HPLC 同时测定丹酚酸 B 和阿魏酸的含量

李献玉(解放军第 371 中心医院，河南 新乡 453000)

摘要：目的 建立 HPLC 同时测定丹酚酸 B 和阿魏酸的方法。**方法** 色谱柱 ODS-C_{18}(4.6 mm×250 mm，5 μm)柱，流动相：甲醇-乙腈-甲酸-水，检测波长为 286 nm，流速 0.8 mL·min^{-1}。**结果** 丹酚酸 B 浓度在 5.40~43.25 μg·mL^{-1}，阿魏酸浓度在 3.37~27.00 μg·mL^{-1} 内线性关系良好。丹酚酸 B 和阿魏酸的线性方程分别为：Y=0.971 1X–2.215 4，r=0.999 8，Y=0.415 9X–0.450 7，r=0.999 9；平均回收率分别为 98.4%，98.7%；RSD 分别为 3.39%，1.49%。**结论** 本法在检测丹酚酸 B 和阿魏酸时有较好的专属性，灵敏度高，重复性好，且样品处理简单、容易操作，可以作为丹参和当归复方制剂的质量检测方法。

关键词： 高效液相色谱法；丹酚酸 B；阿魏酸

中图分类号： R917.101　　**文献标志码：** B　　**文章编号：** 1007-7693(2011)13-1355-03

丹酚酸 B 和阿魏酸分别为丹参和当归的主要活性成分。丹酚酸 B 含酚环较多，分子量大，极性小，不易分离检测。检测方法以药典规定为依据，在两种或两种以上成分同时检测时多采用梯度洗脱方式[1-5]。梯度洗脱条件有多变，不易控制，且易出现基线不稳的缺点。本试验制定了丹参和当归复方制剂中有效成分丹酚酸 B 和阿魏酸的同时检测方法。采用 HPLC 等压洗脱方式，同时测定复方制剂中丹酚酸 B 和阿魏酸。方法灵敏度及重复性都较好，且操作简单，方便可行。

1 仪器和材料

LC-10A 型高效液相色谱色谱仪(日本岛津)；丹酚酸 B(中国生物制品研究所，批号：111562-200403，纯度：99.9%)；阿魏酸对照品(中国生物制品研究所，批号：110773-200611，纯度：99.9%)；色谱级甲醇、乙腈(天津基准化学试剂有限公司)。供试品丹参(山东)和当归(陇西)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：ODS-C_{18}柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相：甲醇-乙腈-冰醋酸-水(15∶15∶5∶65)，柱温：25 ℃，流速 0.8 mL·min^{-1}，检测波长：286 nm，进样量：20 μL。

2.2 波长的选择

丹酚酸 B 的最大吸收波长在 286 nm，阿魏酸的最大吸收波长在 324 nm，分别比较了 286 nm，

作者简介： 李献玉，女，硕士，主管药师　Tel: 13643908723　E-mail: lixy214@sina.com

324 nm 条件下丹酚酸 B 和阿魏酸的吸收变化，最终确定同时检测波长为 286 nm。

2.3　对照品溶液的制备

精密称取丹酚酸 B 对照品 1.73 mg 于 10 mL 棕色量瓶中，加入 75%的甲醇溶解定容，得丹酚酸 B 的对照品溶液。精密称取阿魏酸对照品 2.70 mg 于 50 mL 棕色量瓶中，加 75%甲醇溶解并稀释至刻度，即得阿魏酸对照品溶液。精密量取各对照品溶液 5 mL，混合制成混合对照品溶液。

2.4　供试品溶液的制备

称取丹参和当归各 20 g，加入 280 mL 水浸泡 1 h，煎煮 1~2 h，过滤，得滤液 176 mL。滤液 0.45 μm 过滤备用即得。

2.5　标准曲线的制备

精密量取混合对照品溶液 2 mL，分别加入 2，4 mL 75%甲醇中得到 2 倍、3 倍稀释液，再分别精密量取 2 倍、3 倍稀释液 2 mL 进行梯度稀释，得到 4，8，16 及 6，12 倍稀释液。分别精密量取 2，3，4，6，8，12，16 倍稀释液 20 μL 进高效液相色谱分析，记录峰面积，以浓度对峰面积作曲线。结果表明阿魏酸浓度在 3.37~27.00 $\mu g\cdot mL^{-1}$，丹酚酸浓度在 5.40~43.25 $\mu g\cdot mL^{-1}$ 内呈线性关系。丹酚酸 B 和阿魏酸的线性方程分别为 Y=0.971 1X–2.215 4，r=0.999 8；Y=0.415 9X–0.450 7，r=0.999 9。

2.6　检测限考察

精密量取稀释 16 倍的混合对照品溶液 10 μL 进样分析，阿魏酸的检测限为 1.7 $\mu g\cdot mL^{-1}$，丹酚酸 B 的检测限为 2.7 $\mu g\cdot mL^{-1}$。

2.7　仪器精密度试验

取同一混合对照品溶液(8 倍稀释)连续进样 6 次，每次 20 μL，测定峰面积，RSD 值分别为 1.52%，2.48%，表明仪器精密度良好。

2.8　专属性试验

取 0.45 μm 滤膜滤过的供试品溶液 2 mL 用纯净水作梯度稀释：4，8，16，32，64，128，256 倍，分别精密量取 20 μL 进样分析，结果见图 1。阿魏酸的出峰时间为 5.8 min，分离度>1.0，理论板数>3 000，丹酚酸 B 的出峰时间为 9.1 min，分离度>1.5，理论板数>3 000。说明方法专属性良好。

2.9　稳定性考察

将供试品溶液 0.45 μm 滤膜过滤后，分别避光和不避光室温放置 72 h 后测定色谱图的变化情况，结果表明：供试品溶液在未避光情况下室温放置 72 h 后，丹酚酸 B 降解约 4.5%，阿魏酸降解为 25.2%；两者避光保存含量基本保持不变。结果表明光照对丹酚酸 B 的影响较小，对阿魏酸的影响较大。

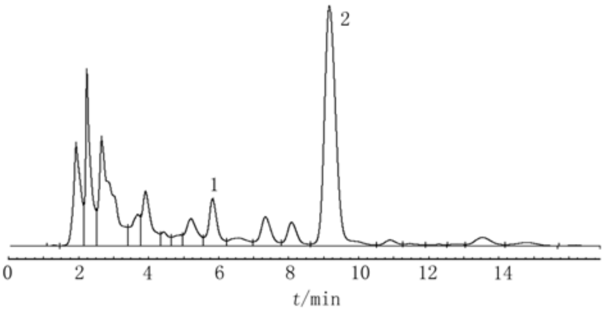

图 1　丹参和当归煎煮液样品色谱图

1–阿魏酸；2–丹酚酸 B

Fig 1　HPLC chromatogram of *Salvia miltiorrhiza* and *Angelica sinensis* decoction liquid

1–ferulic acid; 2–salvianolic acid B

2.10　加样回收率测定

精密吸取稀释 16 倍供试品溶液 5 mL 共 6 份，分别加入混合对照品 1 mL 混合均匀后进样分析，测定阿魏酸含量，结果见表 1。精密吸取稀释 64 倍供试品溶液 5 mL 6 份，分别加入混合对照品 2 mL，混合均匀后进样分析，测定丹酚酸 B 的含量，结果见表 2。

表 1　阿魏酸的加样回收率

Tab 1　Result of recovery test of ferulic acid

样品含量/μg	加入量/μg	测出量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
36.72	27.00	63.97	100.4	98.7	1.49
36.72	27.00	61.62	96.7		
36.72	27.00	62.00	97.3		
36.72	27.00	62.70	98.4		
36.72	27.00	63.53	99.7		
36.72	27.00	63.40	99.5		

表 2　丹酚酸 B 的回收率

Tab 2　Result of recovery test of salvianolic acid B

样品含量/μg	加入量/μg	测出量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
165.18	173.00	313.83	92.8	98.4	3.39
165.18	173.00	327.02	96.7		
165.18	173.00	336.83	99.6		
165.18	173.00	344.94	102.0		
165.18	173.00	332.43	98.3		
165.18	173.00	341.90	101.1		

http://www.chinjmap.com

3 讨论

3.1 流动相的选择

丹酚酸 B 是水溶性成分，其极性小分子大，苯环较多，其分离较困难。本试验分析了酸浓度、乙腈比例及正丁醇的应用对丹酚酸 B 分析分离效果的影响并进行了比较研究。结果表明，丹酚酸 B 的出峰时间直接影响到其响应值的大小，时间越晚峰值越小。控制在 12 min 内出峰效果比较好。在甲醇和乙腈浓度一定的情况下，甲酸的比例增高，阿魏酸和丹酚酸 B 出峰时间都相应提前，且丹酚酸 B 的峰宽随甲酸比例的增加而变小，峰形变好。正丁醇能够使丹酚酸 B 的出峰时间提前，但易出现杂峰，影响结果的分析。

3.2 样品的处理

阿魏酸对光照比较敏感，在处理样品时，应注意避光；丹酚酸受热易分解，所以在提取过程中应采取措施或降低温度，或缩短时间，提取前充分浸泡。在实验过程中发现丹酚酸 B 对照品也不稳定，易分解。最好低温避光放置。丹酚酸 B 的提取与药材中质量有密切关系，所以控制药材的质量是控制优质制剂的关键。

本方法在检测阿魏酸和丹酚酸 B 时有较好的专属性，灵敏度高、重现性好，且样品处理简单、容易操作，可以作为丹参和当归复方制剂的质量检测方法。

参考文献

[1] 肖凤霞，王凤云，符惠燕. 高效液相色谱法测定益心片中阿魏酸和丹酚酸 B 的含量[J]. 广州中医药大学学报，2005，22(4)：304-306.

[2] 饶毅，魏惠珍，崔金国，等. HPLC 同时测定心可舒制剂中葛根素和丹酚酸 B 的含量[J]. 药物分析杂志，2007，27(9)：1431-1433.

[3] 何洋，王冬梅，董振敏，等. HPLC 法同时测定丹灯通脑胶囊中野黄芩苷和丹酚酸 B 的含量[J]. 沈阳药科大学学报，2007，24(8)：491-494.

[4] 陈斌，余岳林，张少敏，等. 用 HPLC 法测定止痛化癥胶囊中丹参素、原儿茶醛、阿魏酸和丹酚酸 B 的含量[J]. 药学服务与研究，2007，7(1)：71-73.

[5] 胡东梅，李杨，赵庆春. HPLC 测定赤参丹中丹酚酸 B 含量[J]. 中国现代应用药学，2009，26(7)：588-590.

收稿日期：2010-09-10

http://www.chinjmap.com