

• 药物分析 •

高效液相色谱法测定复方丹参片丹参酮 II A 含量

张旋华¹, 韩丽萍², 杨德忠², 李爱红²(1. 顺德中西医结合医院, 顺德 528300; 2. 广州军区联勤部药品仪器检验所, 广州 510500)

摘要: 目的: 建立测定复方丹参片中丹参酮 II A 含量的高效液相法。方法: 色谱条件: 色谱柱 Spherisorb C₁₈(5 μ , 200mm \times 4.6mm) 色谱柱; 流动相: 甲醇-水(85:15); 检测波长: 270nm; 流速: 1ml/min。结果: 丹参酮 II A 在 8~180ng 范围内线性关系良好($r=0.9999$), 最低检出限 1.5ng, 阴性样品对测定无干扰, 溶液在 24h 内保持稳定, 加样回收率 95% 以上。结论: 该方法快速、准确, 可用于复方丹参片中丹参酮 II A 的鉴别和含量测定。

关键词: HPLC; 丹参酮 II A; 丹参

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2000)04-0223-03

Determination of tanshinone II A in compound tanshin tablet by HPLC

ZHANG Xuan-hua¹, HAN Li-ping², YANG De-zhong², LI Ai-hong²(1. Hospital of Combination of TCM and Western medicine, Shunde 528300, China; 2. Institute of Drug Determination of Guangzhou Military District, Guangzhou 510500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To develop a method of HPLC to determine the content of tanshinone II A in compound tanshin tablet, **METHODS:** Spherisorb C₁₈(5 μ , 200mm \times 4.6mm) was used, mobile phase was methanol-water(85:15). The detection wavelength was 270nm. **RESULTS:** The linear ranges of determination of tanshinone II A was 8~180ng($r=0.9999$), the average recovery rate was 99.5%. **CONCLUSION:** This method may be used for determination tanshinone II A in compound tanshin tablet.

KEY WORDS: HPLC; *tanshin*; tanshinone II A

复方丹参片是常用中成药, 临床用量大, 生产厂家多, 近年来国家对该品种的质量抽查多次发现不合格的产品。我们在工作实践中发现, 即使是按中国药典 1995 版二部判为合格的产品, 在质量也存在极大的差异, 这是因为药典仅规定对其有效成份进行薄层色谱鉴别, 合格的界定较为粗略之故。我们建立反相高效液相色谱法测定丹参酮 II A, 方法简便、快速、可靠, 取得了满意的结果。

1 仪器与试剂

依利特 P200 型高效液相色谱仪; UV200 紫外检测器; WDL-95 色谱工作站。

丹参酮 II A 对照品(批号: 408-9506)、丹

参对照药材均由中国药品生物制品检定所提供; 丹参药材及复方丹参片由药品商店采购; 甲醇为色谱纯; 其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Spherisorb C₁₈(5 μ , 200mm \times 4.6mm), 中国科学院大连化学物质所; 流动相: 甲醇-水(85:15); 检测波长: 270nm; 流速: 1ml/min; 进样体积: 5 μ l。

2.2 线性关系考察

精密称取丹参酮 II A 对照品约 10mg, 置 50ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀。精密吸取适量, 加甲醇依次稀释, 使成不同浓度

的系列溶液。

取上述溶液分别进样 5 μ L, 记录色谱图, 并以峰面积对进样量进行回归, 丹参酮 II A 的回归方程为: $A = 4514.2 + 2565.4W$, $r = 0.9999$, 丹参酮 II A 进样量在 8~180ng 范围内呈良好的线性关系。

2.3 稳定性试验

丹参酮 II A 对照品溶液在室温 (20 $^{\circ}$ C) 条件下放置, 在不同时间内测定峰面积, 观察溶液稳定性, 见表 1, 结果表明丹参酮 II A 对照品溶液在 24h 内可保持基本稳定。

表 1 稳定性试验结果 ($n = 5$)

时间 (h)	平均积分面积	日内误差 RSD (%)	日内误差 RSD (%)
0	2309	0.42	0.91
24	2304	0.64	
48	2257	0.36	

2.4 测定方法

对照品溶液配制: 精密称取丹参酮 II A 对照品约 10mg, 置 50ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀。精密吸取 2ml, 置 25ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀即得, 每毫升含丹参酮 II A 16 μ g。

丹参药材: 精密称取丹参粉末 (过 4 号筛) 约 0.3mg, 置已称定重量的干燥回流瓶中, 精密加入甲醇 50ml, 密塞, 精密称重, 置水浴加热回流 1h 放冷, 精密称重, 加甲醇补足损失的重量, 滤过, 弃初滤液, 取续滤液为药材供试品溶液。

复方丹参片: 取复方丹参片 10 片, 剥去糖衣, 研细, 精密称取适量 (约相当于 5 片), 加乙醚 20ml 超声提取 10min, 静置, 滤过上层液, 用少量乙醚再提取 2 次, 滤过, 并用乙醚多次洗涤滤纸及滤器, 合并滤液置水浴挥干乙醚, 残渣加甲醇溶解, 转移至 50ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 弃初滤液, 续滤液为供试品溶液。

取上述溶液各 5 μ L 注入色谱仪, 记录积分值, 按外标法计算即得。

2.5 阴性对照试验

按处方规定量制取除丹参外的阴性对照样品, 按上述方法制得阴性供试品溶液, 记录色谱图, 在丹参酮 II A 保留时间内无吸收峰, 见图

1。将对照品溶液与阴性供试品溶液同时注入色谱仪, 对照品积分值保持不变。

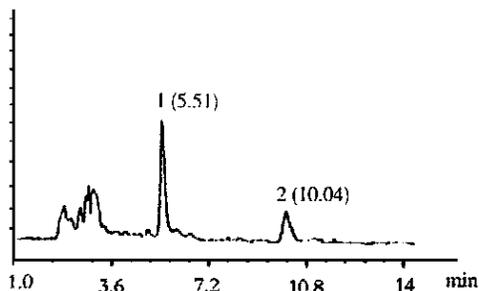


图 1 阴性样品色谱图

2.6 加样回收试验

取已知准确含量的丹参片细粉或丹参阴性对照药材粉末, 精密加入不同量的对照品, 按上述方法制得供试品溶液, 测定丹参酮 II A 含量, 计算加样回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果 ($n = 3$)

序号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
1	0.000	0.510	0.437	85.7	2.6
2	0.000	0.950	0.877	92.3	2.2
3	0.092	0.510	0.588	97.2	1.9
4	0.260	0.510	0.759	97.8	1.8

2.7 样品测定结果

按上述方法测定丹参药材及复方丹参片中丹参酮 II A 含量, 结果见表 3。

表 3 丹参药材及复方丹参片中丹参酮 II A 含量 ($n = 3$)

样品	来源	含量 (%)	RSD (%)
丹参对照药材 (%)	检定所	0.150	1.93
丹参药材	市购	0.076	2.81
丹参药材	市购	0.310	0.56
丹参药材	市购	0.210	1.81
丹参药材	市购	0.050	0.56
复方丹参片 (μ g/片)	厂家 1	14.63	2.34
复方丹参片	厂家 2	71.02	1.65
复方丹参片	厂家 3	5.107	3.05
复方丹参片	自制	50.72	1.58
复方丹参片	自制	56.16	2.54
复方丹参片	自制	54.12	1.84

3 讨论

3.1 本色谱系统可将丹参有关成分实现良好基线分离, 其他组分的保留时间均早于丹参酮 II A, 对丹参酮 II A 含量测定无影响, 见图 2。

(下转第 229 页)

(差谱点为 0.00%), 确认仪器自我训练完成。

2.5 确定限量杂质差谱点值域

将非纯品溶液得到的 15 组数据文件分别与数据文件 1 匹配比较, 得出 15 个三维褶合光谱差谱点, 分别为 3.87%、3.92%、3.77%、4.08%、3.90%、3.82%、4.13%、3.80%、3.96%、3.65%、4.05%、3.83%、3.94%、3.82%、3.87%, 经统计学处理, $\bar{x} \pm s = (3.90 \pm 0.13)\%$, 其 95% 置信度(上限)为 3.97%, 以此作为三维褶合光谱差谱点值域判据, 即差谱点大于 3.97% 的为不合格样品。

2.6 样品测定

取阿司匹林肠溶片, 去除肠溶衣, 称取内含阿司匹林为 25mg 的粉末, 用无水乙醇分次研磨移入 100ml 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 滤过, 取续滤液 2ml, 置 50ml 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 同上法操作采样, 建立数据文件, 与数据文件 1 进行匹配比较, 得出差谱点, 判断, 并与药典法比较。见附表 1。

表 1 样品测定结果

样品	水杨酸限量	
	药典法	本法(差谱点)
A	合格	3.27
B	合格	2.98
C	超限	4.46(超限)

3 讨论

实验表明, 纯品溶液与含限量杂质的非纯品溶液的吸收光谱极相似, 常规的分光光度法无法区别, 但褶合光谱的差异却很明显, 并以差谱点直观地反映出来。测定结果与药典法一致。

实验中对片剂内的辅料依法进行了吸收光谱的考察, 表明在 200~340nm 波长范围内无紫外吸收, 但由于肠溶衣材料较复杂, 样品测定时采用去除肠溶衣后测定, 避免了其紫外吸收干扰。

仪器自我训练时, 纯品样品数应根据检测对象和仪器性能来决定, 必须得出同一性结论, 否则应加大样本量后再训练, 直到自我训练最终完成。

收稿日期: 2000-01-10

(上接第 224 页) 进样量在 8~180ng 范围内呈良好的线性关系。进样量在 1.5mg 仍有明显响应。样品溶液在室温下 24h 内保持稳定。本法快速、简便、可靠、检出灵敏度高于薄层法, 既可用于定性鉴别, 也可用于定量测定。

30min 与数次超声提取效果相当, 可用温水浴提取代替超声提取。

3.3 本法的阴性加样回收率较低, 而已知样品的回收率较高, 系因三七药材粉末对丹参酮 II A 有一定吸附作用, 不能完全提取之故, 用同等方法测定的已知样品因已处于吸附饱和状态, 故有较高的回收率。

3.4 药材的测定结果表明, 丹参酮 II A 的含量差异高达数倍, 说明虽然中国药典规定了丹参酮 II A 的含量(0.2%), 但实际市场上的药材仍良莠不齐, 许多未能达到标准规定, 直接影响到制剂的质量。一些厂家基于经济效益的考虑, 在丹参浸膏的生产中采取水提的方法, 未能有效提取脂溶性成份, 使丹参浸膏的有效成分的含量极低, 也直接影响了制剂的质量。我们用符合药典标准的药材自制复方丹参片, 丹参酮 II A 的含量每片均可达 50μg 以上。而市场上的样品含量差异达 10 倍之多, 建议尽快规定复方丹参片的含量限度, 对于提高药品质量很有必要。

收稿日期: 2000-01-08

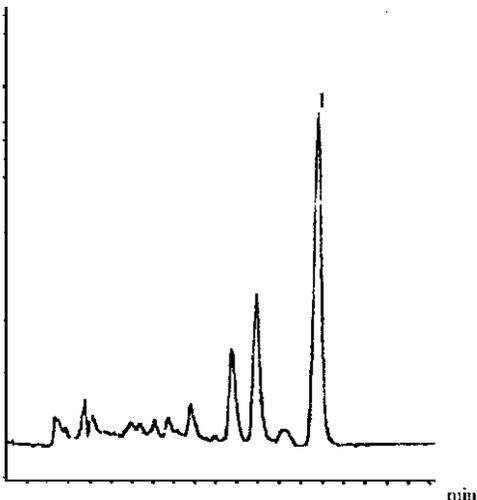


图 2 复方丹参片色谱图

峰 1 为丹参酮 II A (保留时间 10.67min)

3.2 对提取条件进行考察, 用乙醚温水浴回流