

引用本文:周文艳,王宇明,黄雁,等.高效液相色谱法测定复方黄黛片中丹酚酸B的含量[J].安徽医药,2022,26(3):463-465.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.03.009.

◇ 药物分析 ◇



高效液相色谱法测定复方黄黛片中丹酚酸B的含量

周文艳¹,王宇明¹,黄雁¹,程世云²

作者单位:¹合肥亿帆生物医药有限公司,安徽 合肥 230061;

²安徽省食品药品检验研究院,安徽 合肥 230051

通信作者:程世云,女,副主任药师,研究方向为中药质量控制,Email:live781210@sina.com

基金项目:安徽省2018年科技厅重大专项(18030801127)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(HPLC)用于测定复方黄黛片中丹酚酸B的含量。**方法** 色谱柱为C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸(22:78),流速为1.0 mL/min,检测波长为286 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μL。**结果** 丹酚酸B在10.076~151.140 mg/L范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为95.62%,相对标准差为1.6%。**结论** 该法简便、准确,可用于制剂的质量控制。

关键词: 丹酚酸B; 复方黄黛片; 高效液相色谱法; 质量控制

Determination of salvianolic acid B in compound realgar and natural indigo tablets by HPLC

ZHOU Wenyan¹, WANG Yuming¹, HUANG Yan¹, CHEN Shiyun²

Author Affiliations:¹Hefei Yifan biomedical Co., Ltd, Hefei, Anhui 230061, China;

²Anhui Institutes for Food and Drug Control, Hefei, Anhui 230051, China

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of salvianolic acid B in the compound realgar natural indigo tablet. **Methods** A C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (22 : 78), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 286 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** Salvianolic acid B showed a good linear relationship with the peak area in the concentration range of 10.076~151.140 mg/L ($r=0.999\ 9$), the average recovery was 95.62%, and the relative standard deviation (RSD) was 1.6%. **Conclusion** The method is simple and accurate, and can be used for the quality control of compound realgar and natural indigo tablets.

Key words: Salvianolic acid B; Compound realgar and natural indigo tablets; HPLC; Quality control

复方黄黛片由青黛、雄黄、太子参、丹参等四味中药组成,本品具有清热解毒,益气生血的功效,临床用于初治的急性早幼粒细胞白血病^[1-5],治疗效果确切,现已收录入国家医保药物目录。复方黄黛片现行标准为国家食品药品监督管理局标准(标准号YBZ13122009),标准中对主药雄黄、青黛进行了含量控制,丹参也进行了质量控制,只采用原儿茶醛的薄层色谱鉴别作为质量控制方法,此法专属性不强,为更好控制该制剂的质量,本研究于2018年5月至2019年3月采用重现性和专属性均较好的高效液相色谱法测定样品中水溶性成分丹酚酸B的含量^[6-11]。方法学研究结果表明:该方法准确度高,重现性好。

1 仪器与试剂

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪;瑞士梅特勒XP205型电子天平;Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ (250

mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱。

丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院提供,批号111562-201716,对照品含量94.1%,供含量测定用);复方黄黛片样品(天长亿帆制药有限公司提供,批号170201、170202、170701、171101、180101、180301、180401、180501、180901、180902、180903、181201、181202)。甲醇和乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)为流动相,流速为1.0 mL/min,检测波长286 nm,柱温35 ℃,进样量10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸B对照品适量,加甲醇稀释制成100.76 mg/L的对照品

溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品20片,除去包衣,研细,取约0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲酸-甲醇-水(1:80:19)溶液25 mL,称定重量,超声处理(功率300 W,频率50 kHz)20 min,放冷,加甲酸-甲醇-水(1:80:19)溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按标准制法^[11],制备缺丹参的阴性样品。取阴性样品适量,按照“2.2.2”项下方法操作,制得丹参阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 分别精密移取供试品溶液、对照品溶液和阴性样品溶液各10 μ L注入液相色谱仪,进样分析,结果丹酚酸B峰保留时间为21.1 min,分离度为9.5,阴性样品在丹酚酸B峰位置处无干扰。

2.3.2 线性关系的考察 分别精密移取对照品母液(溶液浓度:1 007.6 mg/L),加甲醇稀释成10.076 mg/L、20.152 mg/L、40.304 mg/L、60.456 mg/L、80.608 mg/L、100.76 mg/L、151.140 mg/L浓度的溶液,精密移取10 μ L注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积对溶液浓度(mg/L)进行线性回归,得回归方程 $Y=12\ 390.60X+5\ 567.12$ ($r=0.999\ 9$, $n=7$)。结果表明:丹酚酸B在10.076~151.140 mg/L范围内,峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 精密移取丹酚酸B对照品溶液10 μ L,重复进样6次。结果丹酚酸B峰面积的相对标准差为0.8%($n=6$),表明进样精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批复方黄黛片(批号181201)的样品6份,按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,测定供试品中丹酚酸B的含量,计算样品中丹酚酸B的平均含量为2.436 3 mg/g,相对标准差为0.9%。实验表明:样品测定重现性良好。

2.3.5 溶液稳定性试验 取“2.3.4”项下供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,于0、2、4、8、12、16、24 h进样测定,结果丹酚酸B峰面积的相对标准差为0.5%。结果表明在24 h内供试品溶液稳定。

2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的供试品(批号181201,含量2.436 3 mg/g)6份,每份取0.25 g,精

密称定,置锥形瓶中,分别精密加入浓度为134.563 mg/L的丹酚酸B对照品溶液5 mL,按“2.2.2”项下方法制备溶液,依法测定,计算。加样回收率结果见表1。此方法丹酚酸B的平均回收率为95.62%,相对标准差为1.6%。

2.3.7 耐用性试验 分别采用Agilent Zorbax SB-Aq C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Waters Sunfire® C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)及phenomenex Luna C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)三种不同的色谱柱,并分别在岛津LC-20AT型液相色谱仪及Agilent 1260型液相色谱仪上测定,结果平均含量为2.363 mg/g,相对标准差为2.8%,岛津LC-20AT型液相色谱仪检测丹酚酸B峰的分离度为9.5,Agilent 1260型液相色谱仪检测丹酚酸B峰的分离度为13.1,耐用性试验结果良好。

2.4 样品含量测定 取复方黄黛片13批,按照“2.2.2”项下方法测定丹酚酸B的含量,结果见表2。

表2 样品中丹酚酸B含量测定结果

批号	平均含量/(mg/g)	平均含量/(毫克/片)
181201	2.440 8	0.610
181202	2.406 0	0.601
180903	2.394 4	0.599
180902	2.227 3	0.557
170202	2.005 8	0.501
180101	2.341 9	0.585
170201	1.903 2	0.476
180301	2.094 7	0.524
171101	2.137 4	0.534
170701	2.127 1	0.532
180401	2.245 7	0.561
180501	2.303 2	0.576
180901	2.247 5	0.562
平均含量	2.221 1	0.555

3 讨论

3.1 指标性成分的选择 复方黄黛片是黄世林教授依据传统中医中药理论,以驱邪复正为治疗原则,结合长期的临床实践研制的纯中药制剂。依据白血病的病因病机关键是邪毒内蕴、骨髓瘀滞,病

表1 丹酚酸B准确度试验结果

序号	取样量/g	含丹酚酸B量/mg	加入丹酚酸B量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均加样回收率/%	相对标准差/%
1	0.250 4	0.610 0	0.672 8	1.253 3	95.61	95.62	1.6
2	0.251 5	0.612 7	0.672 8	1.270 4	97.75		
3	0.250 1	0.609 3	0.672 8	1.260 4	96.77		
4	0.251 5	0.612 7	0.672 8	1.252 1	95.04		
5	0.250 9	0.611 3	0.672 8	1.250 3	94.99		
6	0.250 0	0.609 1	0.672 8	1.238 4	93.53		

变实质为邪实而致本虚的认识,提出“祛邪复正”的主要治疗原则,以解毒清热、益气活血为治法组方。方中主要成分为雄黄、青黛、太子参及丹参,丹参在处方中作为佐使药,其水溶性成分在活血生血及肿瘤抑制方面有明确的作用,且水溶性成分中丹酚酸B明显高于其他成分^[11-12],本研究选择丹酚酸B作为指标控制成分。

3.2 检测波长的选择 对丹酚酸B对照品溶液于200~400 nm进行扫描,其最大吸收波长为286 nm,与文献[11]报道的286 nm一致,参考中国药典2015年版一部丹参含量测定条件,选择检测波长为286 nm。

3.3 流动相的选择 试验分别采用乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)、乙腈-0.1%甲酸溶液(22:78)作为流动相^[12-15]进行比较研究。结果采用乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)为流动相,丹酚酸B峰形较好,保留时间为21.1 min, $N=12\ 085$,分离度为9.5。

3.4 提取溶剂与提取时间的选择 本试验分别对甲酸-水(1:99)溶液、甲酸-甲醇-水(1:80:19)溶液和甲酸-甲醇(1:99)溶液等溶剂^[13-16]进行了考察,结果在甲酸-甲醇-水(1:80:19)溶液中溶解效果好,供试品溶液稳定,故选择甲酸-甲醇-水(1:80:19)溶液作为提取溶剂。并对超声时间进行比较考察,结果样品超声处理20 min提取效率最高,因此供试品提取方法采用超声处理20 min。

4 结论

本研究首次建立了中药复方黄黛片中丹酚酸B含量测定的高效液相色谱法(HPLC)方法,该方法前处理简单,稳定准确,重现性好。所建立的定量测定方法与现有质量标准配合(丹参原儿茶醛定性鉴别),可以大幅度提升产品的质量控制水平,也为其质量标准的提高提供参考依据。

参考文献

- [1] WANG L, ZHOU GB, LIU P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(12): 4826-4831.
- [2] 向阳, 陈楠楠, 孙淑君, 等. 黄世林教授研制复方黄黛片治疗白血病经验[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(9): 1141-1143.
- [3] 赵衍东, 马邦云, 王梦亚, 等. 复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞白血病 Meta 分析[J]. 中医学报, 2019, 34(9): 2001-2006, 2034.
- [4] 方永光, 成玉斌, 陈楠楠, 等. 祛邪复正法治疗复发急性早幼粒细胞白血病临床研究[J]. 中国中医急症, 2010, 19(10): 1686-1687.
- [5] 董菊, 张晨妍, 许婧娴, 等. 复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞白血病的疗效与安全性的系统评价[J]. 东南大学学报(医学版), 2018, 37(6): 993-997.
- [6] 秦学玲, 张赟华, 任李玥, 等. 74批丹参片中指标成分丹酚酸B的含量比较研究[J]. 云南中医中药杂志, 2019, 40(1): 69-71.
- [7] 许永, 赵成. 不同提取方法对丹参中丹酚酸B含量测定的影响[J]. 安徽医药, 2009, 13(10): 1193-1194.
- [8] 毛鹏. HPLC法测定止血祛瘀明目片中丹酚酸B含量[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(7): 42-44.
- [9] 卢运超. HPLC法测定调脂降压丸中丹酚酸B的含量[J]. 光明中医, 2018, 33(4): 488-489.
- [10] 李兵, 刘丽, 周大铮, 等. 丹参鲜药材中丹酚酸B含量测定[J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1296-1299.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76-77.
- [12] 陈群力, 周淑琴, 须冰, 等. 高效液相色谱法同时测定大黄灵脾颗粒中丹酚酸B和淫羊藿苷的含量[J]. 安徽医药, 2016, 20(1): 46-49.
- [13] 黎春彤, 何世荣, 刘饭阳, 等. 高效液相色谱法测定肾复康胶囊中丹酚酸B的含量[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(5): 617-619.
- [14] 鹿泽启. 高效液相色谱法测定丹参提取物中丹酚酸B的含量[J]. 广东化工, 2017, 44(14): 243-244.
- [15] 刘震凌, 王佳楠. 精制冠心病胶囊中丹酚酸B的含量测定[J]. 中国实用医药, 2017, 12(5): 188-189.
- [16] 陈英红, 周婷婷, 王颖. 反相高效液相色谱法测定妇炎舒胶囊中丹酚酸B的含量[J]. 中国医药导报, 2016, 13(6): 150-152.

(收稿日期: 2020-04-17, 修回日期: 2020-05-18)

◇ 编读往来 ◇

《安徽医药》杂志有关文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位具体使用参照1991年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于1条时,应采用负数幂的形式表示,如 ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng/kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。