

坚骨颗粒中丹参指标成分的含量测定

吴雪峰, 陈宝龙*, 冯 坤, 谢 文

(河南省洛阳正骨医院正骨研究所, 河南 洛阳 471002)

[摘要] 目的: 测定坚骨颗粒中丹参素和丹参酮IIA的含量。方法: 采用反向高效液相色谱(RP-HPLC)法, ZORBAX SB-C₁₈柱, 在选定的流动相系统、波长及柱温条件下进行。结果: 丹参素的平均回收率为98.6%, RSD为3.8%; 丹参酮IIA的平均回收率为97.8%, RSD为3.2%。结论: 本方法简便、可靠, 测定结果准确, 可作为坚骨颗粒的质量控制方法。

[关键词] 坚骨颗粒; 丹参素; 丹参酮IIA; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)08-0023-02

中药复方制剂坚骨颗粒是在中医药理论指导下开发的治疗老年骨质疏松症的在研新药, 由丹参、淫羊藿、黄芪等组成。本文对制剂中活血药味丹参的指标成份的含量测定进行了研究。

1 仪器和试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪, DAD检测器, HP chemstation。

试剂: 甲醇(色谱纯)、冰醋酸(分析纯)、重蒸水(自制)、坚骨颗粒。

对照品: 丹参素钠(复旦大学药学院天然药物化学教研室)、丹参酮IIA(中国药品生物制品鉴定所)。

2 方法和结果

2.1 丹参素的含量测定^[1,2]

2.1.1 色谱条件及系统适用性 ZORBAX SB-C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5 μm), 柱前内置C₁₈预柱, 流动相: 甲醇-1%醋酸溶液(5:95), 流速: 1.0mL·min⁻¹, 检测波长: 280nm, 柱温: 30℃, 进样量: 20 μL, 数据处理: 峰面积外标法定量, 理论塔板数按丹参素峰计算不低于2000。

2.1.2 对照品溶储备液的制备 精密称取对照品适量, 置棕色量瓶中, 加50%甲醇溶液制成每mL含100.0μg丹参素钠的储备液, 密封, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 坚骨颗粒, 供试品溶液, 制备方法同2.1.3。缺丹参的阴性对照溶液。

2.1.4 线性关系的考察 分别吸取丹参素钠对照

品储备液(200 μg·mL⁻¹) 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0mL, 至于10mL量瓶中, 50%甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标液, 在选定的色谱条件下测定丹参素, 以峰面积 y 与浓度 x 进行线性回归, 得线性方程为 $y = 11.82x + 3.27$, $r = 0.9992$; 线性范围为10 μg·mL⁻¹~200 μg·mL⁻¹。

2.1.5 精密度试验 取线性关系考察项下的4号对照品溶液, 照实验方法重复进样5次, 测定峰面积, 求得丹参素的RSD为0.49%。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取供试液, 照实验方法在0, 1, 2, 3, 4, 6h进样, 测定峰面积, 求得丹参素的RSD为1.6%。表明供试液在6h稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批号的坚骨颗粒, 研细, 精密称取6份, 每份1.0g, 依上述方法制备供试液, 照实验方法分别进样, 测定峰面积, 求得丹参素含量的RSD为1.2% ($n = 6$)。表明方法具有良好的重复性。

2.1.8 专属性考察 照上述色谱条件, 吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的时间位置上, 有相同保留时间的色谱峰, 而阴性对照在此保留时间无干扰。

2.1.9 加样回收试验 按样品中丹参素含量的80%、100%、120%精密称取丹参素对照品各3份, 分别加入已称重的坚骨颗粒细粉中, 照供试品溶液的制备方法制备供试液, 依实验方法测定峰面积, 求算丹参素的含量。求得平均回收率为98.6% (RSD=3.8%) ($n = 9$), 表明方法的准确度良好。

[收稿日期] 2005-08-03

[通讯作者] 陈宝龙, Tel: (0379) 63546653; E-mail: CBL0002@

126.com

表 1 丹参素加样回收率试验结果

序号	样品中的量(mg)	加入量(mg)	测出量(mg)	回收率(%)	\bar{x} (%)	RSD(%)
1	1.20	0.96	1.96	97.7		
2	1.20	0.96	2.00	102		
3	1.20	0.96	1.94	95.5		
4	1.20	1.20	2.26	105		
5	1.20	1.20	2.13	93.6	98.6	3.8
6	1.20	1.20	2.15	95.5		
7	1.20	1.44	2.42	102		
8	1.20	1.44	2.39	99.2		
9	1.20	1.44	2.46	96.9		

2.1.10 样品测定 精密吸取供试液和对照品溶液,照实验方法测定峰面积,求算丹参素的含量。

表 2 坚骨颗粒中丹参素的含量(n=3)

批号	010601	010602	010603
丹参素含量(mg/g)	0.121	0.118	0.120
RSD(%)	1.3	1.2	1.3

2.2 丹参酮 IIA 含量测定^[2,3]

2.2.1 色谱条件及系统适用性 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250mm×4.6mm, 5 μm), 柱前内置 C₁₈ 预柱, 流动相: 甲醇-水(74:26), 流速: 0.9mL·min⁻¹, 检测波长: 270nm, 柱温: 25℃, 进样量: 20 μL, 数据处理: 峰面积外标法定量, 理论塔板数按丹参酮 IIA 计算不低于 2000。

2.2.2 对照品溶储备液的制备 精密称取对照品适量, 置棕色量瓶中, 加甲醇溶液制成每 mL 含 100μg 丹参酮 IIA 的储备液, 密封, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取坚骨颗粒, 研细, 精密称取 1.0g, 置于 100mL 圆底烧瓶中, 加 95% 乙醇 50mL, 精密称重, 浸泡 30min, 加热回流 90min, 冷却至室稳, 称重并补足重量, 摇匀, 过滤, 精密移取续滤液 5mL, 置于棕色量瓶中, 作为供试品溶液。同法制成缺丹参的阴性对照溶液。

2.2.4 线性关系的考察 分别吸取丹参酮 IIA 对照品储备液(200 μg·mL⁻¹) 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL, 至于 10mL 量瓶中, 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标液, 在选定的色谱条件下测定丹参酮 IIA, 以峰面积 y 与浓度 x 进行线性回归, 得线性方程为 $y = 72.76x + 4.02$, $r = 0.9994$, 线性范围为 5 μg·mL⁻¹ ~ 100 μg·mL⁻¹。

2.2.5 精密度试验 取线性关系考察项下的 4 号对照品溶液, 照实验方法重复进样 5 次, 测定峰面积, 求得丹参酮 IIA 的 RSD 为 0.35%。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试液, 照实验方法在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定峰面积, 求得丹参酮 IIA 的 RSD 为 0.79%。表明供试液在 10h 稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批号的坚骨颗粒, 研细, 精密称取 6 份, 每份 1.0g, 依上述方法制备供试液, 照实验方法分别进样, 测定峰面积, 求得丹参酮 IIA 含量的 RSD 为 1.6% (n=6)。表明方法具有良好的重复性。

2.2.8 专属性考察 照上述色谱条件, 吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的时间位置上, 有相同保留时间的色谱峰, 而阴性对照在此保留时间无干扰。

2.2.9 加样回收试验 按样品中丹参酮 IIA 含量的 80%、100%、120% 精密称取丹参酮 IIA 对照品各 3 份, 分别加入已称重的坚骨颗粒细粉中, 照供试品溶液的制备方法制备供试液, 依实验方法测定峰面积, 求算丹参酮 IIA 的含量, 计算平均回收率为 97.8% (RSD=3.2%) (n=9)。表明方法的准确度良好。

2.2.10 样品测定 精密吸取供试液和对照品溶液, 照实验方法测定峰面积, 求算丹参酮 IIA 的含量。

表 3 坚骨颗粒中丹参酮 IIA 的含量(n=3)

批号	010601	010602	010603
丹参酮 IIA 含量(mg/g)	0.222	0.214	0.216
RSD(%)	1.6	1.5	1.5

3 讨论

丹参素和丹参酮 IIA 作为丹参中两大类有效成分的代表化合物, 建立二者的含量测定方法对有效控制丹参相关制剂的质量有实用意义。本研究通过系统的方法学考察建立的丹参素和丹参酮 IIA 定量测定方法为坚骨颗粒的质量控制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 庄燕黎, 晁若冰. HPLC 法测定大鼠血浆中丹参素和原儿茶醛[J]. 药学报, 1999, 34(8): 613-615.
- [2] 刘重芳, 张钰泉. 丹参不同工艺比较[J]. 中成药, 1999, 21(8): 385-387.
- [3] 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. 22-23.