

HPLC-ELSD 法测定丹参及其提取物中 Na、K 元素

王晓毅^{1,2}, 章顺楠², 周立红², 叶正良^{2*}, 范颖^{1*}

1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032

2. 天津天士力集团, 天津 300410

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 法测定丹参及其提取物中 Na、K 元素的方法。方法 色谱柱为 Waters Sepherisorb SCX 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.05 mol/L 醋酸铵 (醋酸调节 pH 值至 4.8) -乙腈 (70 : 30), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 °C; ELSD 漂移管温度 100 °C, 载气体积流量 2 L/min, 检测器增益为 2。结果 Na 元素在 19.7~197.0 μg/mL ($r=0.9998$) 线性关系良好, K 元素在 35.0~350.0 μg/mL ($r=0.9995$) 线性关系良好; Na、K 平均回收率分别为 99.0%、100.2%, RSD 分别为 0.7%、0.8%。结论 所建立的方法简单可靠, 可以用于测定丹参及其提取物中 Na、K 元素。

关键词: HPLC-ELSD; 丹参; 提取物; Na; K

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)14-1931-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.012

Determination of sodium and potassium in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and its extract by HPLC-ELSD

WANG Xiao-yi^{1,2}, ZHANG Shun-nan², ZHOU Li-hong², YE Zheng-liang², FAN Ying¹

1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

2. Tianjin Tasly Group, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish the HPLC-ELSD method for the determination of sodium (Na) and potassium (K) in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMRR) and its extract. **Methods** The column was Waters Sepherisorb SCX column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was 0.05 mol/L ammonium acetate solution (adjusted to pH 4.8 with acetic acid)-acetonitrile (70 : 30); The flow rate was 1.0 mL/min; The column temperature was 30 °C; The drift tube temperature of ELSD was 100 °C; The gas flow rate was 2 L/min; And the detector gaining was 2. **Results** The calibration curves of Na and K were linear in the ranges of 19.7—197 μg/mL ($r = 0.9998$) and 35.0—350 μg/mL ($r = 0.9995$), respectively. The average recoveries of Na and K were 99% (RSD = 0.7%) and 100.2% (RSD = 0.8%), respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate, and is suitable for determining the contents of Na and K in SMRR and its extract.

Key words: HPLC-ELSD; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; extract; Na; K

丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMRR) 功效为活血祛瘀、凉血消痈、养血安神; 味苦性微寒, 归心、心包、肝经^[1]。近年来, 已经有多位学者总结了丹参及其制剂的药理作用^[2-4]。此外, 随着研究的深入, 丹参中 Na、K 元素的药理作用也日益受到学者的关注^[5-7]。有研究指出丹参药材中 Na 和 K 元素, 相对于其他无机元素而言为宏量

元素^[8]。目前, 检测中药材、中药提取物及其制剂中 Na、K 元素的方法均是按照《中国药典》2010 年版的方法 (电感耦合等离子体质谱, ICP-MS)^[9]。实践中, 药典检测方法也存在一定的问题, 其在于供试品的制备时间长, 这直接导致了样品检测周期长; 另外, 在供试品制备过程中需使用强酸, 这对实验人员及环境造成一定程度的危害。因此, 有

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 科技重大专项“重大新药创制”(2012ZX09101202)

作者简介: 王晓毅, 助理研究员, 博士, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: 13662082240 E-mail: cock032914@163.com

*通信作者 叶正良 Tel: (022)86342066 E-mail: yezl@tasly.com

范颖 Tel: (024)31207104 E-mail: lnzyfy@126.com

网络出版时间: 2013-04-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130409.1200.001.html>

必要建立新的检测方法,在保证分析结果准确的前提下,既能达到快速检测样品的目的,同时还能避免使用强酸所带来的危害。

蒸发光散射检测器(ELSD)为通用型检测器,只要待测物质的挥发性低于流动相的挥发性,且在检测器中能形成气溶胶,均可采用 ELSD 进行定性、定量分析^[10]。有文献报道^[11-12]测定化学药中的 Na 元素,目前尚无利用 ELSD 测定中药中 Na、K 等金属元素的报道。本实验利用 ELSD 检测器建立测定丹参药材及其提取物中 Na、K 元素的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Alltech 2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司); Millipore-Q 超纯水制备仪(法国密理博公司); XWK-3A 空气泵(天津市分析仪器厂)。

丹参药材(批号 SL-10、SL-20、SL-30、SL-40,天津天士力集团提供),经辽宁中医药大学康廷国教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge

的干燥根和根茎;丹参提取物(批号 DSTQW-10、DSTQW-20、DSTQW-30、DSTQW-40,天津天士力集团);对照品 NaCl、KCl:使用前在 110 °C 干燥至恒定质量,Na 和 K 分别为 39.34%和 38.61%;醋酸铵和冰醋酸均为 HPLC 级;色谱纯乙腈为 Merck 公司产品,水为 Millipore-Q 制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱为 Waters Sepherisorb SCX 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.05 mol/L 醋酸铵(醋酸调节 pH 值至 4.8)-乙腈(70:30),体积流量为 1.0 mL/min,柱温 30 °C;ELSD 漂移管温度为 100 °C,载气体积流量 2 L/min,检测器增益为 2,进样量 10 μL。

在上述色谱条件下进行分析,理论塔板数以 2 种指标性成分计,Na 元素不低于 600, K 元素不低于 1 300,两峰之间分离度为 6.8,拖尾因子在 0.95~1.05,色谱图见图 1。

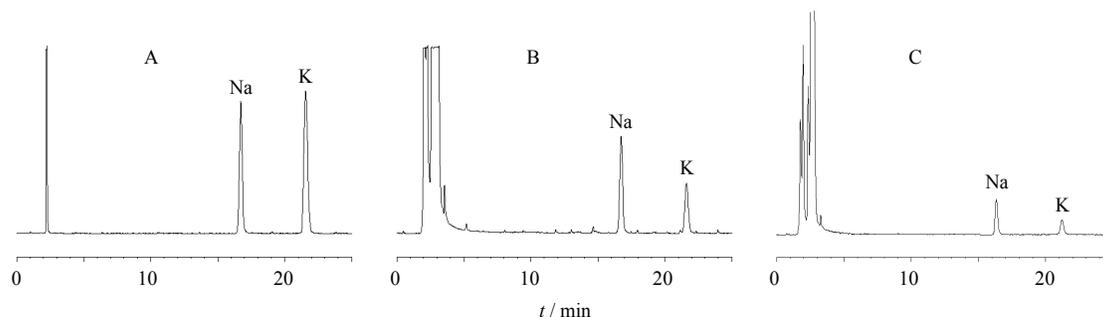


图 1 混合对照品 (A)、丹参提取物 (B) 和丹参药材 (C) 的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of mixed reference substances (A), SMRR extract (B), and SMRR raw materials (C)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 分别取对照品 NaCl 和 KCl 适量,精密称定,置于量瓶中,加水溶解并定容,制成含 Na、K 元素质量浓度分别为 197.0、350.0 μg/mL 的混合溶液,作为对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 直接取丹参药材提取液 50 mL,浓缩至 10 mL,摇匀,微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

取丹参提取物约 400 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,过微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

2.3 线性关系考察

从对照品储备液中依次精密量取 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL,加水定容至 10 mL,摇匀。按“2.1”

项下色谱条件依次进样分析,记录色谱峰面积。ELSD 的响应非线性,待测成分质量浓度(C)与散射光光强(I)可用关系式 $I = kC^b$ (k、b 是与实验条件有关的常数,其中 b 值与仪器自身设计有关,数值范围通常在 0.9~1.8^[13-14]) 描述,二者对数线性相关: $\lg I = b \lg C + \lg k$,以 $\lg I$ 为纵坐标, $\lg C$ 为横坐标,进行线性回归,得回归方程: Na 元素 $\lg I = 1.4059 \lg C + 3.8585$, $r = 0.9998$; K 元素 $\lg I = 1.634 \lg C + 3.1050$, $r = 0.9995$; 结果表明 Na 元素在 19.7~197.0 μg/mL, K 元素在 35.0~350.0 μg/mL 线性关系良好。本方法线性较好, b 值落在 0.9~1.8 内。

2.4 定量限与检测限

取“2.2.1”项下对照品储备液逐级稀释,在上述色谱条件下进样测定。以信噪比为 10:1 时确定

定量限,结果Na、K元素的定量限分别为1.97 μg/mL和0.35 μg/mL;以信噪比为3:1时确定检测限,结果Na、K元素的检测限分别为0.6 μg/mL和0.12 μg/mL。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液(Na元素98.5 μg/mL, K元素175.0 μg/mL)10 μL,重复进样6次,按上述色谱条件测定,Na、K元素峰面积的RSD分别为1.0%、1.1%。

2.6 稳定性试验

分别称取批号为DSTQW-10的丹参提取物,按“2.2.2”项下方法制备样品供试品溶液,分别在0、2、4、6、8、10、12 h测定,Na、K元素峰面积的RSD分别为1.3%、1.5%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批提取物供试品(批号DSTQW-10)6份,按照“2.2.2”项操作,测得Na、K元素在提取物中的平均质量分数分别为0.91%、1.1%,RSD分别为0.9%、1.3%。

2.8 回收率试验

取已测定的丹参提取物(批号DSTQW-10)6份,每份约200 mg,精密称定,分别精密加入含有Na元素1.80 mg和含有K元素2.20 mg的NaCl、KCl对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,计算回收率。结果平均回收率分别为Na元素99.0%、K元素100.2%,RSD分别为0.7%、0.8%。

2.9 样品测定

分别取4批丹参药材及4批提取物,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,采用外标法计算,结果见表1。

2.10 ELSD法与ICP-MS(药典法)测定结果比较

本实验针对提取物中Na、K元素的测定结果进

行对比(样品称样量均为400 mg,精密称定,测试提取物批号为DSTQW-10、DSTQW-20、DSTQW-30、DSTQW-40),对比结果见表2。由相对平均偏差(RD)结果可知,2种方法测定结果基本一致。

表2 ELSD与ICP-MS测定结果比较(n=6)

Table 2 Comparison on determination results by ELSD and ICP-MS (n=6)

批号	Na / %			K / %		
	ELSD	ICP-MS	RD	ELSD	ICP-MS	RD
DSTQW-10	0.91	0.92	0.27	1.10	1.11	0.23
DSTQW-20	0.92	0.93	0.27	1.11	1.10	0.23
DSTQW-30	0.92	0.93	0.27	1.09	1.10	0.23
DSTQW-40	0.92	0.93	0.27	1.10	1.11	0.23

3 讨论

结合文献方法^[11-12,15-17]的基础上,本实验主要优化了色谱条件和检测器条件。在流动相比比例不变的情况下,考察了醋酸铵(pH值维持4.8不变)的浓度依次为0.02、0.05、0.08、0.10 mol/L,结合保留时间和噪音情况,选定醋酸铵浓度为0.05 mol/L。检测器主要考察漂移管温度对其分离效果的影响,考察温度分别为80、90、100、110 °C,结合基线平衡时间和噪音信号情况,漂移管温度选定在100 °C。

本实验所用的色谱柱填料为阳离子交换树脂,流动相中的铵根离子同Na、K元素,会在树脂上产生竞争性吸附,当铵根离子的浓度足够高时,会替换掉吸附在树脂上的Na、K元素,因此树脂柱不会影响Na、K的测定。

丹参药材提取液浓缩情况的考察:取50 mL提取液,依次浓缩到50、40、30、20、10 mL,按照“2.1”项条件进样分析。结果显示,浓缩至10 mL时,测量结果接近线性中点。

本实验从丹参药材的提取工艺到丹参提取物的制备工艺,均为自主研发,这两套工艺正在申请专利中。本实验首次利用HPLC-ELSD建立了快速检测丹参药材及其提取物中Na、K元素的方法。经比较,可以用该法替代药典方法。该方法也为丹参制剂中Na、K元素的测定研究提供了理论基础。

Na和K元素在人体内过量或不足,都会影响人体的正常生理功能。对于有心脏病的患者来说,影响更大^[5,18-19]。本实验的结果为指导临床医师合理用药提供了理论基础。

表1 丹参及其提取物中Na、K元素的测定结果(n=3)

Table 1 Determination of Na and K in SMRR and its extract (n=3)

批号	Na / %	K / %	批号	Na / %	K / %
SL-10	0.40	0.61	DSTQW-10	0.91	1.10
SL-20	0.41	0.60	DSTQW-20	0.91	1.20
SL-30	0.42	0.60	DSTQW-30	0.92	1.10
SL-40	0.42	0.60	DSTQW-40	0.92	1.10

参考文献

- [1] 凌一揆. 中药学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1984.
- [2] 杨志霞, 林 谦, 马 利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 93-97.
- [3] 罗彩莲. 丹参的药理作用与临床应用 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(12): 11-12.
- [4] 束 云, 李貽奎, 李连达. 复方丹参制剂药理作用的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 132-134.
- [5] 何邦平, 赵德山, 赵 霖, 等. 心脏病患者血清七种元素含量与血压及生化指标的关系 [J]. 中华医学杂志, 1994, 74(8): 492-495.
- [6] 因杰秀. 归心经中草药中钾、钙、钠、镁含量测定与研究 [D]. 太原: 山西大学, 2010.
- [7] 许 磊. 常用跌打损伤中药中钾元素的含量测定与研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [8] 谢显莉, 刘 琪, 张 利, 等. 火焰原子发射光谱法测定鼠尾草属植物中钾和钠的含量 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 14929-14931.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [10] 孙毓庆. 现代色谱法及其在药物分析中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [11] 刘浩仇, 仇仕林, 王红武. HPLC-蒸发光散射检测法测定注射用头孢他啶中碳酸钠的含量 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(3): 225-228.
- [12] 乐 健, 陈桂良. HPLC-蒸发光散射器检测注射用头孢曲松钠中钠离子的含量 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(7): 632-634.
- [13] Righetta M, Guiochon G. Effects of the nature of the solvent and solutes on the response of a light-scattering detection [J]. *J Liq Chromatogr*, 1988, 11(9/10): 1967-1971.
- [14] Brown P R, Grushka E. *Advances in Chromatography* [M]. Vol 40. Amsterdam: Marcel Dekker, 2000.
- [15] 赵 迪, 周悌强, 冯素香, 等. HPLC-ELSD-UV 法同时测定氨酚那敏三味浸膏胶囊中长梗冬青苷、白花前胡甲素、白花前胡乙素 [J]. 中成药, 2012, 34(10): 1908-1912.
- [16] 杨必成, 刘 海, 杨义芳, 等. HPLC-ELSD 测定油菜花粉抗前列腺增生活性部位中 4 种脂肪酸类化合物 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1967-1970.
- [17] 方惠娟, 李 清, 关潇滢, 等. HPLC-ELSD 法测定蒺藜粗皂苷中 3 种甾体皂苷元 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2417-2419.
- [18] 韦公远. 硒、镁、铜人体不可缺少的微量元素 [J]. 山东食品科技, 2003, 5(5): 17.
- [19] 李文春, 刘文亮, 孙永慧. 原子吸收光谱法测定注射用丹参中总钠的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(10): 51-52.