

八味丹参茶中丹参酮Ⅱ_A和总黄酮的测定毕跃峰¹, 艾国民², 麻兵继³, 曹金斌³, 刘宏民¹

(1. 郑州大学 新药研究开发中心, 河南 郑州 450052; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094;

3. 河南农业大学 中药材系, 河南 郑州 450002)

八味丹参茶是一味集传统经典方丹参饮方、地仙丹方、二精丸方之精华于一体自主研发的保健品, 由河南方城道地药材裕参以及山楂为主等8味名贵野生药材精制而成, 具有明显的防治高血脂、高血压以及脂肪肝等作用。丹参、山楂中富含降血脂、降血压作用的丹参酮、丹参酚酸、黄酮等有效物质群。本实验采用高效液相法、分光光度法对八味丹参茶中丹参酮Ⅱ_A、总黄酮进行了定量测定, 为其质量控制标准的制定及其进一步的推广应用提供依据。

1 仪器、试剂与材料

日本岛津 LC-10ATvp 型高效液相色谱仪, SPD-10Avp 可见-紫外检测器及威玛龙 V5.21-PLUS+ 色谱工作站; JASCO V-550 UV/Vis 紫外分光光度计; KQ-100B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AE 260 分析天平(Mettler-TOL EDO 仪器公司); R-200 旋转蒸发器(德国 Büchi 公司)。

丹参酮Ⅱ_A对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110766-200416); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 080-9303); 95%乙醇、NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH、CHCl₃ 等均为分析纯。甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

八味丹参茶样品由河南省方城县裕隆科技发展有限公司生产并提供。

2 丹参酮Ⅱ_A的 HPLC 法测定^[1,2]

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 mm) 柱; 流动相为甲醇-水 (75:25); 体积流量 1.0 mL/min; 波长 270 nm, 柱温 30℃; 进样量 10 μL。理论板数按丹参酮Ⅱ_A 峰计算应不低于 2 000。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取丹参酮Ⅱ_A 对照品 20 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密量取 10 mL 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(含丹参酮Ⅱ_A 160 μg/mL)。

2.3 标准曲线的绘制及线性范围: 取对照品溶液, 分别进样 2、6、8、16、20 μL, 测定, 记录色谱峰及峰面积。以丹参酮Ⅱ_A 进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $C = 0.223\ 6A - 2.776$, $r = 0.999\ 6$, 线性范围为 0.32~3.2 μg。

2.4 供试品溶液的制备: 精密称取八味丹参茶 0.5 g, 加入 75% 甲醇(每次 20 mL), 加热回流 2 次, 每次 1 h, 过 0.45 μm 滤膜滤至 50 mL 量瓶中, 以 75% 甲醇补充至刻度, 待用。

2.5 精密度试验: 取八味丹参茶样品, 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定计算得丹参酮Ⅱ_A 峰面积的 RSD 为 0.5%。

2.6 稳定性试验: 取八味丹参茶样品, 制备供试品溶液分别在 0.5、6、9、12、24、36、48 h 进行测定, 计算得丹参酮Ⅱ_A 峰面积的 RSD 为 0.7%, 表明样品在 48 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 取八味丹参茶样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 进行测定, 结果丹参酮Ⅱ_A 质量分数的 RSD 为 2.6%。

2.8 加样回收试验: 取八味丹参茶样品 6 份, 每份 0.2 g, 分别精密加入丹参酮Ⅱ_A 对照品溶液 10 mL, 制备供试品溶液测定, 得平均回收率为 100.3%, RSD 为 2.6%。

2.9 样品测定: 取 5 批八味丹参茶样品制备供试品溶液进行测定, 并计算丹参酮Ⅱ_A 的质量分数, 结果见表 1, 色谱图见图 1。

表 1 八味丹参茶中丹参酮Ⅱ_A 测定结果Table 1 Determination of tanshioneⅡ_A in Bawei Danshen Tea

批号	丹参酮Ⅱ _A /%	批号	丹参酮Ⅱ _A /%
1	0.14	4	0.15
2	0.16	5	0.13
3	0.13		

3 总黄酮的测定^[3,4]

收稿日期: 2006-12-12

作者简介: 毕跃峰(1969—), 女, 河南郑州市人, 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 天然药物化学及新药开发。

Tel: (0371)61917506 Fax: (0371)67767200 E-mail: 2000byf@sina.com

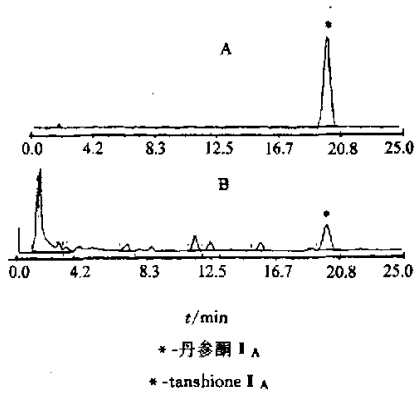


图1 丹参酮 I_A 对照品(A)与样品的色谱图(B)

Fig. 1 HPLC Chromatogram of tanshinone I_A reference substance (A) and Bawei Danshen Tea (B)

3.1 供试品溶液的制备:准确称取八味丹参样品约1 g于50 mL具塞圆底烧瓶中,量取75%乙醇15 mL于烧瓶中,浸泡0.5 h,然后超声提取0.5 h,滤过至50 mL量瓶中,滤渣再用75%乙醇10 mL超声提取0.5 h,滤过;滤渣再用75%乙醇10 mL超声提取20 min。合并3次滤液,用75%乙醇定容至刻度,即得。

3.2 标准曲线的绘制:准确称取芦丁对照品14 mg于50 mL量瓶中,用75%乙醇定容至刻度。精密量取对照品溶液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加入5%NaNO₂溶液0.4 mL,摇匀,放置6 min,再加入10%Al(NO₃)₃溶液0.4 mL,摇匀,放置6 min,加入4%NaOH溶液4.0 mL,75%乙醇定容,摇匀,15 min后,于505 nm波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标进行直线回归,并求出回归方程为 $C=83.6502A+2.8613$, $r=0.9996$,线性范围为14.0~84.0 μg/mL。

3.3 精密度试验:同一供试品溶液重复测定6次,测得总黄酮质量分数的RSD为0.61%。

3.4 重现性试验:同一批样品平行取6份,制备供试品溶液测定,得总黄酮的平均质量分数为5.88%,RSD为1.2%。

3.5 稳定性试验:将同一供试品溶液每隔2 h测定1次,在12 h内结果稳定,总黄酮的RSD为2.2%。

3.6 加样回收率试验:精密称取适量八味丹参(含

总黄酮5.88%)6份,分别加入等量的总黄酮(以芦丁计),制备供试品溶液,计算结果总黄酮的加样回收率为98.7%,RSD为1.9%。

3.7 样品测定:取1 mL样品提取液于10 mL量瓶中,75%乙醇稀释至刻度,取2 mL稀释于10 mL量瓶中,加入5%NaNO₂溶液0.4 mL,摇匀,放置6 min,再加入10%Al(NO₃)₃溶液0.4 mL,摇匀,放置6 min,加入4%NaOH溶液4.0 mL,75%乙醇定容,摇匀。15 min后,于505 nm波长处测定吸光度,根据回归方程计算出样品总黄酮质量分数,取其平均值($n=3$),测得结果为5.88%。

4 讨论

由于中药复方成分复杂,特别本品中含有丹参酮、黄酮等化合物,紫外吸收干扰大,故必须选择合适的显色剂,以有利于方便、快速、准确地测定。经过试验研究表明:经200~600 nm波长扫描,发现样品在500 nm左右无明显吸收,利用亚硝酸钠-硝酸铝法显色后505 nm出现较大的吸收峰;丹参酮 I_A和芦丁显色前均在270 nm处有最大吸收,而丹参酮 I_A经亚硝酸钠-硝酸铝法显色后的最大吸收峰仍在270 nm处,芦丁经显色后却在505 nm处有最大吸收,故确定用亚硝酸钠-硝酸铝法在波长505 nm处测定总黄酮。

本研究建立了高效液相法和比色法测定八味丹参茶中丹参酮 I_A、总黄酮的方法,结果表明八味丹参茶中含有较为丰富的丹参酮、黄酮等有效物质,并且这两种方法简便易行、快速、稳定,因此可为八味丹参茶质量控制标准的制定和质量评价提供有意义的参考价值。

References:

- [1] Liu H Q, Lü D, Chen Y R. HPLC Determination of four tanshinones in *Radix Salviae* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25 (2): 229-232.
- [2] Li X P, Yang S J, Man S W. Determination of tanshinone I_A in Ningshenbuxin Tablets by HPLC [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2005, 25 (5): 448-450.
- [3] Zhang Z P, Huang W B. Ultrasonic extraction and determination of total flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. [J]. *J Agric Sci* (农业科学研究), 2006, 27 (1): 22-24.
- [4] Nian H, Zhang Q Y, Zhen H C et al. Determination of total flavonoids and icariin in Erxian Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37 (2): 221-222.