

HPLC 同时测定复方丹参降浊丸中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B

杨锁成^{1,2}, 汪坤¹, 张振凌^{1*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 周口市中医院, 河南 周口 466001)

[摘要] 目的: 建立一种同时测定复方丹参降浊丸中丹参酮 II_A 及丹酚酸 B 的方法。方法: 色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-0.5% 甲酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 268 nm。结果: 丹参酮 II_A 及丹酚酸 B 分别在 0.007~0.084 μg, 0.071 5~1.001 μg 内呈良好线性关系; 平均回收率分别为 100.9% (RSD 1.81%), 101.4% (RSD 1.55%)。结论: 该方法可以快速准确同时测定复方丹参降浊丸中丹参酮 II_A 及丹酚酸 B 含量。

[关键词] 复方丹参降浊丸; 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0084-03

Simultaneous Determination of Salvianolic acid B and Tanshinone II_A in Co-danshenjiangzhuo Pill by HPLC

YANG Suo-cheng^{1,2}, WANG Kun¹, ZHANG Zhen-ling^{1*}

(1. Henan University of Traditrand Chinese Medicine Zhengzhou 450008, China;
2. Zhoukou Hospital of Traditrand Chinese Medicine Zhoukou 466001, China)

[Abstract] **Objective:** To propose an HPLC quantitative method for simultaneously determining tanshinone II_A and salvianolic acid B in Co-danshenjiangzhuo Pill. **Method:** Analysis were carried out using an Agilent TC-C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of methanol and 0.5% formic acid in water with gradient elution and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The wavelength was set at 268 nm. **Result:** The linearity ranges of tanshinone II_A and salvianolic acid B were 0.007-0.084 μg and 0.071 5-1.001 μg respectively. The average recoveries were 100.9% (RSD 1.81%) for tanshinone II_A, and 101.4% (RSD 1.55%) for salvianolic acid B. **Conclusion:** The method appeared to be precise and accurate for the simultaneous determination of tanshinone II_A and salvianolic acid B in Co-danshenjiangzhuo Pill.

[Key words] Co-danshenjiangzhuo Pill; tanshinone II_A; salvianolic acid B; HPLC

复方丹参降浊丸是根据疗效确切可靠的临床验方,由丹参、葛根、山楂、毛冬青、穿山龙、决明子、泽泻 7 味药制成的医院中药复方制剂。该制剂为丹参、决明子、山楂 3 味药粉碎后与葛根、穿山龙、泽

泻、毛冬青 4 味药的乙醇提取物制成的丸剂。具有活血化瘀、健脾化湿、滋养肝肾之功效,主要用于血瘀、气虚、气郁、痰饮等。丹参为复方丹参降浊丸方中的君药,以丹参的主要有效成分丹参酮 II_A 及丹酚酸 B 为指标性成分,建立高效液相色谱法同时测定丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的含量,快速、准确,可以较为有效地控制该药品质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-2010A 高效液相色谱仪 (CLASS-VP 数据处理系统,二极管阵列检测器,日本岛津); BS

[收稿日期] 20100906(003)

[第一作者] 杨锁成, 在职硕士研究生, 主任药师, 从事医院制剂和炮制, Tel: 0394-8279679, E-mail: yangsuochengyang@sina.com

[通讯作者] * 张振凌, 从事中药炮制学教学与研究, Tel: 0371-65680970, E-mail: zhangzli6758@163.com

210S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); METTLERAE240 型 1/10 万电子天平(瑞士); DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); KQ-500DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DZKW-4 电子恒温不锈钢水浴锅(上海东星建材试验设备有限公司); SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂与试药 甲醇(天津市永大化学试剂开发中心,分析纯); 色谱纯甲醇(天津市四友精细化学制品有限公司); 甲酸(天津市科密欧化学试剂开发中心); 双蒸水(自制); 丹参酮 II_A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110766-200518); 丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 115939-25-8); 复方丹参降浊丸(批号 2009021603, 2009060909, 2009111816)和阴性样品(缺丹参)由周口市中医院提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇(A)-0.5% 甲酸水(B)为流动相梯度洗脱(0 min, 85% B; 10 min, 65% B; 19 min, 50% B; 25 min, 30% B; 30 min, 15% B; 40 min, 5% B); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 268 nm; 柱温 30 °C; 理论塔板数以丹参酮 II_A、丹酚酸 B 计均大于 2 000。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A 对照品 0.14 mg、丹酚酸 B 对照品 1.43 mg 分别置 10 mL 棕色量瓶中,加色谱甲醇至刻度,摇匀后取等体积混合(丹参酮 II_A 7 mg·L⁻¹、丹酚酸 B 71.5 mg·L⁻¹)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品研细(全部过 50 目筛),取约 0.5 g,精密称定,置具塞圆底烧瓶中,精密加入 70% 甲醇 35 mL,称定质量,加热回流 1 h,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性溶液的制备 取阴性样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。

2.3 线性关系的考察 取对照品溶液,分别进样 1, 2, 6, 8, 12, 14 μL,以峰面积积分为纵坐标,进样量(μg)为横坐标进行线性回归,结果表明为丹参酮

II_A 在 0.007 ~ 0.084 μg 线性关系良好,回归方程是 $Y = 6\ 810\ 593.0X + 205\ 102.3$, $r = 1$; 丹酚酸 B 在 0.071 5 ~ 1.001 μg 线性关系良好,回归方程是 $Y = 819\ 409X - 5\ 694.5$ ($r = 0.999\ 99$)。

2.4 精密度试验 取对照品溶液,重复进样 5 次,每次 10 μL,计算峰面积积分值,丹参酮 II_A RSD 2.79%; 丹酚酸 B RSD 2.37%,结果表明精密度良好。

2.5 重复性试验 取同一批样品 5 份,每份为 0.5 mg,精密称定,按照供试品溶液的制备方法制备,分别进样 10 μL,计算得丹参酮 II_A 平均含量为 0.0186%, RSD 2.32%; 丹酚酸 B 平均含量为 0.627%, RSD 0.98%,表明重复性良好。

2.6 稳定性试验 取样品 0.5 mg,精密称定,按照供试品溶液的制备方法制备,分别放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 后进样,进样量为 10 μL,计算色谱峰峰面积变化情况,丹参酮 II_A RSD 2.55%,丹酚酸 B RSD 0.84%,结果表明样品在 12 h 内稳定。

2.7 专属性考察 取阴性溶液进样 10 μL,在相同的色谱条件下与对照品溶液的 HPLC 图比较,在丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 相应的位置上无峰出现,如图 1。

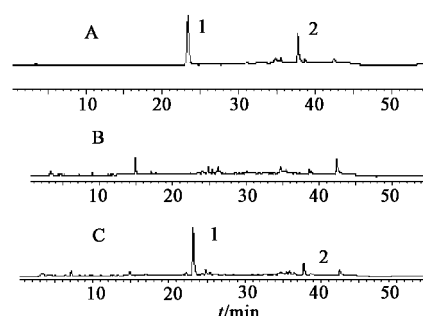


图 1 丹参降浊丸色谱

A. 混合对照品; B. 阴性样品; 1. 丹酚酸 B; 2. 丹参酮 II_A

2.8 加样回收率试验 取同一批复方丹参降浊丸粉末(批号为 2009061203,过 50 目筛,丹参酮 II_A 含量为 0.184 0 mg·g⁻¹、丹酚酸 B 含量为 6.258 mg·g⁻¹) 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别置于具塞圆底烧瓶中,每 2 份分别加入丹参酮 II_A 对照品溶液(13.94 mg·L⁻¹) 2.6, 3.3, 4.0 mL,丹酚酸 B 对照品溶液(1.595 0 mg·L⁻¹) 0.8, 1, 1.2 mL,其余照供试品溶液制备项下同法操作,分别进样 10 μL,计算加样回收率,结果见表 1 2。

表 1 丹参酮 II_A 加样回收率试验 (n = 6)

样品质量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.250 4	0.046 07	0.036 24	0.083 57	103.5	100.9	1.81
0.251 1	0.046 20	0.036 24	0.083 22	102.2		
0.251 2	0.046 22	0.045 99	0.092 98	101.7		
0.250 7	0.046 12	0.045 99	0.091 71	99.1		
0.250 3	0.046 05	0.055 76	0.101 20	98.9		
0.250 8	0.045 14	0.055 76	0.101 94	100.1		

表 2 丹酚酸 B 加样回收率试验 (n = 6)

样品质量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.250 4	1.568	1.276	2.858	101.2	101.4	1.55
0.251 1	1.572	1.276	2.875	102.1		
0.251 2	1.573	1.595	3.235	104.2		
0.250 7	1.569	1.595	3.180	101.0		
0.250 3	1.567	1.914	3.490	100.5		
0.250 8	1.570	1.914	3.478	99.7		

2.9 样品含量测定 取 3 批样品按供试品溶液的制备方法制备,每次进样 10 μL,测得峰面积积分值,计算丹参酮 II_A、丹酚酸 B 平均质量分数分别为 0.184 0, 6.258 mg·g⁻¹ (批号 2009061203), 0.188 9, 6.277 mg·g⁻¹ (批号 2009060909), 0.195 0, 6.270 mg·g⁻¹ (批号 2009111816)。

3 讨论

复方丹参降浊丸中丹参为复方丹参降浊丸方中的君药,具有活血化瘀功效,同时以丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 为指标成分进行测定,可以更加有效地对复方丹参降浊丸进行质量控制。

根据 2010 年版《中国药典》一部及有关文献^[1,3]对丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 进行全波长扫描,考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水(不同浓度)在不同梯度下的洗脱效果,最终确定本实验以 268 nm 作为测定波长,采用的酸水浓度、洗脱条件下分离度好、保留时间合适、峰形对称,较好地完成了对丹参 2 种不同成分同时进行含量测定的要求。

对同一样品,比较在本实验建立的 HPLC 条件下和 2010 年版《中国药典》一部丹参项下介绍的 HPLC 条件下丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 含量测定结果,表明无显著性差异,说明该方法准确可靠。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:70.
- [2] 孙棣,刘文英,梁彩. HPLC 法同时测定丹参片中 4 种有效成分的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(1):51.
- [3] 李娴,金传山,吴德玲,等. HPLC 同时测定丹参中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(3):47.

[责任编辑 蔡仲德]