

• 质量标准 •

丹参微乳液中丹参酮 II_A 的 HPLC 测定方法的建立

邓茂^{1,2}, 杨健², 易红², 杨华^{2*}

(1. 江西中医学院, 江西 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立丹参微乳液中丹参酮 II_A 的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-水 (80: 20) 为流动相, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 270 nm; 柱温为 35 °C。结果: 本方法线性范围 (7.59~ 303.44) ng, $r = 1.000 0$, 精密度 RSD 为 0.58% ($n = 6$), 重复性 RSD 为 0.87% ($n = 6$), 样品在 16 h 内稳定, 平均加样回收率在 97.20%~ 102.19% 之间。结论: 该方法简便、可靠, 可用于丹参微乳液中丹参酮 II_A 的含量测定。

[关键词] 丹参; 微乳; 高效液相色谱法; 丹参酮 II_A

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0001-03

Determination of Tanshinone II_A in Radix Et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae Microemulsion by HPLC

DENG Mao^{1,2}, YANG Jian², YI Hong², YANG Hua^{2*}

(1. JiangXi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the determination method of Tanshinone II_A in Radix Et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae microemulsion by HPLC. **Methods:** The analysis was performed on a Diamonsil-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with a mobile phase of methanol-water (80: 20). The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 270 nm. The column temperature was 35 °C. **Results:** The calibration curve was linear in the range of (7.59~ 303.44) ng, $r = 1.000 0$. The accuracy, repeatability, stability and recovery of this method were satisfied. **Conclusions:** The established method of determining for the content of Tanshinone II_A in Radix Et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae microemulsion was convenient, accurate and reliable.

[Key words] Radix Et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae; microemulsion; HPLC; tanshinone II_A

丹参为唇形科植物 (*Salvia miltiorrhiza* Bge) 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦之功^[1]。临床上主要用于治疗心绞痛, 冠心病等疾病。丹参主要含有脂溶性和水溶性两类成分。脂溶性成分主要丹参酮类 (如丹参酮 II_A), 水溶性成分主要是

丹酚酸类 (如丹酚酸 B)^[2,3]。微乳是由水、油、表面活性剂和助表面活性剂在适当的配比下, 自发形成的透明或半透明、均相的、热力学稳定的一种体系^[4], 具有可增溶脂溶性物质的特点^[5]。用于溶解丹参中的丹参酮类物质具有较好的增溶效果。本文探讨了丹参微乳液中丹参酮 II_A 的 HPLC 测定方法, 为微乳技术在中药中的应用研究提供一个可靠的测定方法。

1 仪器与试剂

Waters 1515-2487 型液相色谱仪 (美国); 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 迪马公

[收稿日期] 2007-07-13

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAI09B08-15)。

[通讯作者] * 杨华, Tel: (010) 84017310; E-mail: yanghua2796@sina.com

司);分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);丹参酮 II_A 对照品(110766-200417, 供含量测定用, 购于中国药品生物制品检定所);丹参药材(批号: 021616, 北京卫仁中药饮片厂);丹参微乳液(自制);无水乙醇(分析纯, 北京化工厂);甲醇(优级, 北京化工厂);乙腈(色谱级), 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (80: 20); 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 270 nm; 柱温: 35 °C; 理论塔板数以丹参酮 II_A 计不低于 2 000。在此条件下, 丹参酮 II_A 与其它成分分离度良好。结果见图 1、图 2。

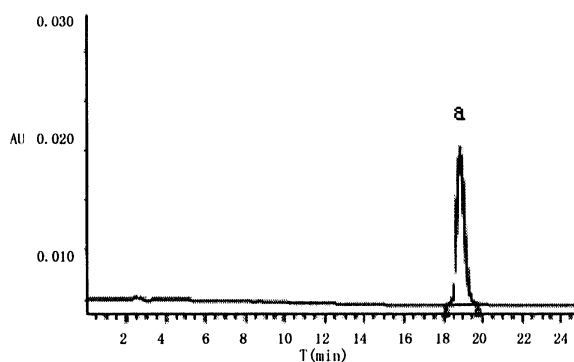


图 1 丹参酮 II_A 对照品 HPLC 图
a 丹参酮 II_A

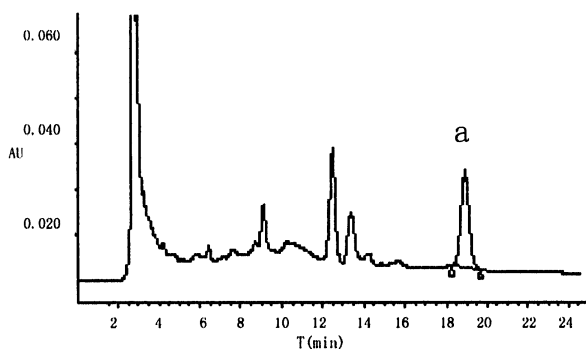


图 2 丹参微乳液 HPLC 图
a 丹参酮 II_A

2.1.2 空白试验 取适量微乳辅料混合物, 加水混合均匀, 即得微乳液。精密吸取微乳液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 滤过, 按上述色谱条件测定吸收峰面积。结果显示, 微乳液对测定没有影响。结果见图 3。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A 对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 16 μg 对照品溶液。

2.3 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μL, 按上述色谱条件测定峰面积。以进

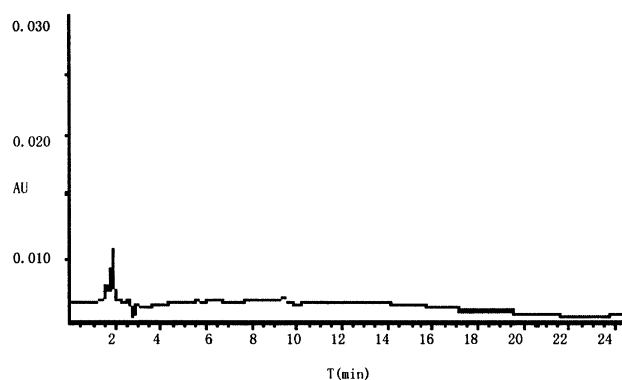


图 3 微乳液 HPLC 图

样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得曲线方程为 $Y = 5.40 \times 10^3 X + 2.98 \times 10^3$, $r = 1.000 0$ 。说明丹参酮 II_A 在 (7.59~ 303.44) ng 范围内进样量与峰面积呈良好线性关系。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 供试品提取方法的选择 超声法 精密吸取丹参微乳液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声 30 min, 静置 1 h, 以甲醇定容至刻度, 摇匀即得。

蒸干溶解法 精密吸取丹参微乳液 1 mL, 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣以甲醇溶解, 置 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀即得。

直接稀释法 精密吸取丹参微乳液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容至刻度, 摇匀即得。

分别吸取各供试品液, 按 2.1.1 项下测定丹参酮 II_A 的含量, 结果见表 1。3 种提取方法之间没有显著性差异, 故选择直接稀释法。

表 1 不同提取方法的测定结果 (n = 3)

方法	丹参酮 II _A (mg · mL ⁻¹)	RSD (%)
超声	0.025 8	0.18
蒸干溶解	0.025 8	0.02
直接稀释	0.025 8	0.95

2.4.2 稀释溶剂的选择 精密吸取丹参微乳液, 置 10 mL 量瓶中, 分别用甲醇、流动相、微乳液稀释并定容到刻度, 摇匀, 滤过; 按 2.1.1 项下测定丹参酮 II_A 的含量, 结果见表 2。数据表明用甲醇作稀释溶剂, 丹参酮 II_A 的测定值较高, 因此选择甲醇为稀释溶剂。

表 2 不同稀释溶剂的测定结果 (n = 3)

稀释溶剂	丹参酮 II _A (mg · mL ⁻¹)	RSD (%)
甲醇	0.025 5	0.00
流动相	0.024 7	0.62
微乳液	0.024 0	0.00

2.4.3 稀释倍数的选择 精密吸取丹参微乳液,用甲醇分别稀释 5, 10, 20 倍,按 2.1.1 项下测定丹参酮 II_A 含量,结果见表 3。数据表明,稀释 5 倍时丹参酮 II_A 测定值较高。

表 3 不同稀释倍数对丹参酮 II_A 测定结果的影响 (n=3)

稀释倍数	丹参酮 II _A (mg·mL ⁻¹)	RSD(%)
5	0.027 4	0.50
10	0.027 1	1.45
20	0.026 1	0.03

2.4.4 供试品溶液的制备 精密吸取丹参微乳液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,静置,滤过,即得供试品溶液。

2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液,连续进样 6 次,进样量相同,按 2.1.1 项下测定丹参酮 II_A 含量为 0.021 9 mg·mL⁻¹,计算 RSD 为 0.58%,表明精密度较好。

2.6 重复性试验 取同一自制丹参微乳液样品 6 份,分别按 2.4.4 项下方法制备,测定丹参酮 II_A 的含量,结果为 0.021 5 mg·mL⁻¹,计算 RSD 为 0.87%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 16 h 时进样 10 μL,测定丹参酮 II_A 的含量,结果为 0.021 7 mg·mL⁻¹,计算 RSD 为 0.56%,表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品 1 mL,置 10 mL 量瓶中,分别加入一定量的丹参酮 II_A 对照品,用甲醇定容至刻度,滤过,按 2.1.1 项下测定丹参酮 II_A 含量,计算平均回收率,结果见表 4。数据表明,加样回收率在 97.20%~102.19% 之间。

2.9 样品测定 取不同批次样品,按 2.4.4 项下方法制成供试品溶液,依法测定丹参酮 II_A 含量,结果分别为: 0.025 3, 0.041 4, 0.041 3, 0.016 3, 0.019 4, 0.012 6 mg·mL⁻¹。

3 讨论

本文采用《中华人民共和国药典》^[1] 丹参项下含量测定的检测波长(270 nm)。试验表明,微乳液在此检测波长下,对测定没有影响。本方法精密度高、重复性好,样品在 16 h 内稳定,加样回收率在 95%

表 4 加样回收率试验结果 (n=9)

样品量 (mg)	标准品量 (mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.016 7	0.013 7	0.030 7	102.19		
0.016 7	0.013 7	0.030 7	102.19	102.19	0.00
0.016 7	0.013 7	0.030 7	102.19		
0.016 7	0.027 4	0.043 6	98.18		
0.016 7	0.027 4	0.043 6	98.18	97.20	1.74
0.016 7	0.027 4	0.042 8	95.25		
0.016 7	0.041 0	0.056 5	97.07		
0.016 7	0.041 0	0.056 5	97.07	97.48	0.72
0.016 7	0.041 0	0.057 0	98.29		

~105% 之间。因此,本方法可以用于测定丹参微乳液中丹参酮 II_A 的含量。

试验中发现,丹参微乳液不经处理直接进样测定,在丹参酮 II_A 色谱峰左右有一些小峰干扰,导致测定结果重复性较差。本文所选择的前处理方法,可破坏微乳的平衡系统,并可以减少微乳液中其他成分(如鞣质、水溶性成分等)对丹参酮 II_A 的测定影响。3 种提取方法用于丹参微乳液中丹参酮 II_A 的含量测定前处理,结果无差异,故选用直接稀释法。不同溶剂的比较显示有差异性,使用甲醇做溶剂测得的丹参酮 II_A 含量较高;用微乳做溶剂稀释时,进样易产生气泡,数据重复性较差,而且可能影响色谱柱的使用寿命。鉴于丹参酮 II_A 在甲醇中的溶解度较高,选择甲醇为稀释溶剂有利于目标成分的分离、测定。本文还考察了稀释倍数对丹参酮 II_A 测定的影响,结果显示无差异性。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005. 52.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 第一册,北京:化学工业出版社,2002. 212-229.
- [3] 常新全,丁丽霞. 中药活性成分分析手册[M]. 北京:学苑出版社,2002. 341-360.
- [4] 崔正刚,殷福珊. 微乳化技术及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2001. 73-75.
- [5] 杨华,易红. 我国微乳技术在药学领域中的研究进展[J]. 中国新药杂志,2006,15(10): 764-769.