9] 晋迎申. 丹酚酸 B 热稳定性研究[J]. 上海医药, 2014, 35(21): 78-80.
- [10] 孙仁弟, 徐向阳, 宋燕青. 丹酚酸 B 的药理研究进展[J]. 药物流行病学杂志, 2012, 21(9): 458-462.
- [11] 王欢. 丹酚酸 B 的含量测定方法研究进展[J]. 江西中医药, 2010, 41(6): 79-80.
- [12] 王世礼, 朱孟磊, 宿晓法, 等. 蒲苓益炎康颗粒中丹酚酸 B 含量检测[J]. 中国处方药, 2019, 17(9): 39-40.
- [13] 林生文, 李瑞明, 陈孝, 等. 高效液相色谱法测定丹墨胶囊中丹酚酸 B 含量[J]. 中国药业, 2011, 20(21): 20-21.
- [14] 郭强, 宋汉敏, 李振国. HPLC 法测定活血通脉片中丹酚酸 B 的含量[J]. 药学研究, 2011, 24(11): 22-24.
- [15] 王瑾, 王友兰, 吴爱英. 高效液相色谱法测定脉管复康胶囊中丹酚酸 B 含量[J]. 中国药业, 2012, 21(23): 18-19.
- [16] 封海霞, 况刚, 王慧, 等. HPLC 测定乐脉片中丹酚酸 B 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 144-145.

(收稿日期: 2020-03-19; 二次修回日期: 2020-08-11)