

· 化学与分析 ·

离子色谱法同时测定丹参注射剂中6种无机阴离子

张元^{1,2}, 李伟青¹, 周伟娥¹, 任志芹¹, 冯雪松², 周昱², 张峰^{1*}

(1. 中国检验检疫科学研究院 食品安全研究所, 北京 100176;

2. 中国医科大学 药学院, 沈阳 110013)

[摘要] **目的:**建立了能够同时测定丹参注射剂中6种无机阴离子(氟离子、甲酸根、氯离子、亚硝酸根、溴离子和硝酸根)含量的离子色谱方法。**方法:**采用IC-2100离子色谱, IonPac AS11-HC阴离子色谱柱(4 mm × 250 mm), KOH梯度淋洗, 电导检测器检测6种无机阴离子含量。**结果:**6种无机阴离子基本达到基线分离, 线性关系良好, 相关系数分别在0.999 5~0.999 9, 平均回收率分别在90.1%~106.5%。**结论:**所建立的方法快速、准确、简便、实用, 可用于丹参注射剂中6种无机阴离子的含量测定和质量控制。

[关键词] 离子色谱; 丹参注射剂; 无机阴离子; 超声波提取法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0024-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170024

Simultaneous Determination of 6 Inorganic Anions in Danshen Injection by Ion Chromatography

ZHANG Yuan^{1,2}, LI Wei-qing¹, ZHOU Wei-e¹, REN Zhi-qin¹, FENG Xue-song², ZHOU Yu², ZHANG Feng^{1*}

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110013, China)

[Abstract] **Objective:** An ion chromatography method for simultaneous determination of six inorganic anions (fluoride, formic, chloride, nitrite, bromide and nitrate) in Danshen injection was established. **Method:** Six inorganic anions were determined by anion exchange column Ion Pac AS11-HC (4 mm × 250 mm), eluted by gradient hydroxide potassium. **Result:** Good resolution can be achieved among the above mentioned six inorganic anions. Their linear correlations over the investigated concentration were in the range of 0.999 5-0.999 9, while the average recoveries ranged from 90.1% to 106.5%, respectively. **Conclusion:** The ion chromatography method is fast, accurate, simple, reliable and applicable for the determination and quality control of inorganic anions in Danshen injection.

[Key words] ion chromatography; Danshen injection; inorganic anion; ultrasonic extraction

通常情况下, 中药注射剂除含有发挥主要疗效的活性成分外, 还含有 K⁺, Na⁺, F⁻, Cl⁻ 等无机阴阳离子, 这些离子含量与人的健康和药物的疗效均有密切的关系^[1-2]。氟、氯、磷是人体必不可少的元素, 对人体的骨骼、牙齿和机体酸碱平衡起着重要作用, 但含量过高会导致氟化物中毒、骨骼硬化等副

作用^[3-5], 综上所述, 建立中药注射剂中无机阴离子的含量测定方法, 不仅有助于进一步阐明不同中药注射剂的物质基础组成, 更能够为其安全性、有效性和质量可控性研究提供物质保障。

传统无机阴离子的测定主要采用化学滴定法, 但该方法灵敏度较低, 1次只能测定1种离子, 且操作

[收稿日期] 20150324(023)

[基金项目] 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ14000806); 国家质检总局科技计划专项(20141k084); 质检公益性行业科研专项(201410088-02); 辽宁省科学技术厅自然科学基金项目(201202252)

[第一作者] 张元, 在读硕士, 从事分析化学及药物分析研究, Tel:13840149878, E-mail:13840149878@163.com

[通讯作者] *张峰, 博士, 研究员, 从事分析化学研究, Tel:13651290763, E-mail:fengzhang@126.com

误差较大。离子色谱法 (ion chromatography, IC) 作为 20 世纪 70 年代发展起来的一种新型液相色谱分析技术,因其操作简便,灵敏快速,具有较高的精密度和较强的抗干扰能力,保证了分析结果的准确可靠,同时该方法所使用的淋洗液中较少使用有机试剂,也更为环保。近年来该方法被广泛应用于药物及合成中间体的分析等方面^[6-10],但截至目前,国内外采用离子色谱法同时测定中药注射剂中多种阴离子的报道仍然较少,采用该仪器测定无机阴离子的研究多为提取后过膜,即上机检测,对样品净化考察较少,而对于部分样品,如不进行净化,杂质对色谱柱的影响很大,同时影响测定结果。鉴于此,本研究建立了离子色谱法同时测定丹参注射剂中 6 种阴离子含量的方法,可有效地控制中药注射剂的质量。

1 材料

ICS-2100 型离子色谱仪 (包括 Chromeleon 色谱工作站,AS40 型自动进样器,ASRS 300 型 4 mm 抑制器,电导检测器,美国戴安公司),AB204-S 型电子天平和 MS205DU 型 1/10 万天平 (德国梅特勒公司),KQ5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水处理系统 (美国 Millipore 公司)。

丹参注射剂 (购于健客大药房),Waters Sep-pak C₁₈ 固相萃取柱 (6 mL/500 mg),Waters Oasis HLB 固相萃取柱 (3 mL/60 mg); 氟离子、甲酸根、氯离子、亚硝酸根、溴离子和硝酸根,质量浓度均为 1 000 mg·L⁻¹,购于中国计量科学研究院。水为去离子水 (电阻率 18.2 MΩ·cm),津腾尼龙 66 滤膜 (0.22 μm)。

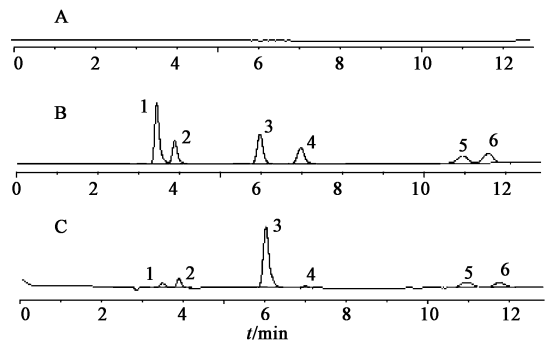
2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液 精密量取氟离子、甲酸根、氯离子、亚硝酸根、溴离子和硝酸根的对照品适量,去离子水稀释制成 100 mg·L⁻¹ 的对照品储备液。取各对照品储备液 200 μL,配制成含氟离子、甲酸根、氯离子、亚硝酸根、溴离子和硝酸根 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg·L⁻¹ 的系列混合溶液,临用前配置。

2.2 供试品溶液 取本品约 0.01 g,精密称定 (精确至 0.000 1 g),置 20 mL 储液瓶中,加入去离子水 15 mL,超声提取 20 min,摇匀,定容至 20 mL,用 C₁₈ 固相萃取柱滤过,过微孔滤膜 (0.22 μm),取滤液,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件 Ion Pac AS11-HC 阴离子交换柱 (4 mm × 250 mm), Ion Pac AG11-HC 保护柱 (4 mm × 50 mm),柱温 30 ℃,以氢氧化钾溶液梯度

洗脱 (0 ~ 13 min, 12 ~ 20 mmol·L⁻¹),洗脱时间 13 min,自循环抑制模式,抑制电流 75 mA,进样量 25 μL,混合对照品和样品色谱见图 1。



A. 空白溶剂; B. 常见阴离子混合对照溶液; C. 样品溶液; 1. 氟离子; 2. 甲酸根; 3. 氯离子; 4. 亚硝酸根; 5. 溴离子; 6. 硝酸根

图 1 丹参注射剂离子色谱

Fig. 1 Ion chromatograms of Danshen Injection samples

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 将 2.1 项下系列对照品溶液按上述色谱条件进样测定,以质量浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,结果显示各成分线性关系良好,回归方程和相关系数见表 1。

表 1 6 种阴离子回归方程

Table 1 Linearity range of six inorganic anion

成分	回归方程	r
氟离子	$Y = 0.4667X + 0.0017$	0.9995
甲酸根	$Y = 0.2163X - 0.0051$	0.9998
氯离子	$Y = 0.2814X + 0.0154$	0.9996
亚硝酸根	$Y = 0.1861X + 0.0572$	0.9997
溴离子	$Y = 0.1115X - 0.0007$	0.9999
硝酸根	$Y = 0.1498X + 0.0006$	0.9997

注:线性范围均为 0.050 ~ 5.0 mg·L⁻¹。

2.4.2 检测限和定量限 将 2.1 项下的混合对照品溶液,按上述色谱条件分别注入离子色谱仪测定,结果检测限 (信噪比 3:1) 均为 0.005 mg·L⁻¹,定量限 (信噪比 10:1) 均为 0.015 mg·L⁻¹。

2.4.3 精密度 取 2.1 项下 0.05 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次。结果氟离子、甲酸根、氯离子、亚硝酸根、溴离子和硝酸根的峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.6%, 0.9%, 0.5%, 0.6%, 0.8%, 0.5%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性 取同一批样品 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,依上述色谱条件进样测定含量。结果样品中氟离子、甲酸根、氯离子、溴离子和硝酸根的峰面积 RSD 分别 1.0%, 1.1%, 1.6%, 1.5% 和

1.2%,表明方法重复性良好。

2.4.5 稳定性 取同一供试品溶液,在制备后0,2,4,6,8,10 h进样测定,结果氟离子、甲酸根、氯离子、溴离子和硝酸根离子峰面积RSD分别为2.9%,1.5%,0.3%,1.7%和1.7%。表明供试品溶液在10 h内各成分稳定性基本良好。

2.4.6 加标回收率 精密称取12份已知含量的丹参注射剂1.0 g(精确至0.000 1 g),6份加入相当于样品含量120%的阴离子对照溶液,另6份加入相当于样品含量80%的阴离子对照溶液,其中亚硝酸根加入量分别为0.02,0.04 mg,按制备2.2项下的方法制备样品溶液,测定结果见表2。6种无机阴离子平均回收率在90.1%~106.5%,表明该方法能满足测定需求,可行。

表2 丹参注射剂中6种阴离子加样回收率试验(n=2)

Table 2 Recovery test of Danshen injection(n=2)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回 收率/%	RSD /%
氟离子	0.133	0.106	0.217	90.6	3.2
		0.160	0.291	99.5	1.7
甲酸根	0.423	0.338	0.707	92.9	1.8
		0.508	0.930	99.9	0.9
氯离子	2.267	1.814	4.345	106.5	3.6
		2.720	4.877	97.8	1.1
亚硝酸根	-	0.020	0.019	95.0	1.7
		0.040	0.038	94.4	1.2
溴离子	0.910	0.728	1.512	92.3	2.4
		1.092	1.804	90.1	1.8
硝酸根	0.575	0.460	1.053	101.7	1.2
		0.690	1.202	95.0	0.7

2.5 含量测定 取样品6批,按2.2项下方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件进样测定,外标法计算,结果见表3。由结果可见,不同批次丹参注射剂中6种无机阴离子的含量在0.011%~0.229%。

3 讨论

本实验考察了相同流动相洗脱条件下,Ion Pac AS11-HC阴离子交换分析柱、Phenosphere SAX阴离子交换色谱柱和Inertsil AX阴离子交换色谱柱对提取液中无机阴离子的分离效果,结果显示,当流动相选用氢氧化钾时,Ion Pac AS11-HC柱效更高,6种无机阴离子分离度更高,均在1.5以上,而在此梯度洗脱条件下,Phenosphere SAX和Inertsil AX交换柱虽然对多数阴离子分离度>1.5,但对氟离子和甲酸

表3 丹参注射液样品中6个阴离子质量分数

Table 3 Determination results of samples					%
No.	氟离子	甲酸根	氯离子	溴离子	硝酸根
1	0.013	0.043	0.227	0.091	0.058
2	0.015	0.041	0.227	0.091	0.059
3	0.015	0.045	0.224	0.089	0.057
4	0.011	0.043	0.229	0.093	0.056
5	0.012	0.040	0.226	0.092	0.057
6	0.014	0.042	0.227	0.090	0.058

注:亚硝酸根均未检测到。

根离子的分离度分别为1.2和1.3,分离度有待提高,可见Ion Pac AS11-HC阴离子交换分析柱作为一种烷醇季铵功能基团的中高亲水性色谱柱,对阴离子分离能力良好,适于复杂基体中低浓度阴离子的分离。

目前离子色谱的流动相应较多的是Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲溶液和氢氧化钠或氢氧化钾溶液,因为这2种溶液均可通过抑制器的抑制反应生成低电导的化合物。而本实验发现,相比Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲溶液,氢氧化钾溶液对阴离子分离能力更强,更适合应用于复杂基质中多种阴离子的分离,以氟离子和甲酸根分离程度看,氢氧化钾溶液对氟离子和甲酸根离子分离度可达2.0,而Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲溶液对氟离子和甲酸根离子分离度仅在1.6左右,然而流动相中氢氧化钾浓度选择比较“挑剔”,如洗脱溶液浓度过高,亦会导致分离效果不好,而浓度过低,则会导致分析时间延长,本研究同时比较了等度洗脱和梯度洗脱对多种无机阴离子的分离效果,综合考虑分析时间和分离度,最终选定氢氧化钾溶液梯度洗脱(0~13 min,12~20 mmol·L⁻¹),在此洗脱条件下,6种阴离子分离度均>1.5,理论塔板数>3 000。

常见中成药的提取方法主要有直接浸泡法、煎煮法、渗漉法、回流提取法、超声法等,本实验对比了上述5种提取方法用于该药中无机阴离子提取的优劣,结果显示,要达到相同的提取效率,超声法所需提取时间最短,考虑超声提取可联合利用多种效应(如超声提空化效应、热效应、强化扩散等理化特性)对目标产物进行提取,提高了提取效率。提取率达99%时,煎煮法、渗漉法、回流提取法、超声法所需提取时间分别为30,30,30,15 min,直接浸泡法所需时间最长,有时需要过夜放置,不利于快速测定的要求。回流提取法和煎煮法虽然提取效率也较

高,但这两法均需加热操作,实验操作不规范可能存在安全隐患。而渗漉法对有机试剂的消耗量比较高,对环境不太友好。综合考虑,本实验采用超声波法提取注射用丹参制剂中无机阴离子,选定提取时间 20 min。

本研究所采用中药注射制剂含有酸类、糖类和酚类等多种物质,且样品本身即为棕黄色至棕褐色粉末,在测试浓度时有颜色干扰,容易污染色谱柱,前处理时需尽量去除以保护色谱柱。预实验结果表明,样品过 C₁₈ 萃取柱后颜色澄清,且回收率均 > 90%,而样品过 HLB 柱后,颜色改变不明显,且各离子回收率均在 60% 以下,考虑 HLB 柱对非极性色素等物质不吸附,无法去除该类杂质干扰,同时对极性物质吸附的同时,吸收了部分与极性物质结合的无机阴离子,降低了回收率,综上,C₁₈ 萃取柱比 HLB 萃取柱更适合样品前处理,可以有效降低基质干扰。

从样品的测定结果看,亚硝酸根离子含量最低,氯离子含量最高,测试结果丰富了该制剂中所含元素及其存在形态。此外,本次试验所建立的离子色谱方法简捷、可靠、实用,可为其他中药注射剂或其他品种中阴离子的测定提供有益的借鉴和参考。该样品中氯离子和溴离子含量明显比其他离子高,1.0 g 样品溶于 400 mL 生理水中氯离子和溴离子的浓度分别约为 5.67,2.28 mg·L⁻¹,考虑到溶解后药物直接进入人体,上述氯离子和溴离子浓度相当高,因此注射用药物中无机阴离子含量有必要引起医务工作者的重视,具体的含量标准有待进一步的研究。本实验建立了一种简便、可靠、快速的分析方法检测中药注射剂中的 6 种无机阴离子的含量,为其质量

控制奠定基础。

[参考文献]

- [1] 屈晶,周光明. 离子色谱法测定中草药成分的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(7):357-362.
- [2] 郭俊国,毕宏生. 离子色谱法测定栀子中 Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ 5 种阴离子的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(23):90-93.
- [3] 刘静,李静,聂黎行,等. 离子色谱法同时测定注射用丹参(冻干)中有机酸和无机阴离子[J]. 药物分析杂志,2012,32(10):1774-1777.
- [4] 魏娜,董阳婷,王娅,等. 慢性氟中毒对大鼠仔代神经系统发育的影响及维生素 E 的拮抗作用[J]. 中华地方病学杂志,2014,33(2):125-128.
- [5] Onoriobe U, Rozier R G, Cantrell J, et al. Effects of enamel fluorosis and dental caries on quality of life[J]. J Dent Res,2014,93(10):972-979.
- [6] 杨绍美,陆建平,曹家兴,等. 离子色谱同时测定中草药中磷硫含量[J]. 分析试验室,2011,30(7):119-122.
- [7] 刘颖,张克星,兰静,等. 离子色谱法测定甲磺酸伊马替尼中甲磺酸[J]. 现代药物与临床,2012,27(4):378-379.
- [8] 李红敏,赵爽,王静. 离子色谱法同时测定饮用水中 7 种无机阴离子[J]. 农产品加工,2015,10:21-24.
- [9] 吴燕,米亚娴. 离子色谱法及其在药物分析中的应用[J]. 天津药学,2011,23(4):50-53.
- [10] 杨树科. 七种阴离子的离子色谱法保留值建模研究及其在三种民族药阴离子测定中的应用[D]. 昆明:云南民族大学,2011.

[责任编辑 顾雪竹]