

HPLC 测定参芪生肌颗粒中隐丹参酮和丹参酮 II_A 的含量

俞永梅, 牟娜, 张平(上海市松江食品药品检验所, 上海 201600)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定参芪生肌颗粒中隐丹参酮和丹参酮 II_A 含量的方法。探讨参芪生肌颗粒的质量控制标准。方法 采用 HPLC 测定, C₁₈ 柱分离; 柱温: 35 ℃; 流动相: 甲醇-水(75:25); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 270 nm。结果 隐丹参酮和丹参酮 II_A 线性范围分别为 8.016~48.096 μg($r=0.999\ 9$)和 16.025 6~96.153 6 μg($r=0.999\ 9$)。平均回收率分别为 98.7%和 98.6%, RSD 分别为 0.9%和 1.5%($n=9$)。结论 此方法简便、快速准确、灵敏度高、重现性好。可以更有效地控制参芪生肌颗粒制剂的质量。

关键词: 隐丹参酮; 丹参酮 II_A; 高效液相色谱法; 参芪生肌颗粒; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)04-0425-04

Determination of Cryptotanshinone and Tanshinone II_A in Shenqi Shengji Granule by HPLC

YU Yongmei, MOU Na, ZHANG Ping(Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of cryptotanshinone and tanshinone II_A in Shenqi Shengji granule, and to discuss the quality control standard of Shenqi Shengji granule. **METHODS** The samples were separated and determined by HPLC method. The column of C₁₈ with temperature at 35 ℃ was used to separate the target components. The eluate composed of methyl alcohol-water (75:25), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 270 nm. **RESULTS** The good linear relationships were obtained in the following range, cryptotanshinone 8.016~48.096 μg($r=0.999\ 9$) and tanshinone II_A 16.025 6~96.153 6 μg($r=0.999\ 9$). The average recoveries were 98.7% and 98.6%, respectively, and RSDs were 0.9% and 1.5%($n=9$). **CONCLUSION** This method is simple, sensitive and reliable. The method provides a better way to control the quality of the Shenqi Shengji granule.

KEY WORDS: cryptotanshinone; tanshinone II_A; HPLC; Shenqi Shengji granule; content determination

参芪生肌颗粒为医院自制制剂,是由复旦大学附属华山医院委托上海上联药业有限公司生产的纯中药制剂,处方由丹参、党参、黄芪、红花、当归、熟地黄 6 味药材组成,具有活血化瘀、凉血、养血,提高机体创伤耐受力,促进神经生长,防治肌肉萎缩等功能,适用于手麻、肌肉萎缩等症^[1]。方中丹参为唇形科植物丹参的干燥根及根茎,为君药之一,其味苦、微寒,归心、肝经,可用于活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛等^[2]。现代研究表明,丹参中具有活性的脂溶性成分主要为二萜类化合物,其中隐丹参酮与丹参酮 II_A 是丹参主要的脂溶性的有效成分,均具抗肿瘤作用、天然抗氧化作用以及对心血管系统的保护作用^[3-4]。一般丹参或制剂的报道和中国药典主要用高效液相色谱法测定丹参酮 II_A 的含量作为质量控制的标准^[5-10],也有采用近红外光谱法进行

快速测定^[11]。而隐丹参酮抗菌活性强、含量高、毒性小,具有明显的药理活性与较高的临床应用价值^[12-13]。为保证医院制剂的作用,本实验研究参芪生肌颗粒中隐丹参酮与丹参酮 II_A 的含量测定方法。通过 HPLC 测定隐丹参酮与丹参酮 II_A 的含量。该方法操作简便、灵敏度高、分离度好,为参芪生肌颗粒质量标准的提高和修订提供依据。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(自动进样器,紫外检测器,四元泵)(美国 Agilent 公司); AG 135 天平(METTLER TOLEDO, 0.01 mg)。

1.2 试剂与试药

隐丹参酮对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 110852-200306, 含量: 100.0%); 丹参酮 II_A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 110766-

作者简介: 俞永梅,女,主管药师 Tel: 15821035118 E-mail: yuyongmei1366@sina.com

200619, 含量: 100.0%); 参芪生肌颗粒(复旦大学附属华山医院委托上海上联药业有限公司生产, 批号: 101123, 110113, 101102, 100920, 100822); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(75:25); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 270 nm; 柱温 35 °C。进样量: 10 μL, 用外标法按峰面积定量计算。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取隐丹参酮和丹参酮 II_A 对照品 25.05 mg 和 50.08 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。使用时精密吸取贮备液 2 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成分别含隐丹参酮 40.08 μg·mL⁻¹ 和丹参酮 II_A 80.128 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取 20 袋本品内容物(批号: 101123), 精密称定, 计算出每袋的平均重量为 20.059 6 g, 研细。精密称取 15.0 g, 置具塞三角瓶中, 精密加入 80% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流提取 40 min, 放冷, 称重, 补足减失的重量, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL 加于大孔吸附树脂柱上, 用 150 mL 80%乙醇洗脱, 蒸干, 用 80%乙醇定容至 5 mL 量瓶中, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。

2.4 阴性溶液的制备

按处方称取不含丹参的其他药味, 按制备工艺制成颗粒剂, 再按“2.3”项下方法制备制成阴性溶液, 即得。

2.5 空白干扰试验

按“2.1”项下的色谱条件, 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性溶液各 10 μL 进样测定, 结果阴性溶液在与供试品和隐丹参酮与丹参酮 II_A 对照品相同保留时间处, 无干扰峰出现, 故可以确定处方中其他药材成分对隐丹参酮与丹参酮 II_A 的含量测定不产生干扰, 色谱图见图 1。

2.6 线性关系试验

分别精密吸取浓度为 40.08, 80.128 μg·mL⁻¹ 的隐丹参酮与丹参酮 II_A 对照品混合溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL, 注入高效液相色谱仪进行测定。以

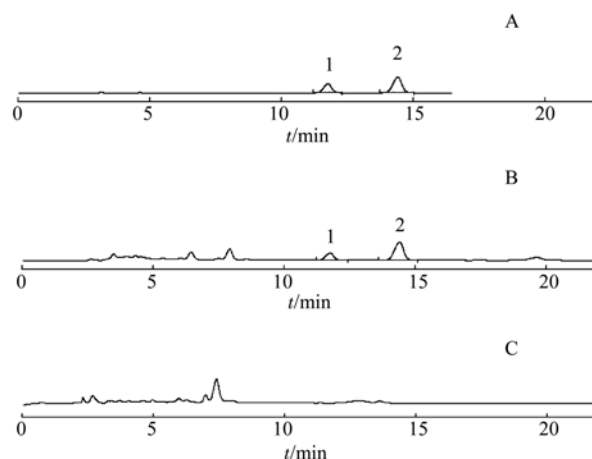


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性溶液; 1-隐丹参酮; 2-丹参酮 II_A

Fig 1 HPLC chromatograms

A-references; B-samples; C-negative sample; 1-cryptotanshinone; 2-tanshinone II_A

进样量(μg)对峰面积值计算回归方程、相关系数和线性范围, 回归方程分别为: 隐丹参酮, $Y=10.895X-0.1614$, $r=0.9999$, 线性范围为 8.016~48.096 μg; 丹参酮 II_A, $Y=10.378X-0.082$, $r=0.9999$, 线性范围为 16.025 6~96.153 6 μg。

2.7 仪器精密度试验

取对照品混合溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 记录各色谱图的峰面积。结果峰面积平均值($n=6$)为隐丹参酮 435.362 49(RSD 为 0.8%), 丹参酮 II_A 833.709 72(RSD 为 0.6%)。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于室温下放置 0, 5, 10, 15, 20, 25 h, 吸取 10 μL, 进样测定。结果测得峰面积平均值($n=6$)为隐丹参酮 347.321 14, RSD 为 0.8%; 丹参酮 II_A 786.369 6, RSD 为 0.6%。

2.9 重复性试验

取同一批号(101123)的参芪生肌颗粒适量, 按“2.3”项下方法操作, 按“2.1”项下色谱条件测定, 进行 6 次平行试验, 测得平均含量($n=6$)为隐丹参酮 0.275 9 mg·袋⁻¹, RSD 为 0.4%; 丹参酮 II_A 0.544 2 mg·袋⁻¹, RSD 为 1.0%, 表明本法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

分别取已知含量的样品 15 g(批号: 101123), 精密称定。精密吸取“2.2”项下的对照品溶液 5 mL, 用甲醇稀释至 20 mL, 摇匀, 制成分别含

隐丹参酮对照品 $10.02\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和丹参酮 II_A 对照品 $20.032\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。吸取 1, 2, 3 mL 加入上述已称重的样品中, 按“2.3”项下方法制备 9 份, 测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery($n=9$)

成分	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
隐丹参酮	8.259 3	10.02	18.285 3	100.06	98.7	0.9
	8.246 3	10.02	18.093 0	98.27		
	8.256 4	10.02	18.181 2	99.05		
	8.249 6	20.04	28.155 3	99.33		
	8.253 4	20.04	27.850 5	97.79		
	8.239 8	20.04	27.708 7	97.15		
	8.229 6	30.06	38.178 4	99.63		
	8.236 8	30.06	37.776 6	98.27		
	8.240 1	30.06	38.002 5	99.01		
丹参酮 II _A	16.156 3	20.032	36.184 3	99.98	98.6	1.5
	16.146 9	20.032	36.126 8	99.74		
	16.102 3	20.032	35.889 9	98.78		
	16.160 3	40.064	55.226 7	97.51		
	16.128 6	40.064	55.062 8	97.18		
	16.136 9	40.064	54.674 5	96.19		
	16.156 3	60.096	75.122 5	98.12		
	16.302 3	60.096	76.614 6	100.36		
	16.206 8	60.096	76.116 5	99.69		

2.11 含量测定的结果

取 4 批样品, 按“2.3”项下方法制备, 每批制备 3 份, 每份测定 2 次, 取两份的平均值, 见表 2。

表 2 样品测定结果($n=2$)

Tab 2 Results of content determination($n=2$)

批号	隐丹参酮/ $\text{mg}\cdot\text{袋}^{-1}$	丹参酮 II _A / mg	总量/%	RSD/%
110113	0.275 8	0.549 5	0.825 3	0.9
101102	0.291 3	0.536 4	0.827 7	0.2
100920	0.225 9	0.531 2	0.757 1	1.1
100822	0.231 0	0.597 5	0.828 5	0.7

3 讨论

3.1 稳定性

丹参酮 II_A 见光易分解, 所以放在棕色容量瓶中避光保存, 因此本实验样品和对照品溶液的处

理均在避光条件下进行。

3.2 预处理方法的选择

丹参酮 II_A 和隐丹参酮均为脂溶性化合物, 理论上应该溶于有机溶剂, 但经过试验, 在甲醇与乙醇中的溶解性相差甚大, 用乙醇作溶剂明显比甲醇作溶剂提取完全。又对不同浓度的乙醇进行了考察, 用 40%, 60%, 80%乙醇进行比较, 提取效果 80%乙醇最理想, 因此采用 80%乙醇作为提取溶剂。同时对用与不用大孔吸附树脂过柱进行试验, 未过柱直接进样有杂质峰干扰, 过柱后未出现杂质峰干扰, 最后用 80%乙醇定容。同时对提取方法(索氏提取、超声提取及回流提取)及提取时间等影响因素进行了考察, 对于该制剂来说, 回流提取效果最理想。同时在 20, 40, 50 min 回流提取后进行试验, 40 min 时提取最完全, 再随着时间的延长含量反而下降, 说明受热时间对提取效果影响很大, 所以选择用 80%乙醇回流提取 40 min, 大孔吸附树脂过柱, 80%乙醇定容作为本制剂的处理方法。

3.3 色谱流动相的选择

比较了不同比例或者不同流动相对峰形的影响, 用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 用甲醇-水(75:25)^[14]或甲醇-水(78:22)^[15], 乙腈-冰醋酸-水(74:26:1)^[16]作为流动相, 在本实验中, 用甲醇-水作为流动相与用乙腈-冰醋酸-水(74:26:1)作为流动相, 丹参酮 II_A 与隐丹参酮的峰形与理论板数均较理想, 用甲醇-水(75:25)比用甲醇-水(78:22)的理论板数更高, 所以选择甲醇-水(75:25)作为本试验的流动相。

REFERENCES

[1] Shanghai Food and Drug Administration Medical Preparation Quality Standard [S]. SYZ-ZF-028-2004.
[2] Ch.P(2010)Vol I(中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 70.
[3] FAN H X. Advances in studies on pharmacological functions of Radix Salviae Miltiorrhizae [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med Pharm(新疆中医药), 2007, 25(5): 113-117.
[4] ZHAO Y L, ZHU Y L, CHEN H L, et al. Effect of combination of benazepril, Salvia miltiorrhiza and spirinolactone on glomerular filtration rate in patients with diabetic nephropathy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(4): 357-359.
[5] MA Y, LIU Y H, SUN J Y, et al. From the content of tanshinone II_A sale of Salvia quality evaluation [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(3): 604-605.
[6] PAN J. Sale of Salvia of tanshinone II_A content inspection [J].

- Mod Chin Med(中国现代中药), 2010, 12(10): 29-30.
- [7] ZHANG X, REN F Y. Determination of tanshinone II_A in Wu Lan A Ga Ru-5 by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(4): 317-318.
- [8] LIU Y, MO H T, SONG Z Z, et al. Determination of tanshinone II_A in Dange Jinshu tablets by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 16(5): 84-85.
- [9] LIU C J, SHI H M, ZHANG Z Z, et al. Study on optimization of extraction technology of tanshinone II_A from *Salviae miltiorrhizae* Buhge with ultrasonic extraction method base on HPLC [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2010, 38(8): 4058-4059.
- [10] WANG Z B, WANG W L, ZHU M, et al. Determination of tanshinone II_A in Shenpu Zhitong capsules by HPLC [J]. Her Med(医药导报), 2011, 30(3): 372-373.
- [11] BAI Y, LI L, LEI J W, et al. Quality determination of *Salvia miltiorrhiza* in pharmaceutical industry by near-infrared spectroscopy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2012, 29(3): 222-225.
- [12] XU Y, YANG J R, LIU S, et al. Radix *Salviae miltiorrhizae* cryptotanshinone extraction technology research [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2006, 21(3): 111-112.
- [13] ZHAO Y, LU Y, ZHENG S Z, et al. Progress in studies on pharmacological effect of cryptotanshinone [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2010, 25(11): 1839-1841.
- [14] YANG G D, ZHANG J Y, ZHANG L, et al. Studying extraction methods of tanshinone II_A and cryptotanshinone from Radix *Salviae miltiorrhizae* [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26(12): 1807-1810.
- [15] ZHANG D, ZHU S M. Determination of cryptotanshinone and tanshinone II_A in Yigan granule by HPLC [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2008, 16(2): 159-161.
- [16] QIAO J P, HOU P L, LI Y W, et al. Determination of tanshinone II_A in rat plasma and the pharmacokinetics by RP-HPLC method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38(5): 368-370.
- 收稿日期: 2012-06-04

本刊参考文献标注说明

参考文献必须以作者亲自阅读过的近年主要公开文献为限。勿引内部资料和教科书。“未发表的观察资料”和“个人通讯”不能列为参考文献。书面通讯和内部资料可用圆括号插入正文。正文中引用中文作者姓名时, 应写全名, 勿写×氏。参考文献序号加[], 其格式与标点符号要严格按本刊规定。参考文献全部改为英文, 具体举例如下:

[期刊]作者(3人以下全列, 3人以上列3人后加et al). 题名[J]. 刊名, 年, 卷(期): 起页-迄页.

英文期刊: PALMISANO G L, TAZZARI P L, COZZI E, et al. Expression of CTLA-4 in nonhuman primate lymphocytes and its use as a potential target for specific immunotoxin-mediated apoptosis: results of *in vitro* studies [J]. Clin Exp Immunol, 2004, 135(2): 259-266.

中文期刊: XIAO P, LI W S. Determination of berberine hydrochloride in mixture for Burn and Scald by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2010, 27(5): 439-441.

[专著]作者. 书名[M]. 卷. 版次. 出版地: 出版社(商), 年: 起页-迄页或作者(主编或章节作者). 题名[M]//主编者. 书名. 卷. 版次. 出版地: 出版社(商), 年: 起页-迄页.

中文专著: YU D Q, YANG J S. Handbook of Analytical Chemistry(分析化学手册) [M]. Vol 7. Beijing: Chemical Industry Press, 1999: 492.

英文专著: PEEBLES P Z. Probability, Random Variable, and Random Signal Principles [M]. 4th. ed. New York: McGraw Hill, 2001.

[专利]专利申请者. 专利题名: 专利国别, 专利号[P]. 公告日期或公开日期.

专利文献: JIANG X Z. Manufactural method for a warm external medicament: China, 88105607.3[P]. 1989-07-26.

[国际、国家标准]标准编号, 标准名称[S]. 年: 起页-迄页.

例: Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 84-85.

[电子文献]作者. 电子文献题名[电子文献及载体类型标识]. 出处地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径.

例: CHRISTINE M. Plant physiology: plant biology in the Genome Era [J/OL]. Science, 1998, 281: 331-332[1998-09-23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/anatmorp>.