

# HPLC法同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 的含量

官玲花\*(厦门大学附属第一医院,福建 厦门 361003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)32-3056-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.32.26

**摘要** 目的:建立同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Ultimate™ XB-C<sub>18</sub> 柱,流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 270 nm,进样量为 10 μl,柱温为 30 ℃。结果:二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub> 检测质量浓度分别在 0.053 2~5.32、0.051 2~5.12、0.050 8~5.08、0.053 7~5.37 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系(相关系数分别为 0.999 5、0.999 9、0.999 6、0.999 7);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均≤1.42%;平均加样回收率分别为 97.93%、99.66%、99.02%、99.92%,RSD 分别为 0.72%、0.38%、0.54%、0.22%(n=6)。结论:该方法快速、准确、重复性好,可同时定量仙灵骨葆胶囊中 4 种丹参脂溶性成分。

**关键词** 仙灵骨葆胶囊;二氢丹参酮 I;隐丹参酮;丹参酮 I;丹参酮 II<sub>A</sub>;高效液相色谱法;含量测定

## Simultaneous Content Determination of Dihydro-tanshinone I, Cryptotanshinone, Tanshinone I and Tanshinone II<sub>A</sub> in Xianling Gubao Capsules by HPLC

GUAN Ling-hua(The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Fujian Xiamen 361003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of dihydro-tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II<sub>A</sub> in Xianling gubao capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Ultimate™ XB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 270 nm, and sample size was 10 μl. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of dihydro-tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II<sub>A</sub> were 0.053 2-5.32 μg/ml ( $r=0.999\ 5$ ), 0.051 2-5.12 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ), 0.050 8-5.08 μg/ml ( $r=0.999\ 6$ ), 0.053 7-5.37 μg/ml ( $r=0.999\ 7$ ), respectively. The average recoveries of four active ingredients were 97.93% (RSD=0.72%,  $n=6$ ), 99.66% (RSD=0.38%,  $n=6$ ), 99.02% (RSD=0.54%,  $n=6$ ) and 99.92% (RSD=0.22%,  $n=6$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.42%. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate and repeatable, and can be used for quantitative determination of 4 liposoluble constituents in Xianling gubao capsules.

**KEY WORDS** Xianling gubao capsules; Dihydro-tanshinone I; Cryptotanshinone; Tanshinone I; Tanshinone II<sub>A</sub>; HPLC; Content determination

仙灵骨葆是贵州特色苗药,由淫羊藿、丹参、续断、补骨脂、地黄、知母等中药材精炼而成,具有滋补肝肾、活血通络、强身健骨之功效,用于治疗骨质疏松症、骨折、骨关节炎、骨无菌性坏死及更年期综合征等<sup>[1-2]</sup>。目前,国内对仙灵骨葆胶囊中总黄酮、淫羊藿苷、朝藿定、补骨脂素等的质量控制都已经开展了一系列的研究<sup>[3-7]</sup>,但对该药中丹参的有效成分的质量控制研究文献报道较少。为此,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法建立了同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 含量的方法。

### 1 材料

515 型 HPLC 系统(美国 Waters 公司);KH-300DB 型数控超声清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号:0766-200311、110852-200305、0867-200205、110766-200518);仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号:1208018、1208047、1209075);乙腈为色谱纯,甲酸为分析纯,水为自制超纯水。

### 2 方法与结果

\*主管药师,本科。研究方向:医院药学。E-mail:13950076650@126.com

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Ultimate™ XB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水,流动相 B 为乙腈,采用梯度洗脱(0~8 min 为 90% A, >8~15 min 为 90%→30% A, >15~25 min 为 30% A, >25~30 min 为 30%→10% A, >30~50 min 为 10% A, >50~60 min 为 10%→90% A);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:270 nm;进样量:10 μl。在该色谱条件下,4 种成分可达到基线分离,理论板数按丹参酮 II<sub>A</sub> 峰计不低于 6 000。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品适量,置于同一 50 ml 棕色具塞量瓶中,加乙腈定容,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,制成含二氢丹参酮 I 532 μg/ml、含隐丹参酮 512 μg/ml、含丹参酮 I 508 μg/ml 和含丹参酮 II<sub>A</sub> 537 μg/ml 的对照品溶液,于 4 ℃ 冰箱中贮藏,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 20 粒样品,混匀,研细,精密称取 0.5 g,置于 25 ml 棕色具塞量瓶中,加入乙腈适量溶解,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)处理 60 min,补足损失的乙腈,室温放置 20 min,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,于 16 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按样品处方制成缺丹参的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备成阴性对照溶液。

### 2.3 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图1。由图1可见,阴性对照色谱在对照品色谱相应位置处无吸收峰,表明在该试验条件下,制剂中其他成分对测定结果均无干扰,专属性较好。

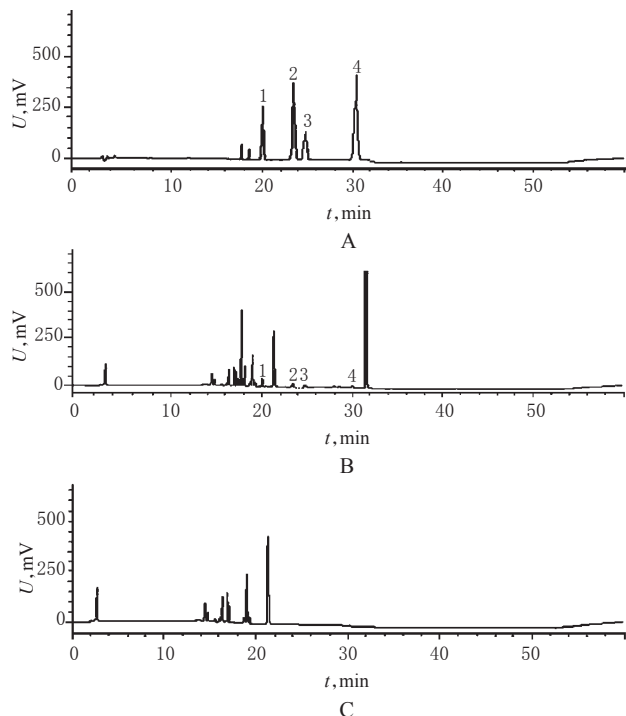


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.二氢丹参酮I;2.隐丹参酮;3.丹参酮I;4.丹参酮II<sub>A</sub>

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. dihydro-tanshinone I; 2. cryptotanshinone; 3. tanshinone I; 4. tanshinone II<sub>A</sub>

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下对照品溶液10、20、100、200、300 μl,置于100 ml量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,得系列浓度溶液,分别吸取10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以峰面积(y)对各成分检测质量浓度(x, μg/ml)进行线性回归,其线性范围和回归方程见表1。

表1 4种成分线性范围和回归方程

Tab 1 Results of linear range and regression equation of 4 components

| 成分                 | 线性范围, μg/ml  | 回归方程                | r       |
|--------------------|--------------|---------------------|---------|
| 二氢丹参酮I             | 0.053 2~5.32 | $y=69.456x+0.620 7$ | 0.999 5 |
| 隐丹参酮               | 0.051 2~5.12 | $y=56.968x+4.257 5$ | 0.999 9 |
| 丹参酮I               | 0.050 8~5.08 | $y=38.489x+4.231 9$ | 0.999 6 |
| 丹参酮II <sub>A</sub> | 0.053 7~5.37 | $y=74.494x+0.538 8$ | 0.999 7 |

### 2.5 精密度试验

分别吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定5次。结果,二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>的RSD分别为0.44%、0.19%、0.41%和0.23%,表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下同一供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定5次,每次间隔2 h。结果,二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>的RSD分别为0.66%、0.46%、0.46%和0.41%,表明供试品溶液在10 h内稳定。

### 2.7 重复性试验

取样品(批号:1208018)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,重复操作5份,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>的RSD分别为1.42%、1.03%、1.27%、0.91%,表明本方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的仙灵骨葆胶囊内容物各6份(每份为25 g),分别精密加入一定量的二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I、丹参酮II<sub>A</sub>对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

| 成分     | 所含量, mg            | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |       |       |      |
|--------|--------------------|---------|---------|----------|------------|--------|-------|-------|------|
| 二氢丹参酮I | 0.321              | 0.235   | 0.548   | 98.56    | 97.93      | 0.72   |       |       |      |
|        | 0.332              | 0.235   | 0.555   | 97.88    |            |        |       |       |      |
|        | 0.315              | 0.235   | 0.544   | 98.91    |            |        |       |       |      |
|        | 0.322              | 0.235   | 0.543   | 97.49    |            |        |       |       |      |
|        | 0.317              | 0.235   | 0.534   | 96.74    |            |        |       |       |      |
| 隐丹参酮   | 0.334              | 0.235   | 0.558   | 98.07    | 99.66      | 0.38   |       |       |      |
|        | 0.314              | 0.313   | 0.621   | 99.04    |            |        |       |       |      |
|        | 0.287              | 0.313   | 0.601   | 100.20   |            |        |       |       |      |
|        | 0.298              | 0.313   | 0.606   | 99.34    |            |        |       |       |      |
|        | 0.283              | 0.313   | 0.592   | 99.33    |            |        |       |       |      |
| 丹参酮I   | 0.301              | 0.313   | 0.612   | 99.67    | 99.02      | 0.54   |       |       |      |
|        | 0.291              | 0.313   | 0.603   | 99.83    |            |        |       |       |      |
|        | 0.843              | 0.824   | 1.646   | 98.74    |            |        |       |       |      |
|        | 0.854              | 0.824   | 1.651   | 98.39    |            |        |       |       |      |
|        | 0.846              | 0.824   | 1.665   | 99.70    |            |        |       |       |      |
|        | 0.837              | 0.824   | 1.658   | 99.82    |            |        |       |       |      |
|        | 0.852              | 0.824   | 1.666   | 99.40    |            |        |       |       |      |
|        | 0.833              | 0.824   | 1.636   | 98.73    |            |        |       |       |      |
|        | 丹参酮II <sub>A</sub> | 1.417   | 1.187   | 2.597    |            |        | 99.73 | 99.92 | 0.22 |
|        |                    | 1.428   | 1.187   | 2.609    |            |        | 99.77 |       |      |
| 1.410  |                    | 1.187   | 2.605   | 100.30   |            |        |       |       |      |
| 1.453  |                    | 1.187   | 2.645   | 100.20   |            |        |       |       |      |
| 1.424  |                    | 1.187   | 2.605   | 99.77    |            |        |       |       |      |
| 1.467  | 1.187              | 2.641   | 99.89   |          |            |        |       |       |      |

### 2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=5)

Tab 3 Results of content determination of samples(mg/g, n=5)

| 样品批号    | 二氢丹参酮I | 隐丹参酮  | 丹参酮I  | 丹参酮II <sub>A</sub> |
|---------|--------|-------|-------|--------------------|
| 1208018 | 0.014  | 0.015 | 0.040 | 0.062              |
| 1208047 | 0.010  | 0.008 | 0.029 | 0.058              |
| 1209075 | 0.008  | 0.010 | 0.028 | 0.047              |

## 3 讨论

### 3.1 提取方法的选择

丹参酮类物质在乙腈中具有较大的溶解度,本试验采用乙腈为提取溶剂,并对浸渍法、热回流法、超声提取法进行了

# 法莫替丁注射液中主成分含量和有关物质测定方法改进

苏彦斌<sup>1\*</sup>, 张凤荣<sup>2</sup>, 苏彦文<sup>1</sup>(1.吉林化工学院, 吉林 吉林 132022; 2.吉林省食品药品检验所, 长春 130033)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)32-3058-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.32.27

**摘要** 目的:建立测定法莫替丁注射液中主成分含量和有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Wasters C<sub>18</sub> 柱,流动相为醋酸盐缓冲液-乙腈(93:7, V/V),流速为 1.1 ml/min,检测波长为 267 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μl。结果:法莫替丁检测质量浓度在 0.02~0.20 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均 $\leq 0.54\%$ ;平均加样回收率为 99.92%, RSD=1.16%( $n=9$ );法莫替丁的最低检测限为 0.5 ng,定量限为 2 ng,主成分法莫替丁与杂质分离度良好。结论:该方法专属性强、准确度高、重复性好,可作为法莫替丁注射液的质量控制方法。

**关键词** 法莫替丁;注射液;有关物质;含量测定;高效液相色谱法

## Improvement of the Method for Content Determination of Main Component and Related Substances in Famotidine Injection

SU Yan-bin<sup>1</sup>, ZHANG Feng-rong<sup>2</sup>, SU Yan-wen<sup>1</sup>(1.Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin Jilin 132022, China; 2.Jilin Institute for Food & Drug Control, Changchun 130033, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of main components and related substances in Famotidine injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Wasters C<sub>18</sub> column with mobile phases consisted of acetate buffer-acetonitrile (93:7, V/V) at the flow rate of 1.1 ml/min. The detection wavelength was set at 267 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear range of famotidine were 0.02-0.20 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ) with an average recovery of 99.92% (RSD=1.16%,  $n=9$ ). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 0.54%. The lowest limit of detection was 0.5 ng, and the limit of quantity was 2 ng. The main component famotidine and impurity substances were well separated. CONCLUSIONS: The method is specific, accurate and reproducible for quality control for Famotidine injection.

**KEY WORDS** Famotidine; Injection; Related substances; Content determination; HPLC

比较。结果显示,以乙腈超声提取 60 min 效果较好,具有提取完全、效率高、能耗低等特点。

### 3.2 流动相的选择

在参考相关文献<sup>[9]</sup>的基础上,分别采用乙腈-水、甲醇-水、甲醇-乙腈-水等不同流动相系统,结果发现乙腈-水流动相系统可较好满足试验需求,故加入 0.1% 的甲酸以改善峰形及分离度。

### 3.3 波长的选择

经二极管阵列检测器分析,二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 与丹参酮 II<sub>A</sub> 分别在 242、245、268、270 nm 波长处有吸收峰。因在 270 nm 波长处,4 种成分紫外吸收均良好,有利于含量测定,故选择 270 nm 为检测波长。

本研究采用 HPLC 法建立了同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 与丹参酮 II<sub>A</sub> 4 种丹参脂溶性成分含量的方法。通过方法学考察,表明本方法快速、准确、重复性好,可用于仙灵骨葆胶囊中丹参的质量控制;同时,本方法对含有丹参相关制剂的含量测定也具有一定的参考价值。

### 参考文献

\* 教授,博士。研究方向:药物活性物质靶向定位及药物质量控制。电话:0432-63083063。E-mail:syb1962@tom.com

- [1] 李国樟,曹庸,卜晓英.丹参活性成分的药效药理作用[J]. 农技服务,2010,27(7):889.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:70.
- [3] 靳风云,梁光义,张智,等.仙灵骨葆胶囊质量标准的研究[J].中国药学杂志,2002,37(5):372.
- [4] 刘永刚,赵保胜,王秀丽,等.HPLC法测定仙灵骨葆分散片中淫羊藿苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):6.
- [5] 王玉萍,郭宝林.仙灵骨葆胶囊中总黄酮及淫羊藿苷的含量测定[J].中草药,2000,31(10):741.
- [6] 李晓龙,梁光义,曹佩雪,等.HPLC同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(5):891.
- [7] 李振国,李忠保,王海波.HPLC法测定仙灵骨葆颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J].中医研究,2009,22(1):25.
- [8] 吴燕红,黄鸣清,李卓明,等.HPLC测定冠心七味片中丹参酮 II<sub>A</sub>、丹参酮 I、隐丹参酮和对甲氧基桂皮酸乙酯的含量[J].中成药,2006,28(4):492.

(收稿日期:2013-02-03 修回日期:2013-06-14)